

**UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**



**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE UN PROGRAMA DE
VACUNACIÓN CONTRA EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE
NEWCASTLE FRENTE AL DESAFÍO DE UNA CEPA VELOGÉNICA DE
CAMPO**

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

GUSTAVO DELFÍN NÚÑEZ RODRÍGUEZ

TRUJILLO, PERÚ

2016

La presente tesis ha sido revisada y aprobada por el siguiente Jurado:

M.V. Mg. César Leopoldo Lombardi Pérez
PRESIDENTE

M.V. Mg. Roberto Briones Cabellos
SECRETARIO

M.V. Mg. Vilma Patricia Guerrero Díaz
VOCAL

M.V. Mg. Ciro Meléndez Tamayo
ASESOR

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico con mucho amor.

A Dios por darme la bendición de vivir un día más al lado de las personas que amo y por permitirme concluir y no desfallecer en el intento de concluir mi carrera, a mi madre, por su perseverancia, a mi padre, por su paciencia y grandes consejos, a mis hermanos, por alentarme siempre a seguir luchando por mis objetivos día tras día, en especial consideración a mi esposa e hija, por ser los motivos de los sacrificios que en esta vida hay que tomar para poder darles lo mejor, y gracias a todos mis familiares por su tiempo y sabiduría que me transmitieron para el desarrollo de mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por regalarme un día más de vida, y la de mi familia, por las oportunidades que me regala y por las personas extraordinarias que pone en mi camino.

A mi Madre Martha, por ser la mejor madre del mundo, por sus palabras, empuje, ahínco, perseverancia, principios y valores que me ha inculcado en el transcurso de mi vida y formación profesional que han hecho de mí un hombre fuerte y desafiante.

A mi Padre Eduardo, que ha sido mi inspiración y modelo, por sus consejos y reflexiones, que me ha formado como mejor persona y profesional capaz de discernir entre lo bueno y lo malo, con capacidad de corregir mis errores y enmendarlos, por enseñarme que la sinceridad es una cualidad moral de gran valor en estos tiempos.

A mis hermanos, por la unión y protección que nos tenemos, por creer siempre en mí y darme su apoyo incondicional, por enseñarme que para alcanzar tus metas en esta vida se tiene siempre que luchar.

A mi esposa e hija, que con su amor y carisma me dan el aliento para seguir adelante todos los días, son la misión principal en esta vida.

A mi asesor y amigo Ciro Meléndez por el apoyo y tiempo invertido para culminar esta investigación.

Al Ing. Jorge Robles Gerente de producción de la empresa Redondos, por creer en mí, por su apoyo, paciencia y comprensión, es y será siempre un modelo a seguir en el ámbito profesional y humano, ha sido pieza fundamental para el término de esta tesis.

ÍNDICE

	Pág.
CARATULA.....	i
APROBACIÓN POR JURADO DE TESIS	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Gallus gallus domesticus	3
2.2. Enfermedad de Newcastle.....	3
2.3. Epizootiología.....	7
2.4. Hospedadores.....	8
2.5. Transmisión y difusión.....	9
2.6. Periodo de incubación.....	10
2.7. Patogenicidad	10
2.8. Patología.....	11
2.9. Signos clínicos.....	12
2.10. Diagnóstico.....	13
2.11. Control de la enfermedad	14
2.12. Serología.....	15
2.12. Lesiones macroscópicas	15
2.13. Lesiones microscópicas.....	16
2.14. Vacunación y Cepas vacunales.....	17
2.15. Tipos de vacunas.....	19
2.16. Sistema Inmune frente a virus	20

2.17. Esquemas de vacunación en pollos de engorde	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Lugar de ejecución de la investigación	24
3.2. Instrumental y equipos	25
3.3. Diseño experimental	25
3.4. Tratamientos	26
3.5. Cepa de desafío	26
3.6. Vacunas utilizadas en el programa de vacunación	26
3.7. Programa de vacunación evaluado	27
3.8. Parámetros evaluados	27
3.9. Análisis estadístico	28
IV. RESULTADOS	29
4.1. Signos clínicos	29
4.2. Mortalidad	31
4.3. Serología	32
V. DISCUSIÓN	34
VI. CONCLUSIONES	36
VII. RECOMENDACIONES	37
VIII. BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS	48

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Patotipos e índices de rangos de patogenicidad.....	11
Cuadro 2. Programa evaluado con respecto a los días de vacunación... 27	
Cuadro 3. Signos clínicos (%)	30
Cuadro 4. Mortalidad de los tratamientos durante la prueba	31
Cuadro 5. Niveles promedio de anticuerpos contra la ENC.....	32
Cuadro 6. Incremento de los niveles de anticuerpos contra la ENC.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Incremento en los niveles de anticuerpos contra la ENC	33

ÍNDICE DE ANEXOS#

	Pág.
Anexo 1. Títulos de anticuerpos por Prueba de Elisa Indirecto tratamiento A (pre reto).....	49
Anexo 2. Títulos de anticuerpos por Prueba de Elisa Indirecta tratamiento A (post reto)	50
Anexo 3. Baterías que almacenan aves para experimentos.....	51
Anexo 4. Toma de muestras de sangre Pre desafío.....	51

RESUMEN

El presente estudio se realizó en el módulo experimental de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima; para evaluar la eficacia de un programa de vacunación contra la enfermedad de Newcastle, se utilizaron dos vacunas vivas y una inactivada frente al desafío de una cepa velogénica de campo en 90 pollos de la línea Ross, distribuidos en tres tratamientos de 30 aves cada uno, tratamiento A, aves vacunadas y desafiadas (grupo experimental), tratamiento B, aves vacunadas no desafiadas (control negativo) y tratamiento C, aves no vacunadas y desafiadas (control positivo). Los tratamientos A y C fueron desafiados a los 25 días de edad, con un inoculo velogénico del virus de Newcastle, evaluándose los signos clínicos, mortalidad y titulación serológica compatibles con la enfermedad, pre y post desafío. Las aves presentaron conjuntivitis (63%), depresión (67%), ronquera (30%), diarreas verdosas (66%), parálisis (20%), signos nerviosos (17%) y torticollis (7%). La mortalidad en el tratamiento A fue de 50% frente al 77% del tratamiento C. Los parámetros serológicos mostraron diferencia significativa post desafío entre el promedio de títulos del tratamiento A (6989,67), respecto del tratamiento C (12316,60). Concluimos que los títulos de anticuerpos proporcionados por las 2 vacunas vivas y 1 vacuna inactivada, no fueron eficaces contra el virus de Newcastle.

ABSTRACT

The present study was performed in the laboratory of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima; conducted to evaluate the effectiveness of a vaccination program against the virus of Newcastle disease, were used 2 live vaccines and 1 inactivated vaccine against facing the challenge of velogenic strain field in 90 chickens Ross, they were distributed into three treatments of 30 birds. Treatment A vaccinated and challenged birds (experimental group), treatment B vaccinated no challenged birds (negative control), and treatment C was not vaccinated and was challenged (positive control). The treatments A and C were challenged at the age of 25 days, with a virus inoculum velogenic Newcastle disease. Clinical signs, mortality and serology compatible with the disease were evaluated pre and post challenge, conjunctivitis (63%), depression (67%), hoarseness (30%), greenish diarrhea (66%), paralysis (20%), nervous ticks (17%), stiff neck (7%).

Regarding to mortality, treatment A showed 50% of death compared to 77% of treatment C.

Regarding to serological parameters was observed that there was an important difference between the titles average of treatment A (6986.67) compared to treatment C (12316.60) post challenged.

In conclusion the antibody protective titles of a vaccination program provided by 2 live vaccines and 1 inactivated vaccine they were not effective against the Newcastle disease virus.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades respiratorias de origen viral continúan siendo la mayor causa de pérdidas económicas en el sector avícola a nivel mundial, se diseminan con facilidad y rapidez. En la enfermedad de Newcastle (ENC) el control es posible con extremas precauciones y de presentarse brotes se puede hacer muy poco (Calnek, 2000).

La ENC es altamente contagiosa, y es causada por cepas virulentas del virus de la enfermedad de Newcastle (vENC), alrededor de 250 especies de aves pueden infectarse con ENC de forma natural o experimental, incluyendo aves de corral (Aldous y Alexander, 2001). Es muy probable que todas las especies de aves sean susceptibles a la infección, pero en términos de enfermedad ésta varía considerablemente según la especie (Kaleta y Baldauf, 1988).

El primer reporte de ENC en América del Sur fue en Venezuela en el año 1950, al año siguiente, la enfermedad fue diagnosticada por primera vez en el Perú. En varias ocasiones la ocurrencia de brotes de la enfermedad se ha determinado por reportes de casos remitidos al Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La enfermedad fue considerada como una de las principales que afectaban a la avicultura nacional (Cortez 1970; Inga, 1991), la implementación de estrictas medidas de bioseguridad a nivel de la industria avícola y las por parte del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), la enfermedad es considerada de baja ocurrencia. A pesar de las acciones sanitarias inmediatas las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad son impredecibles (Martins, 2003).

Los productores avícolas consideran programas de vacunaciones los cuales varían en función al tipo de producción, comportamiento de la enfermedad, costos y pérdidas potenciales. En la última década, las grandes epidemias que afectaron a las aves de corral fueron la influenza aviar y la enfermedad de Newcastle con grandes pérdidas económicas; por ello la vacunación debería administrarse en el marco de programas nacionales o regionales bajo la supervisión oficial de los servicios veterinarios públicos (Marangon y Busani, 2007).

Por esa razón en el presente trabajo se evaluó un programa de vacunación para pollos de engorde, conformada por dos vacunas vivas y una inactivada en contra de una cepa velogénica de la ENC.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Gallus gallus domesticus*

El pollo (*Gallus gallus domesticus*) es un ave de corral domesticada, una subespecie de la *Gallus gallus*. Como uno de los animales domésticos más comunes y extendidas (Ramon, 2013), con una población de más de 19 mil millones en 2011, señala que hay más pollos en el mundo que cualquier otra especie de ave o animal doméstico. Los seres humanos tienen pollos principalmente como una fuente de alimento, consumiendo su carne y sus huevos.

En la actualidad se han desarrollado razas especializadas que poseen una gran capacidad para producir huevos y carne. Estos animales se explotan confinados en naves de gran capacidad. El logro del potencial genético de las aves depende de los siguientes factores: buen manejo para proporcionar a los pollos el ambiente que requieren, un régimen alimenticio que ofrezca nutrientes con el perfil apropiado, bioseguridad eficaz y control de enfermedades. Si cualquiera de estos elementos está por debajo de su nivel óptimo, el rendimiento de los pollos se verá afectado adversamente. Estos tres aspectos, ambiente, nutrición y salud, dependen también entre sí, por lo que las deficiencias en cualquiera de ellos acarrearán consecuencias negativas en los demás (Manual del pollo Ross, 2010).

2.2. Enfermedad de Newcastle

La enfermedad de Newcastle se define como una infección de las aves de corral causada por el virus de la enfermedad de Newcastle, que es un paramixovirus aviar de serotipo 1 (PMVA-1) que reúne uno de los siguientes criterios de virulencia (OIE, 2016):

- a) El virus tiene un índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) en polluelos de un día (*Gallus gallus*) equivalente o superior a 0.7.
- b) Se ha demostrado (directamente o por deducción) la presencia de múltiples aminoácidos básicos en el virus, en el extremo C-terminal de la proteína F2 y un residuo de fenilalanina en la posición 117, la cual está en el extremo N-terminal de la proteína F1. Por “múltiples aminoácidos” se entiende la presencia de al menos tres residuos de arginina o lisina entre las posiciones 113 y 116. La imposibilidad de demostrar la presencia de este modelo característico de residuos de aminoácidos exigirá la caracterización del virus aislado mediante una prueba de determinación del IPIC.

En esta definición, los residuos de aminoácidos se enumeran desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos del gen F0, donde las posiciones 113-116 corresponden a los residuos -4 a -1 a partir del punto de escisión.

2.2.1. Agente etiológico

El vENC es del orden mononegavirales (de cadena simple, no segmentada, con su ARN de sentido negativo y cápside de simetría helicoidal) pertenece a la familia Paramixoviridae, y al género de paramixovirus y se ha reconocido como serotipo de paramixovirus 1 (PMV-1). Se han diferenciado nueve serotipos de paramixovirus aviario y se han aislado algunas cepas que no han podido agruparse (Lamb y otros, 2005; Telbis y otros, 1989).

2.2.2. Estructura y morfología (vírica)

Los viriones de los miembros de la familia Paramyxoviridae son partículas recubiertas, más o menos esféricas, pleomórficas y miden entre

100-500 nm de diámetro, aunque se pueden encontrar formas filamentosas de aproximadamente 100nm de ancho y longitudes variables. Con una molécula grande de ARN de cadena única. La superficie de la partícula viral se encuentra cubierta con proyecciones de dos tamaños distintos, Dos glicoproteínas de las proyecciones de las superficies tienen actividad tanto hemaglutinina como neuraminidasa.

El vENC es relativamente termoestable. Permanecen infecciosos en la medula ósea y los músculos de las gallinas sacrificadas durante al menos 6 meses a -20°C y hasta 134 días a 1°C . Pueden sobrevivir durante varios años en restos secos. Se han utilizado compuestos de amonio cuaternario, lysol al 1-2%, cresol al 0.1% y formalina al 2%, para la desinfección (Fenner, 1992; Jordan 1990).

En su cubierta presenta proyecciones, las cuales son proteínas de superficie. Las principales son 6.

- L-RNA polimerasa asociada directamente a la nucleocapside del virus.
- HN- responsable de la actividad de la hemaglutinina y neuramidasa (constituyen las proyecciones más largas de la superficie viral).
- F- proteína de fusión, que forman las proyecciones de superficie más pequeñas.
- NP- proteínas de nucleocapside.
- P- asociada a la fosforilización de la nucleocápside.
- M- proteína matriz.

2.2.3. Propiedades biológicas

Existen algunas principales características biológicas asociadas con los paramixovirus, estas características son, actividad hemaglutinante, actividad de la neuraminidasa, fusión celular y hemólisis (Mora, 2005).

a) Actividad hemaglutinante

Es una habilidad del vENC y de otros paramixovirus aviares para aglutinar glóbulos rojos, se debe a la unión de la proteína hemaglutinina – neuraminidasa (HN) con los receptores en la superficie de las células rojas. Esta propiedad y la inhibición específica de la aglutinación por medio de antiseros han demostrado ser armas poderosas en el diagnóstico de la enfermedad (Mora, 2005).

b) Actividad neuraminidasa

La enzima neuraminidasa es también parte de la molécula hemaglutinina – neuraminidasa (HN). Una consecuencia obvia de la presencia de esta enzima es la elusión gradual de los glóbulos rojos aglutinados. La función exacta de la neuraminidasa en la replicación viral es desconocida, pero es probable que la neuraminidasa remueva receptores virales de la célula huésped, previniendo la adhesión de las partículas virales liberadas y el agrupamiento viral.

c) Fusión celular y hemólisis

Tanto el vENC como otros paramixovirus pueden producir hemólisis de los glóbulos rojos o la fusión de otras células esencialmente por el mismo mecanismo. La adhesión a los receptores durante la replicación es seguida por la fusión de la membrana viral con la membrana celular, lo cual podría resultar en la fusión de una o más células (similar a la formación de sinocitos que ocurre cuando las partículas virales salen por gemación de las células). La membrana rígida de los glóbulos rojos usualmente resulta en lisis al momento de la fusión de la membrana viral (Mora, 2005).

2.2.4. Replicación viral

La estrategia empleada por este virus es en general la misma empleada por los virus de polaridad negativa. El primer paso es la unión del virus a los receptores de la célula, mediante el polipéptido HN. Luego se lleva a cabo la fusión virus-célula por acción de la proteína F, ingresando el complejo nucleocapside del virus a la célula. La replicación viral se lleva a cabo por completo en el citoplasma celular. Las proteínas virales que son sintetizadas en la célula infectada son transportadas a la membrana celular, la cual se modifica por su incorporación. Finalmente, siguiendo con la alineación de la nucleocapside para modificar regiones de la membrana celular, las partículas virales empiezan a “brotar” por gemación de la superficie celular (Alexander, 1998).

2.3. Epizootiología

Se han producido panzootias en todo el mundo entre 1940 y 1948, entre 1968 y 1972, y durante los años 80, en las que principalmente participaron las palomas mensajeras (Kaleta y Hettels-Resmann, 1992).

El uso generalizado de vacunas de vENC en aves de corral comerciales en todo el mundo hace que la verdadera distribución geográfica de vENC sea difícil de evaluar. Por lo general, se considera que el vENC virulento sea bien, enzoótica o es una causa de epizootia regularmente en las aves de corral a lo largo de la mayor parte de África, Asia, América Central y partes de Sudamérica. En las zonas más desarrolladas, como Europa occidental, se producen epizootias esporádicas con una frecuencia bastante regular a pesar del uso generalizado de la vacuna. Las aves acuáticas silvestres constituyen presumiblemente un reservorio del virus, ya que a partir de patos salvajes, gansos, garzas, cormoranes, pingüinos, y otras especies, se han aislado en los últimos años numerosos cepas de virus lentogénicas. El reservorio

del virus entre las aves domésticas lo constituyen las gallinas infectadas que no están suficientemente inmunizadas, presentando una enfermedad inaparente y a pesar de sus anticuerpos, estas albergan y excretan virus de campo virulento (SENASA Argentina, 2004).

Los reportes de la enfermedad en el mundo indican que la diseminación viral involucra aves silvestres, sugiriéndose una relación entre estas y los brotes. Las aves silvestres se consideran los reservorios naturales de virus de la ENC y en su mayoría albergan cepas lentogénicas (Jindal y otros, 2009).

Estudios realizados en la FMV de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) (Gherzi, 2011) sugieren que en el Perú el rol de las aves silvestres en la transmisión del virus es limitado. Se ha mencionado que la enfermedad es endémica en países donde se re-usa cama, sin embargo hay una mayor relación entre brotes y países donde la crianza de aves de riña es legal. Un porcentaje significativo de las aves de riña no se inmunizan apropiadamente o no se vacunan (Ferrer y otros 2008). Las aves de riña se mueven para competir o por intercambio entre criadores, constituyéndose en diseminadores potenciales del virus dentro y fuera del país.

2.4. Hospedadores

El vENC ha sido reportada de infectar otros animales aparte de las aves, que van desde reptiles hasta humanos. Según Kaleta y Baldauf (1988) concluyeron que las infecciones con ENC han sido establecidas en al menos 241 especies de aves representando 27 de las 50 órdenes de la clase.

2.5. Transmisión y difusión

Es razonable concluir que la infección del vENC puede darse mediante inhalación, ingestión o por contacto con las membranas mucosas, especialmente la conjuntiva. La transmisión de un ave a otra por lo tanto depende de la disponibilidad del virus en el ave infectada a su forma infecciosa (Capua y Alexander, 2009).

Se sabe que las cepas virulentas pueden replicarse en las aves vacunadas, pero los síntomas clínicos disminuyen considerablemente en relación con el nivel de anticuerpos alcanzado (Alexander, 1995). El movimiento de aves vivas (silvestres, mascotas, aves de riña, palomas mensajeras y aves comerciales, etc.), personas equipos, productos avícolas, contacto con otros animales, aire, alimento o agua contaminada, vacunas, insectos o roedores, han sido implicados como fuentes virales de diseminación en varias de las epizootias. La importancia de cualquiera de estos factores dependerá de la situación en la que la epizootia ocurra. (Icochea, 2007). Sin duda, el mayor potencial para la diseminación del vENC lo representan los humanos y sus equipos. Los humanos se pueden infectar con el vENC en la mucosa conjuntival, y esto podría funcionar como un medio de diseminación, pero el método más probable es la transferencia mecánica de material infectivo, principalmente heces.

En concordancia con el código sanitario para los animales terrestres (OIE 2007), un país debería ser considerado libre de ENC cuando este ha sido demostrado que no ha habido presencia de ENC por al menos 3 años atrás. Este periodo debería iniciar 6 meses después del sacrificio de los últimos animales afectados para los países en los cuales el sacrificio sanitario es tomado en práctica con o sin vacunación en contra de ENC. Las administraciones veterinarias de los países libres de enfermedad de Newcastle podrán prohibir el tránsito adicional o de los

productos a través de su territorio, procedentes de países infectados con vENC Considerando.

- Aves salvajes y domésticas
- Aves de un día de edad
- Huevos para incubación
- Semen de aves domésticas y salvajes
- Carne fresca de aves domésticas o salvajes
- Productos cárnicos de aves domésticas o salvajes que no hayan sido procesadas para asegurar la destrucción de vENC
- Productos de origen animal (aves) supervisado para el uso en la alimentación de animales o para el uso en la agricultura o industriales.

2.6. Periodo de incubación

El periodo de incubación de la ENC después de la exposición natural ha sido reportado de entre 2 a 15 días (como promedio de 5 a 6). La velocidad con la que los signos aparecen si es que aparecen, es variable dependiendo de la infectividad del virus, la especie huésped, la exposición previa al virus, la edad, el estado inmunológico, las infecciones concomitantes, las condiciones ambientales, la vía de exposición y la dosis (Alexander, 2003).

2.7. Patogenicidad

La determinación de la virulencia de los aislados del vENC, según la actual definición de la enfermedad por la OIE (2008), se realiza tanto por la secuenciación nucleotídica y deducción de la secuencia de aminoácidos de la región del péptido conectante de la proteína F como por pruebas de laboratorio in vivo. En la actualidad se recomienda realizar ambas pruebas pues se ha visto que aislados del vENC procedentes de

otras especies de aves, como la paloma, muestran resultados discordantes cuando se les realiza la caracterización patogénica (Cuello y otros, 2011). La prueba in vivo recomendada es el índice de patogenidad intracerebral (IPIC) en pollitos de 1 día de edad (OIE, 2008). Sin embargo, otras pruebas como el tiempo promedio de muerte embrionaria (TPM), y el índice de patogenidad intravenoso (IPIV) en pollos de 6-8 semanas de edad también son empleadas (Alexander, 1998). Estas pruebas de acuerdo con sus resultados (cuadro 1) permiten clasificar las cepas o aislados en cepas asintomáticas, cepas de baja virulencia conocidas como lentogénicas, cepas de virulencia intermedia, conocidas como mesógenicas y las cepas altamente virulentas denominadas velogénicas, que a su vez se dividen en viscerotrópica y neurotrópica (Alexander, 1998; Panda y otros, 2004).

Cuadro 1. Patotipos e índices de rangos de patogenidad

Patotipos e índices de patogenidad	Rango de índices		
	TPM (horas)	IPIC	IPIV
Velogénico	Menor de 60	1.5 - 2.0	2.0 -3.0
Mesogénico	60 – 90	1.0 – 1.5	0.0 – 0.5
Lentogénico	Mayor de 90	0.2 – 0.5	
Asintomático	Mayor de 90	0.0 – 0.2	

2.8. Patología

Inicialmente, el virus se replica en el epitelio de la mucosa de los tractos respiratorios y digestivos, para luego difundirse por vía hemática al bazo y médula ósea, produciendo la viremia secundaria y llegando a otros órganos blancos como el pulmón, los intestinos y el sistema nervioso central (Fenner, 1992).

2.9. Signos clínicos

Los signos clínicos que se observan en las aves infectadas con el vENC varían mucho y dependen de muchos factores distintos. Un factor importante es la variabilidad de la virulencia del virus. La ENC varía desde ser inaparente a una enfermedad grave, mortal. Aunque ninguno de los signos clínicos puede considerarse patognómico, parece que algunos síntomas se asocian a aislados particulares de la enfermedad de Newcastle. Esto ha hecho que el vENC se agrupe en cinco tipos patológicos basados en los signos predominantes en las gallinas afectadas (Alexander, 1995) estos son:

- Velogénico viscerotrópico: alta mortalidad, inflamación de los tejidos de alrededor de los ojos, diarrea sanguinolenta y lesiones hemorrágicas en el proventrículo y el intestino (Milano, Hertz 33, N.Y., Parrot 70181, Querétaro).
Velogénico neurotrópico: alta mortalidad después de signos respiratorios y nerviosos, caracterizados por paresia de las extremidades, las alas, ataxia, torticolis, movimientos en círculos y temblores (Texas GB).
- Mesogénico: signos respiratorios, en ocasiones signos nerviosos, tics de la cabeza (halcones), mortalidad de moderada a baja (Roakin, Komarov, Meekteswar, H).
- Lentogénico respiratorio: infección respiratoria leve o subclínica (Hitchner B1, Clon a 30, La sota, F).
- Entérico asintomático: infección entérica subclínica (Ulster 2C, MCIIO, V4).

El límite entre estos cinco grupos no está claro. En todas las especies de aves se producen solapamientos. La enfermedad aguda y subaguda asociada a cepas de virus mesogénico y lentogénicos es más

frecuente en los países desarrollados con industrias avícolas modernas (Fenner, 1992). La enfermedad en los pollos puede consistir en signos de depresión, diarrea y signos nerviosos como parálisis y torticolis. La producción de huevos puede disminuir o cesar por completo tras la enfermedad (Mayr, 1993). Se sabe que las cepas virulentas pueden replicarse en las aves vacunadas, pero los síntomas clínicos disminuyen considerablemente en relación con el nivel de anticuerpos alcanzado (Alexander, 1995).

La patogenia de la ENC también afecta a los humanos y los signos más comunes de la infección es la conjuntivitis que se desarrolla dentro de 24 horas después de ser expuesta a los ojos (Sánchez, 2016) infecciones reportadas no han sido amenazas de muerte y usualmente no debilitaban por lo general más de 1 o 2 días (Chang, 1981). En aves la severidad de los síntomas de la enfermedad se calculan de acuerdo a la prueba de índice de patogenicidad intracerebral (IPIC). Los virus entéricos asintomáticos generalmente presentan índices ligeramente muy bajos, los virus lentogénicos tienen índices de 0.6, los virus mesogénicos usualmente alrededor de 1.4 y los virus velogénicos entre 1.7 y 2. En la Unión Europea (CEE) los aislamientos de virales de la ENC mayores de 0.7 son considerados virulentos (Al-garib y otros, 2003).

2.10. Diagnóstico

Ninguno de los signos clínicos o lesiones del vENC pueden ser considerados patognomónicos, además la amplia variación de la enfermedad según la cepa viral, el huésped afectado y otros factores hacen que estos parámetros indiquen solo sospecha de infección con el vENC. De otro lado, debido a la presencia de cepas lentogénicas en aves en la mayoría de países y el uso casi universal de las vacunas vivas, la sola demostración de infección sin la determinación del tipo de virus

infectivo, es poco adecuada para implantar medidas de control. De ahí la importancia de las pruebas de diagnóstico definitivo (Icochea, 2007).

2.11. Control de la enfermedad

Bajo condiciones de campo, el factor más importante para prevenir la introducción del virus de la enfermedad de Newcastle (y su diseminación en caso de brote), son las condiciones como se crían las aves y el nivel de bioseguridad implementado (Alexander y Jones, 2003). Además de buenas práctica de manejo y una buena dosis de sentido común al momento de criar aves domésticas, la vacunación como medida profiláctica es una de las herramientas más útiles con las que cuenta el clínico, sin embargo, se requiere un profundo conocimiento de cómo funcionan los distintos tipos de vacunas disponibles para obtener un máximo aprovechamiento de las mismas y para que, como en muchos casos ocurre, no sea peor el remedio que la enfermedad. El diagnóstico, así como la caracterización biológica y molecular (genotipificación) de los virus circulando en nuestro medio es absolutamente necesario para cualquier intento de controlar la enfermedad. Si bien el diagnóstico presuntivo que se alcanza analizando los signos clínicos o muestras pareadas (suero de aves enfermas y aves convalecientes) constituye evidencia clara de la presencia de la enfermedad, el diagnóstico definitivo (que es el que se debe reportar a la OIE), debe ser hecho en base a aislamiento viral y/o análisis molecular para revisar si el aislamiento con los requerimientos para ser considerado como virus virulento de Newcastle. Recientemente, la detección molecular de virus de campo acompañada de la secuenciación directa de nucleótidos y la generación de secuencias predichas de aminoácidos permiten la genotipificación del virus. Los virus se agrupan en función a la secuencia de la proteína de fusión o de otras proteínas estructurales (Seal y otros, 2000).

2.12. Serología

La presencia de anticuerpos al vENC en pollos se detecta mediante pruebas serológicas. Los resultados de las pruebas se utilizan para dos propósitos.

1. Para evaluar la eficacia de la vacuna contra la enfermedad de Newcastle en los ensayos de laboratorio y de campo.
2. Para evaluar el nivel de los anticuerpos del virus de la enfermedad de Newcastle en el campo.

Hay dos ensayos comúnmente utilizados para llevar a cabo las pruebas serológicas para anticuerpos del virus de la enfermedad de Newcastle.

1. Inhibición de la hemaglutinación (IH). La prueba IH es un ensayo conveniente y de uso común que requiere reactivos baratos y es leído por el ojo.
2. ELISA (Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas) Este es un ensayo colorimétrico y requiere el uso de un instrumento sofisticado para leer la densidad óptica de las reacciones. Los kits de ELISA son utilizados para la detección de anticuerpos contra el virus de enfermedad de Newcastle. Las instrucciones detalladas se suministran con el kit. Por lo general son bastante costosos. (FAO, 2004).

2.12. Lesiones macroscópicas

En pollos infectados las lesiones prominentes se describen en el tracto gastrointestinal y son ocasionadas por patotipos velogénicos viscerotrópicos de la enfermedad de Newcastle (vvENC), observándose hemorragias en intestino, la cual se usa para distinguir el virus velogénico

viscerotrópico de la enfermedad de Newcastle (vvvENC) del virus velogénico neurotrópico. Se observan además, petequias y hemorragias en proventrículo y ciego con tendencia a la ulceración y necrosis, esto como resultado de la adhesión viral y daño al endotelio vascular (Alexander, 1998).

Se pueden observar hemorragias a lo largo del tracto gastrointestinal. Estas áreas hemorrágicas tienden a ulcerarse y conforme la enfermedad progresa pueden mostrar necrosis. Estas áreas son más comúnmente observadas en la unión del esófago y proventrículo, en las placas de Peyer, y las tonsilas cecales. Hay edema en los tejidos subcutáneos de la cabeza y el cuello. Las lesiones de la tráquea son comúnmente hemorrágicas sin que exista sangre libre en su luz. El examen postmortem de las aves de ornato muchas veces no muestra ninguna de estas lesiones o bien pueden no ser tan pronunciadas como las que se observan en las aves de corral (CDFA, 2012).

2.13. Lesiones microscópicas

La histopatología de las infecciones con el vENC es tan variada como los signos clínicos y las lesiones macroscópicas y se ve ampliamente afectada por los mismos parámetros. Adicionalmente a la cepa viral y al huésped, el método de infección también puede ser de mucha importancia. Por ejemplo, se demostraron cambios histopatológicos similares en tráqueas de pollos infectados por cepas lentogénicas o velogénicas por inhalación de aerosol. La mayor parte de las lesiones histopatológicas descritas en publicaciones se refieren a los cambios relacionados a patotipos virulentos, y existen varios reportes descriptivos o revisiones bibliográficas en varios órganos durante la infección. En resumen, los mayores cambios que suceden son los siguientes:

- En el sistema nervioso central se observan lesiones de una encefalitis no purulenta con degeneración neuronal, focos de células gliales, infiltración perivascular de linfocitos e hipertrofia de células endoteliales. Las lesiones son frecuentemente observadas en el cerebelo, médula y zona del cerebro.
- En el tracto intestinal las infecciones de formas virulentas del vENC se puede observar hemorragia y necrosis del tejido linfoide de las mucosas a través del tracto intestinal.
- En el tracto respiratorio superior el efecto sobre sus membranas pueden ser severas y estar relacionado con el grado de afección respiratoria. Las lesiones se pueden extender a través de toda la tráquea. Se pueden perder los cilios dentro de los dos días post infección. En la mucosa del tracto respiratorio superior se puede observar congestión, edema y una densa infiltración celular por linfocitosis y macrófagos, especialmente después de una exposición por aerosol. Algunas veces se observan lesiones proliferativas y exudativas en el pulmón. En pollos puede ocurrir edema, infiltración celular y un aumento en el grosor y densidad de los sacos aéreos (Mora, 2005).

2.14. Vacunación y Cepas vacunales

La vacunación es una herramienta fundamental y muy útil, sin embargo, por sí sola no es suficiente para el control de la enfermedad de Newcastle y debe estar acompañada de un buen manejo y de mucho sentido común en la cría comercial de aves domésticas. Se debe enfatizar que bajo ninguna circunstancia se puede visualizar la vacunación como una alternativa a las buenas prácticas de manejo y a la bioseguridad. Investigaciones recientes sobre la capacidad de las vacunas comerciales

de proteger contra un desafío con la cepa velogénica viscerotrópica causante del brote de la enfermedad de Newcastle ocurrido en California, USA en el año 2002, indican que bajo condiciones experimentales, una sola dosis de la cepa B1 viva o inactivada es insuficiente para proteger las aves contra un desafío directo o por contacto (Kapczynsky y King, 2005). En condiciones de campo, la realidad es que los esquemas de vacunación deben planificarse a la medida de cada integración, se debe tomar en cuenta el tipo de ave, la carga viral y el tipo de desafío.

Es vital poseer la mayor información posible sobre el virus que afecta la zona (caracterización biológica y molecular). Hasta ahora no ha sido demostrado que las diferencias en el genoma del virus de la enfermedad de Newcastle determinen variaciones importantes en los péptidos de reconocimiento antigénico y las pruebas serológicas con las que contamos no pueden determinar la presencia de “variantes” del virus de Newcastle, por lo que todos los virus de la enfermedad de Newcastle permanecen dentro de un mismo serotipo y en teoría los anticuerpos inducidos por cualquiera de las cepas utilizadas en la vacunación deben ser capaces de neutralizar los virus del campo. Sin embargo, estudios recientes, indican la posibilidad de mejorar la vacunación contra la enfermedad de Newcastle mediante la manipulación de la composición antigénica de las vacunas utilizadas (Miller y otros, 2007). Estos estudios indican una asociación positiva entre la proteína HN utilizada para la vacunación y los niveles de anticuerpos en una prueba cruzada de inhibición de la hemoaglutinación (IH) en aves desafiadas con un antígeno homólogo e indican que incrementar la similitud entre el virus vacunal y el de desafío puede mejorar la respuesta humoral y disminuir los niveles de diseminación del virus.

Las cepas B1 y cepa la Sota son las más utilizadas y se replican en el aparato respiratorio produciendo respuesta inmune local y humoral.

La cepa la Sota induce una rápida inmunidad aunque tiene mayor potencial de causar enfermedad respiratoria por ser una cepa más invasora, por lo tanto, no se recomienda como primera vacuna, pero si como una revacunación en aves vacunadas previamente con la cepa B1 para aumentar la respuesta inmunitaria. Por otra parte, la cepa B1 es considerada como una cepa de baja agresividad o patogenicidad, induciendo una protección más lenta y menor que la obtenida con la cepa la Sota. Las cepas clonadas, que derivan de cepas lentogénicas como la Sota, producen una reacción incluso menor que la cepa B1 y por lo tanto uno menor inmunogenicidad (Mora, 2005).

2.15. Tipos de vacunas

Existen dos tipos principales de vacunas disponibles en la avicultura:

1. Las vacunas vivas atenuadas son ampliamente más utilizadas, que pueden ser administradas a las aves utilizando técnicas que son prácticas dentro de las limitaciones del medio ambiente de producción. Esto se realiza mediante la aplicación en el agua de bebida o por aerosol (spray), aunque algunas vacunas a virus vivo requieren de su aplicación individual, vía gota ocular o su administración por inyección. Se utilizan cepas lentogénicas, de tropismo respirotópico o dual, y de uso en pollos de engorde, ponedoras comerciales y reproductoras. Lo más importante es que permite las combinaciones de antígenos, por ejemplo las ampliamente utilizadas vacunas contra Newcastle – Bronquitis.
2. Las vacunas inactivas son generalmente, empleadas en aves reproductoras o ponedoras y requieren de una administración individual por inyección. Todas las vacunas contienen algún tipo de

adyuvante para optimizar la respuesta inmunológica del antígeno. Los adyuvantes comúnmente utilizados incluyen aceites minerales e hidróxido de aluminio. Se realiza en países con brotes de Newcastle muy virulentos.

En la ENC la vacunación tiene un papel fundamental para su control (Czegledi y otros, 2003) y aunque se producen altos títulos de anticuerpos en las aves inmunizadas, la vacuna solo protege a las aves de las más serias consecuencias de la enfermedad pero no de la infección y excreción de virus que puede ocurrir a un bajo nivel (Alexander y otros, 1999).

2.16. Sistema Inmune frente a virus

Se ha demostrado que tanto la inmunidad celular como la humoral juegan un papel predominante en la respuesta del ave a la infección con el virus de la enfermedad de Newcastle (Al Garib y otros, 2003). La mayor parte de las vacunas lentogénicas son capaces de inducir anticuerpos que se correlacionan positivamente con protección. Sin embargo, la respuesta inmune humoral sistémica no es suficiente para una completa protección (Reynolds y Maraqa, 2000). La inmunidad mucosal representada por la producción local de inmunoglobulina A (IgA) en el epitelio respiratorio y digestivo, así como la estimulación de la inmunidad mediada por células (que sólo se genera luego de la replicación tisular del virus), son indispensables y sin duda el objetivo de la vacunación con virus vivo en aves jóvenes en presencia de anticuerpos maternos (Perozo y otros, 2008).

Ante el conocimiento que se tiene sobre vacunación, respuesta inmune y protección surge el interrogante ¿Por qué aparecen brotes de la enfermedad en lotes vacunados? La respuesta es que el nivel de

protección es el resultado de la conjunción de múltiples factores (vacunación no necesariamente equivale a protección). Los principales factores son: patogenicidad de virus de campo (velocidad de replicación y distribución tisular), calidad y manejo de la vacuna (cadena de frío, título, vía de aplicación) y las condiciones generales e individuales de las aves vacunadas (calidad sanitaria, estatus inmunológico, alimentación, etc.) (Fernández y otros, 2002).

La capacidad del ave de responder a la estimulación antigénica es uno de los factores que limita el éxito de un plan de vacunación. La presencia de agentes inmunosupresores (virales o de otra índole) condicionan la respuesta inmune innata (interferón α y γ) y la respuesta adquirida (humoral y celular) (Balamurugan y Kataria, 2006). Entre las entidades nosológicas inmunosupresoras de origen viral más comunes se encuentran: la enfermedad infecciosa de la bolsa y la anemia infecciosa aviar que afectan los linfocitos B y los linfocitos T, respectivamente. Estas enfermedades no le permiten a los linfocitos su maduración y un adecuado reconocimiento antigénico, lo que conlleva a un estado de inmunosupresión que impide al ave responder a antígenos vacunales o de desafío.

2.17. Esquemas de vacunación en pollos de engorde

Para la vacunación inicial contra el virus de la enfermedad de Newcastle, la vacuna de elección es aquella que induce una respuesta inmune protectora con un mínimo de reacciones respiratorias (Alexander, 2001). Las cepas con enterotropismo son capaces de proporcionar niveles alto de protección con escasas o nulas reacciones post vacunales (Nunes y otros, 2002). En Venezuela y como consecuencia del alto nivel de desafío presente durante los últimos años, la vacunación al día de edad con cepas que se replican tanto en el epitelio respiratorio como en el

digestivo (cepa VG/GA) o con cepas enterotrópicas asintomáticas (V4, Ulster), acompañadas de vacunas inactivadas en spray al día 1 y revacunaciones en campo con cepas respirotópicas más invasivas entre los 8 y 18 días de edad, es una práctica común que genera un buenos resultados (Botero, 2006). Para la utilización de vacunas oleosas al día de edad se han desarrollado productos para ser aplicados por las vías subcutánea o intramuscular en aves jóvenes, estas vacunas son más concentradas que las vacunas oleosas tradicionales. El efecto de la asociación positivas entre altas dosis y respuesta a las vacunas inactivadas ha sido claramente demostrado (Brugh y Siegel, 1978).

Esquemas cerrados de vacunación como el descrito anteriormente implican un estrés para los sistemas respiratorio e inmunológico de las aves. Debemos ser cuidadosos de evitar la sobreposición de estímulos antigénicos (poco tiempo entre las vacunaciones), que pueden sobrecargar el sistema inmune del ave e impedir una respuesta adecuada. Las vacunaciones después de los 21 días de edad con cepas menos atenuadas como La Sota, incrementan el riesgo de reacciones indeseadas y representan un desperdicio de los anticuerpos que se han creado en el ave con las vacunaciones iniciales, estos anticuerpos que pueden ser requeridos para controlar un desafío de campo. Por lo tanto no siempre se recomienda una tercera dosis en el campo en aves con ciclo productivo tan corto. Si bien las revacunaciones potencian la inmunidad (respuesta inmune secundaria) lo que se evidencia en un incremento de los títulos de anticuerpos (Al Garib y otros, 2003). Los beneficios de las revacunaciones están condicionados a la capacidad de respuesta inmunológica, un ave inmunosuprimida incapaz de responder adecuadamente a la vacunación inicial, no tiene las herramientas (linfocitos T y B memoria) para responder a vacunaciones secundarias, lo que debe ser considerado cuando se plantean dosis adicionales a nivel de campo en la situación de un brote. Si las aves no

responden a un plan de vacunación bien diseñado e implementado es necesario revisar los factores condicionantes antes mencionados (patogenicidad del virus de campo, manejo, calidad sanitaria, estatus inmunológico, etc.) que condicionan el éxito de la vacunación.

El status sanitario de un país, una zona o un compartimiento según el artículo 10.9.2 del código sanitario (OIE, 2016) para los animales terrestres respecto a la enfermedad de Newcastle podrá determinarse en función de los siguientes criterios:

1. La enfermedad de Newcastle es una enfermedad de declaración obligatoria en todo el país, existe un programa continuo de concientización sobre la enfermedad y todas las sospechas de presencia de la enfermedad notificadas son objeto de investigaciones en el terreno y, si procede, en un laboratorio.
2. Una vigilancia adecuada de la enfermedad permite demostrar la presencia de infección por el virus de la enfermedad de Newcastle en aves de corral a pesar de la ausencia de signos clínicos de la enfermedad; este objetivo puede alcanzarse gracias a un programa de vigilancia de la enfermedad de Newcastle acorde con los artículos 10.9.22 a 10.9.26.

Todos los factores que puedan contribuir a la presencia de la enfermedad de Newcastle y el historial de cada uno de ellos se toman en consideración.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución de la investigación

El experimento se realizó en los módulos de experimentación del Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (LPA – FMV – UNMSM), ubicada en el distrito de San Borja, provincia de Lima, durante el mes de junio del 2016.

a) Animales

- Se utilizaron 90 pollos de engorde machos de la línea Ross, provenientes del mismo lote de reproductoras y libres de enfermedades.
- Todas las aves fueron criadas en campo hasta el día 24 de edad y luego trasladadas al módulo experimental en laboratorio.
- Sólo se vacunaron aves pertenecientes a los tratamientos A y B.

b) Equipos de crianza

- Se usaron 3 baterías experimentales, cada una con 02 jaulas para una densidad de 15 aves por jaula.
- Cada batería contaba con disposición de comederos lineales y bebederos semi-automáticos.

c) Crianza y alimentación

- Se usó un alimento comercial de engorde cuya composición cumplió con los requerimientos nutricionales de los pollos, el cual fue administrado *ad libitum*.
- Se les suministró agua *ad libitum* y 12 horas diarias de luz artificial.

3.2. Instrumental y equipos

a) Para la toma de muestras de sangre

- Aguja hipodérmica descartable de 21G x 1”.
- Frascos estériles de vidrio de 3ml de capacidad con tapa de goma.
- Algodón.

b) Para la necropsia

- Tijeras y pinzas.
- Guantes desechables de látex.

c) Para la administración de inóculo de desafío

- Gotero para inoculación.

3.3. Diseño experimental

En la investigación se evaluaron 90 aves que fueron distribuidas en tres tratamientos experimentales, de 30 aves cada tratamiento.

Se siguió un programa de actividades establecido para el experimento, considerando que el desafío fue realizado al día 25 de edad de las aves, posteriormente todas las aves fueron evaluadas diariamente durante 10 días, se colectaron muestras de sangre para la evaluación de la respuesta serológica antes del desafío y al día 35 de edad.

3.4. Tratamientos

- Tratamiento A, 30 aves vacunadas y desafiadas, grupo experimental.
- Tratamiento B, 30 aves vacunadas no desafiadas, control negativo.
- Tratamiento C, 30 aves sin vacuna y desafiadas, control positivo.

3.5. Cepa de desafío

Al día 25 (edad del ave) se les administro a los tratamientos A y B vía ocular una dosis de 50 μ L de un inóculo conteniendo un virus velogénico de la ENC con un título de 10^6 DL₅₀ perteneciente al cepario del laboratorio de patología aviar de la UNMSM, obtenido de un brote de campo de la ENC, identificada como velogénica del genotipo XII con un IPIIC 1.92.

3.6. Vacunas utilizadas en el programa de vacunación

- **Vacuna viva:** Vacuna a virus vivo contra la enfermedad de Newcastle cepa VG/GA. cada dosis de vacuna contiene: virus de Newcastle (Cepa VG/GA) mínimo $10^{5.5}$ DL₅₀.
- **Vacuna inactivada:** (cada dosis de 0,2 ml) contiene virus de Newcastle – Tipo B1 cepa La Sota $10^{8.5}$ DL₅₀/dosis.
- **Vacuna viva B1B1:** Vacuna viva liofilizada contra la enfermedad de

Newcastle, cada dosis contiene Cepa B1, Tipo B1, Conteniendo mínimo $10^{5.5}$ DL₅₀.

3.7. Programa de vacunación evaluado

Las aves de los tratamientos vacunados utilizaron el siguiente programa de vacunación (Cuadro 3).

Cuadro 2. Programa evaluado con respecto a los días de vacunación.

Edad (Días)	Tipo de vacuna	Vía de aplicación
1	Viva (VG/GA)	Spray
	Inactivada (La Sota)	Subcutánea
	Viva (Cepa B1,tipo B1)(i)	Spray
14	Viva (VG/GA)	Spray

(i) Contiene también vacuna del virus de bronquitis infecciosa.

3.8. Parámetros evaluados

Posterior al desafío, todas las aves de los tres grupos experimentales fueron evaluadas en forma diaria durante 10 días consecutivos, registrándose los signos clínicos respiratorios, digestivos, nerviosos y mortalidad.

2.2.1. Signos respiratorios

Dentro de la evaluación de signos clínicos se consideraron conjuntivitis, depresión, estornudos y ronquera registrándose el porcentaje.

2.2.2. Signos digestivos

Se evaluó en porcentaje de presencia de diarreas verdosas de cada grupo experimental.

2.2.3. Signos nerviosos

Se evaluó la presencia de parálisis, tics nerviosos y tortícolis en porcentaje de cada grupo experimental.

2.2.4. Mortalidad

Se evaluó en forma diaria la mortalidad de las aves desafiadas durante los siguientes 10 días post desafío.

2.2.5. Evaluación serológica

Se colectaron muestras de sangre de todas las aves de los grupos A, B y C, antes del desafío (25 días de edad) y al 10° día posterior al desafío (35 días de edad), se evaluó el nivel de los anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle por la prueba de ELISA indirecta.

3.9. Análisis estadístico

Los títulos de anticuerpos se evaluaron estadísticamente mediante el test de Kruskal-Wallis.

IV. RESULTADOS

4.1. Signos clínicos

En el cuadro 4 se muestra el porcentaje de signos clínicos que han afectado a las aves de los tratamientos A, B y C diariamente. Donde se observa que al tercer día la conjuntivitis tuvo su pico más alto afectando al 63% del tratamiento A y al 77% del tratamiento C.

La depresión, en el tratamiento A, afectó al 67% de las aves al sexto día y en el grupo C, al tercer día afectó al 53%. La ronquera, afectó al 30%, al décimo día en los tratamientos A y C. las diarreas verdosas, se manifestaron en el 63% de las aves del tratamiento A y el 67%, en el tratamiento C. La parálisis, en el tratamiento A, se presentó al quinto día en el 20% de las aves y en el tratamiento C, al cuarto día en el 27% de las aves. Los tics nerviosos, se presentaron en el 17%, de las aves del tratamiento A y el 10% en el tratamiento C.

La tortícolis, en el tratamiento A, se presentó en el 7% de las aves y en el tratamiento C, en el 13% de las aves.

Las aves del tratamiento A y C presentaron todas las patologías clínicas, mientras que las aves del tratamiento B no presentaron ninguna sintomatología.

Cuadro 3. Signos clínicos (%)

Signos clínicos	Tratamientos	Días post inoculación									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Conjuntivitis (%)	A	17	50	63	23	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	27	63	77	33	0	0	0	0	0	0
Depresión (%)	A	0	10	27	33	63	67	50	33	23	23
	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	0	17	53	30	27	27	23	23	23	23
Ronquera (%)	A	0	0	0	3	10	13	17	23	23	30
	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	10	17	20	20	27	27	30
Diarreas Verdosas (%)	A	0	0	16	30	50	50	53	66	50	50
	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	30	43	50	60	73	80	75	80
Parálisis (%)	A	0	0	3	3	20	13	3	7	10	7
	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	17	27	17	13	13	10	7	7
Tics nerviosos (%)	A	0	0	0	0	0	0	17	13	13	10
	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	3	3	7	7	10	10
Tortícolis (%)	A	0	0	0	0	7	3	7	7	7	7
	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	13	3	7	13	10	10

n = 30

4.2. Mortalidad

La mortalidad, en el grupo experimental A, se inició el día 3 post reto (28 días de edad del ave) alcanzando su máxima mortalidad al día 6 post reto, representando el 20 % del total de aves (Cuadro 5). Todas las aves que murieron previamente presentaron severos signos respiratorios y nerviosos; las aves inoculadas sobrevivientes, fueron sacrificadas al día 35; fecha que finalizó el experimento. En el grupo control positivo se registró una mortalidad del 77%.

Cuadro 4. Mortalidad de los tratamientos durante la prueba

CUADRO DE MORTALIDAD													
Tratamientos	Días post inoculación										Mortalidad total		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	N=30	%=100	
A	0	0	1	1	2	6	0	4	0	1	15	50	
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
C	0	0	0	5	11	3	1	2	1	0	23	77	

4.3. Serología

En el cuadro 6, se muestran los promedios de los títulos de anticuerpos pre y pos desafío con el virus de la ENC. Los niveles de anticuerpos pre desafío de las aves correspondientes al grupo B, muestran títulos promedio significativamente más bajos a los de las aves de los tratamientos A y C. Después del desafío (Figura 1). Todos los tratamientos mostraron incremento en los niveles de anticuerpos contra ENC, siendo significativamente diferentes entre ellos ($P > 0.05$).

Cuadro 5. Niveles promedio de anticuerpos contra la ENC

Momento	Tratamientos			Valor de P
	A	B	C	
Pre desafío	303.63 a	52.90 a	101.73 a	0.0026
Post desafío	6989.67 a	653.20 b	12316.60 a	0.0001

Medias con una letra común en la misma línea, no son significativamente diferentes por la prueba de Kruskal Wallis ($P > 0.05$)

En el cuadro 7 se indica el incremento de los niveles de anticuerpos pre y pos desafío en los tres tratamientos, observándose que en los tres grupos, el incremento de los anticuerpos es altamente significativo.

Cuadro 6. Incremento de los niveles de anticuerpos contra la ENC

Tratamiento	Desafío		Valor de P
	Pre	Post	
A	303.63 a	6989.67 b	0.0001
B	52.90 a	653.20 a	0.0001
C	101.73 a	12316.60 b	0.0001

Medias con una letra común en la misma línea no son significativamente diferentes por la prueba de Kruskal Wallis ($P > 0.05$)

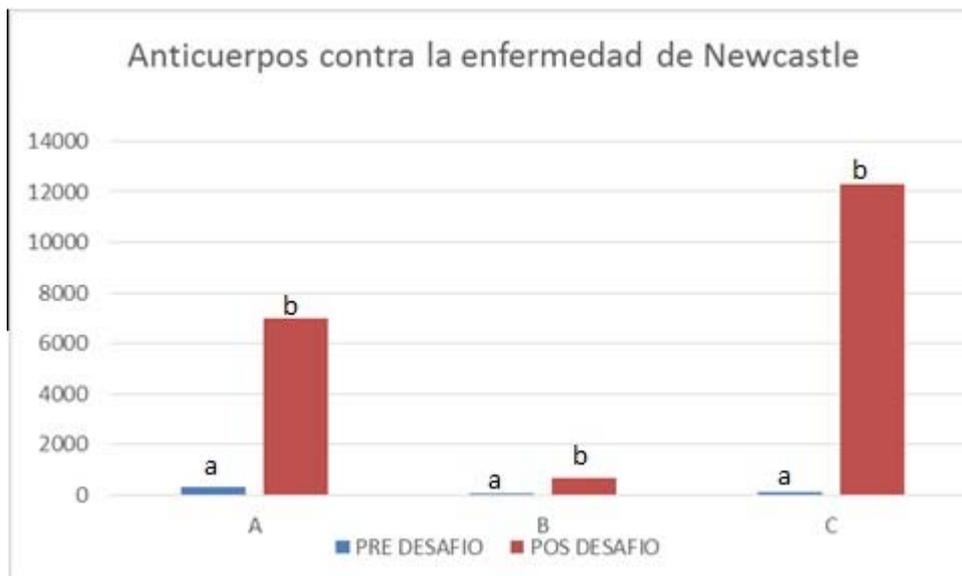


Figura 1. Incremento en los niveles de anticuerpos contra la ENC

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio, las aves de los tratamientos desafiados mostraron todos los signos clínicos de la enfermedad, siendo el tratamiento sin vacuna y desafiado, el que mayores manifestaciones presentó, sin embargo, las aves del tratamiento A (vacunado y desafiado) mostraron menor sintomatología de enfermedad; esto coincide con los estudios realizados por Miller y otros (2009) quienes mencionan que usando protocolos de vacunas podemos lograr una mayor protección y reducir las manifestaciones clínicas.

Referente a los signos clínicos nerviosos fueron similares a diferentes estudios descritos por Erickson (1979), Shivaprasad, (1991) y Alexander (1998) cuando inocularon vía ocular de manera experimental a diversas especies de aves las cuales presentaron opistótonos, caminata circular, depresión y parálisis siendo esta una sintomatología clásica previa a la muerte de animales con vvENC inoculados experimentalmente. Erickson (1979) y Shivaprasad (1991) no reportaron signos respiratorios como los encontrados en este estudio, indicando que los signos clínicos observados varían independientemente de si se trata de un brote natural o de una inoculación experimental, pues probablemente estas variaciones se deban a condiciones inherentes al virus, tipo de cepa viral, especie de ave afectada, ruta de infección, al estado sanitario del individuo y exposiciones previas al virus.

Respecto a la mortalidad, la protección mostrada por las aves vacunadas y desafiadas, medida como el porcentaje de aves sobrevivientes al desafío, llegó al 50%. Este porcentaje de protección difiere con el trabajo realizado por Chansiripornchai y Sasipreeyajan (2006), quienes lograron obtener porcentajes de protección de $65.57 \pm$

18.64 % en aves vacunadas con la Cepa B1 vía spray y una vacuna inactivada de adyuvante oleoso por vía subcutánea, y 88.57 ± 9.00 % en aves vacunadas con la cepa Ulster 2C vía spray y la vacuna IOAV(vacunas inactivadas adyuvadas en aceite) por vía subcutánea; ambos grupos vacunados al primer día de edad y desafiados a los 28 días de edad, edad simultánea a la edad de desafío del presente trabajo.

Referente a la serología después del desafío con vvENC, las aves vacunadas presentaron un promedio de títulos de 6989.67 y las aves no vacunadas presentaron un promedio de títulos de 12316.60, estos resultados coinciden en gran medida con el estudio realizado por Merino y otros (2012), quienes mediante la prueba de Elisa IDEXX, realizados a 4 tratamientos cada uno con su grupo control positivo post desafiados con el vvENC, hallaron un promedio en los tratamientos experimentales de 8003,12 y un promedio en los tratamientos positivos de 14546,25 post desafío, lo que nos indica que nuestras aves fueron infectadas y por ende manifestaron un proceso viral con una cepa vvENC incrementando sus títulos de anticuerpos.

VI. CONCLUSIONES

- Los títulos de anticuerpos protectivos proporcionados por las dos vacunas vivas y la vacuna inactivada contra el virus de la enfermedad de Newcastle, no fueron suficientes frente al desafío con una cepa velogénica de campo desarrollándose los signos clínicos y mortalidad.
- El programa de vacunación contra la enfermedad de Newcastle no fue eficaz al sólo conferir el 50% de protección en desafío experimental con una cepa velogénica de campo.

VII. RECOMENDACIONES

- Considerar un mayor tamaño muestral en estudios posteriores para establecer una mejor concordancia entre los resultados obtenidos en condiciones controladas con lo que se reporta y sucede en campo.
- Establecer otras pruebas complementarias a la serología para convalidación de los resultados e interpretación de los mismos como proteína C reactiva (PCR), inhibición de la hemaglutinación (IH).

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Aldous EW, Alexander DJ. 2001. Technical Review: Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1) *Avian Pathol.*, 30, 117–128.

Alexander, D. 2003. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. En: *Disease of poultry*. 11 edition. p. 63 - 87. Iowa state University press. Iowa – USA.

Alexander DJ. 1995. Newcastle disease: methods of spread. In *Newcastle disease* (D.J. Alexander, ed.). Kluwer Academic Publishers, Boston, p 257-272

Alexander D.J. 1998. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. In: *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens* 4th edition. Edited by D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson and W.M. Reed. American Association of Avian Pathologists: Kennet Square. p 156-163

Alexander DJ, Banks, J, Collins, MS, Manvell RJ, Frost, KM, Speidel E.C and Aldous EW 1999. Antigenic and genetic characterization of Newcastle disease viruses isolated from outbreaks in domestic fowl and turkey in Great Britain during 1997. *Vet. Record*, p 145:417-421.

Alexander DJ. 2001. Newcastle Disease. *Brit. Poultry Science*.42:5-22.

- Alexander, DJ. 2003. Newcastle Disease and Other Avian paramyxoviruses Infections. En: Diseases of Poultry, Cap 2.11° Edition. Staff, Barnes, Glisson, Fadly, Mc Dougald, Swayne (eds.). AAAP Iowa State University-USA. p. 63-68
- Alexander DJ and Senne D. 2008. Newcastle Disease. En: A Laboratory Manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens, 5th ed. Dufour-Zavala; Swayne, D.; Glisson, J.; Pearson, J.; Reed, W.; Jackwood, M.; Woolcock, P. (eds.) AAAP. USA. p. 135-141.
- Al-Garib SO, Gielkens ALJ, Gruys E. and Koch G. 2003. Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination. World's poultry science journal 59: p. 185-200.
- Balamurugan IV and Kataria J. 2006. Economically Important Non-oncogenic Immunosuppressive Viral Diseases of Chicken. Current Status Veterinary Research Communications.30:541-566.
- Botero L. 2006. Experiencias de campo en el manejo y control de cepas altamente patógenas de la Enfermedad de Newcastle. Memorias del XI Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar. 22-26 mayo. Athens. Georgia. USA.
- Brugh JR and Siegel HS. 1978. Inactivated Newcastle Disease Vaccines: Influence of Virus Concentration on Primary Immune Response. Poultry Science. V. 57. p. 892-896.

- Capua I, Alexander DJ. 2009. Ecology and epidemiology of Newcastle disease. In: Avian influenza and Newcastle disease: A field and laboratory manual, Capua I and Alexander DJ (eds). SpringerVerlag Italia, Milan, Italy, p. 110
- Calnek B.W. 2000 Enfermedades de las aves. Segunda edición. Editorial Manual Moderno. p. 19-20
- CDFCA. 2012. California department of food and agriculture: p.1-5 Link: [en línea]
(https://www.cdfa.ca.gov/ahfss/Animal_Health/pdfs/V_V_N_Dspanish.pdf)
- Chang PW. 1981. Newcastle disease. In: CRC Handbook Series in Zoonoses. Section B: Viral Zoonoses Volume II, Beran G.W., ed. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA, p. 261-274.
- Chansiripornchai, N y Sasipreeyajan, J. 2006. Efficacy of live B1 or Ulster 2C Newcastle disease vaccines simultaneously vaccinated with inactivated oil adjuvant vaccine for protection of Newcastle disease virus in broiler chickens. Acta Veterinaria Scandinavica 2006, 48:2.
- Comotto, G.E. 2000. Enfermedades de las aves. p. 106-113. Imprenta Zagazeta S.R.L tda. Lima –Perú.
- Cortez S. 1970. Estudio retrospectivo de las principales enfermedades diagnosticadas en el laboratorio de patología aviar durante 1956-1969. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima.

- Cuello y otros. Revista científica electronica REDVET 2011 Link [en línea].
<https://issuu.com/veterinaria.org/docs/n060611>
- Czegledi A, Wehmann E, Lomniczi, B. 2003. On the origins and relationships of Newcastle disease virus vaccine strains Hertfordshire and Mukteswar and virulent strain Herts'33. Avian Pathol., 32(3): p. 271-276.
- Erickson, GA, Brugh y C.W. Beard. 1979. Viscerotropic velogenic Newcastle disease in pigeons: Clinical disease and immunization avian disease. 24:257-267.
- FAO, 2004. A technology Review: Newcastle Disease with special emphasis on its effect on village chickens. Animal Production and Health FAO Rome 2004 Link [en línea] FAO. (<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y5162e/y5162e00.pdf>)
- Fenner F. 1992. Virología Veterinaria. Ed. Acribia S.A. Zaragoza España p 503-514.
- Fernandez R, Sol J and Ramírez A. 2002. La Enfermedad de Newcastle, Control y Experiencias de campo. Memorias del I Seminario de Patología Aviar. Maracaibo 20 y 21 de Octubre. Venezuela. 25-28 pp.
- Ferrer r. y otros 2008. Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de newcastle en *gallus gallus* de lima. Estudio de caso-control. rev inv vet Perú. 19 (1): p. 67-74.
- Gherzi B. 2011. Presencia del virus de la enfermedad de Newcastle en las aves silvestres de los humedales de Puerto Viejo. Tesis para optar título de Médico Veterinario. FMV. UNMSM. Lima, Perú.

- Inga E. 1991. Análisis estadístico retrospectivo de las principales enfermedades diagnosticadas en el laboratorio de patología aviar en los últimos diez años. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario. FMV - UNMSM, Lima.
- Icochea D. 2007. Relación entre aves silvestres y la Enfermedad de Newcastle en el Perú. Tesis de Magíster. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 71 p.
- Jindal, N, Chander, Y, Chockalingam AK, Abin M, Redig PT, SM Goyal. 2009. Phylogenetic analysis of Newcastle disease viruses isolated from waterfowl in the Upper Midwest Region of the United States. *Virology* 6: 191 p.
- Jordan FTW. 1990. Paramyxoviridae (Newcastle disease and others). En: *Poultry Diseases*. Edtion. Bailliere Tindal: Londres. p 121- 136.
- Kaleta EF, Baldauf C. 1988. Newcastle disease in free-living and pet birds. In: Alexander DJ (ed). *Newcastle Disease*. Boston, USA: Kluwer Academic Pub. 197-246p.
- Kaleta EF *et al* Heffels-Redmann U. 1992. Proc. Commission of the European Communities workshop on avian paramyxoviruses, 27-29 July, Rauschholzhausen, Germany. Institut für Geflügelkrankheiten, Giessen, 391 p.

- Kapczynsky DR, King DJ. 2005. Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine*. May 16; 23 (26): 3424- 33.
- Lamb RA, Collins PL, Kolakofsky D. 2005 Family Paramyxoviridae. In Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J et al (eds) *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier, San Diego, p 655-668.
- Maguelonne Toussaint-Samat. 2009. (Anthea Bell, translator) *The History of Food*, Ch. 11 "The History of Poultry", revised. 306 p.
- Manual de pollos Ross. 2010, Manual de manejo de pollo Ross pp 100
Link [en línea]
(http://es.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_TehDocs/Manual-del-pollo-Ross.pdf)
- Marangon S, Busani L. 2007. revue scientifique et technique de l'OIE, Vol. 26 n°1, p.265-274.
- Martins P. 2003. Impacto económico de las enfermedades avícolas de la lista "A" de la OIE. En: II Seminario Internacional Influenza Aviar y Enfermedad de Newcastle: Estandarización de criterios sanitarios para el comercio. Grupo Interamericano de Coordinación en Salud Animal. 13-15 de agosto. Lima-Perú.
- Mayr A. 1993 rolle/mayr medizinische mikrobiologie, infektions- und seuchenlehre, Ferdinand Enke, stuttgart p.407-411.

- Merino Ruben, Dueñas David, Soto Andres, Flores Hector, Lechuga Mario. 2012 evaluation of recombinant HVT NDV vaccines in laying hens experimentally challenged with the Mexican NDV virulent Chimalhuacan strain. Avian Department of Medicine and Zootecnia, FMVZ, UNAM, Mexico City, p 33.
- MINAGRI. 2012. Ministerio de agricultura. 12 de octubre del 2012 Lima Link [En línea] (<http://minagri.gob.pe/portal/noticias-antteriores/notas-2012/7635-politica-agraria-competitividad-campo>)
- Miller PJ, King DJ, Alfonso CL and Suarez DL. 2007. Antigenic differences among Newcastle diseases virus strains of different genotypes used in vaccines formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine* 25: 7238-7246.
- Miller PJ, Decanini Eduardo, Afonso Claudio. 2009 Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Volumen 10 issue 1 pages 26 – 35.*
- Mora, Ch. 2005. Enfermedad de Newcastle. Tesina para optar el grado profesional de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima-Perú.
- Nunes J, Vasconcelos y Jorge M. 2002. Comparative morphometric analysis of vaccinal virulence of some lentogenic strains of Newcastle disease virus in tracheas of SPF chickens. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 54. 335-339.
- Panda A, y otros (2004). Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microbial Pathogenesis*, 36(1):1-10.

- Perozo F, Villegas P, Dolz R, Alfonso CL y Purvis LB. 2008. The VG/GA strain of Newcastle Disease virus: mucosal immunity, protection against lethal challenge and molecular analysis. Accepted by Avian Pathology.
- Ramon, M. 2013. Etnobiología, El conocimiento de la gallina (*Gallus gallus domesticus*) entre los tsetales y tsotsiles de los altos de Chiapas. vol 11 n°1 Mexico p.29 Link [en línea] (<http://asociacionetnobiologica.org.mx/aem/wp-content/uploads/Etnobiologia-11-1-.pdf>)
- Reynolds DL and Maraqa AD. 2000. Protective Immunity against Newcastle Disease: The Role of Cell-mediated Immunity. Avian Diseases. V. 44.p. 145-154.
- Sánchez S, 2016. Food safety risks from wildlife, challenges in agriculture, conservation and public health, M. Jay-Russell, M.P. Doyle (eds.), Springer International Publishing Switzerland, Public Health concerns. p 108-109.
- Shivaprasad, H. 1991. Paramyxovirus – 1 infection in the domestic pigeon. Proceeding of the Western Poultry Disease Conference. 40:256
- Seal BS, King DJ and Mannesmann RJ. 2000. Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. Virus Res. 66:1- 11.
- Steel, J; Burmakina, S; Thomas, C; Spackman, E; García-Sastre, A; Swayne, D; Palese, P. 2008. A combination in - ovo vaccine for avian influenza virus and Newcastle disease virus. Vaccine (2008) 26, 522—531.

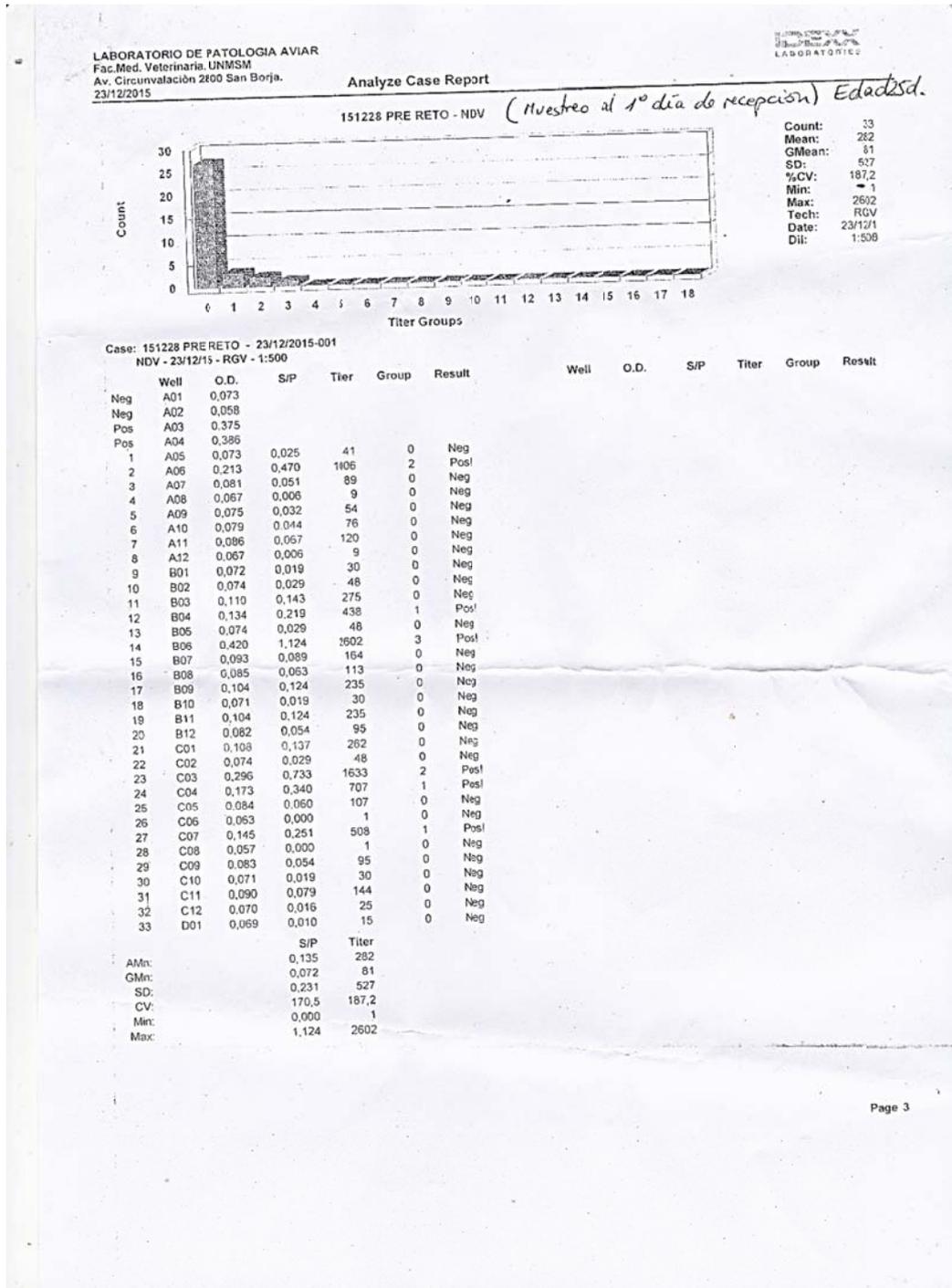
- OIE. 2007. Código Sanitario para los animales terrestres, Capitulo 10.13. Infección por el virus de la enfermedad de Newcastle artículo 10.13.3. OIE 2007 Link [en línea] OIE. (http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2010/es_chapitre_1.10.13.htm)
- OIE. 2008. Manual Sanitario de la Enfermedad de Newcastle Capitulo 2.3.14 Enfermedad de Newcastle OIE. 2008 Link [en línea]: OIE (http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.03.14.%20Enfermedad%20de%20Newcastle.pdf)
- OIE. 2016. Código Sanitario para los animales terrestres, Capitulo 10.9. Infección por el virus de la enfermedad de Newcastle artículo 10.9.2. OIE. 2016 Link [en línea]: OIE, (http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre_nd.htm)
- Senasa Argentina. 2004. Manual de procedimientos enfermedad de Newcastle de SENASA Argentina 2004 Link: [en línea]: SENASA, (http://www.aviculturaargentina.com.ar/sanidad/manual_newcastle.pdf)
- Telbis C, Neumann U, Siegmann D. 1989. Vorkommen von paramyxoviren bei wildvögeln: epizootiologische Aspekte, Eigenschaften in vivo und in vitro. *Journal of veterinary Medicine B36*: p. 203-216.
- Xiang H, Gao, J Yu, B Zhou, H Cai, D Zhang and Zhao X. 2014. "Early Holocene chicken domestication in northern China". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (49): p.17564–17569.

Villegas, P; Avellaneda, G. 1995. Enfermedad de Newcastle. En: II Seminario Técnico Avícola – Simposio de Salmonella enteritidis, 6-19 de mayo. Santa Cruz Bolivia. 161-165.

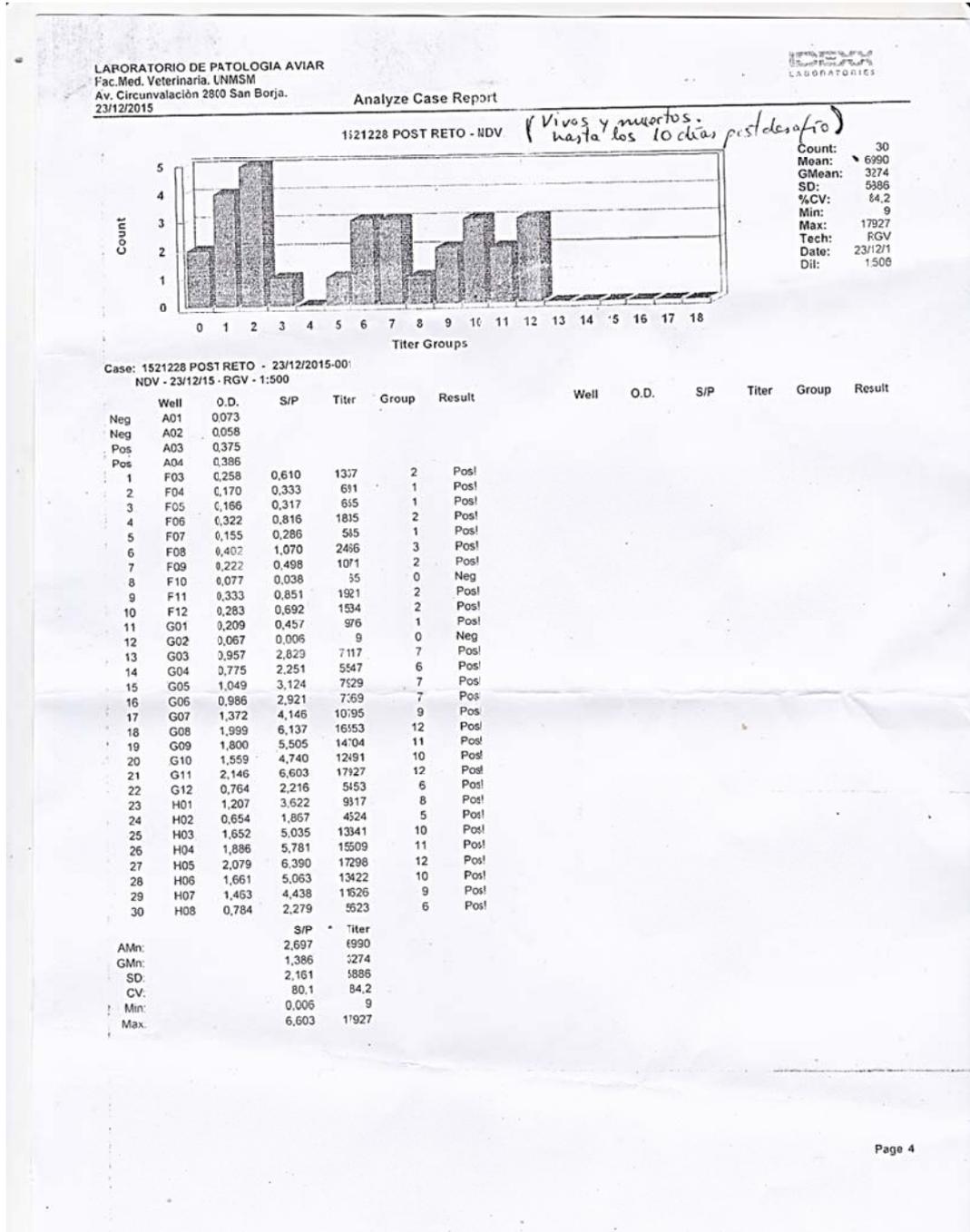
Angulo, 2013. Internet: Revista Virbac (Trimestral) (Enrique Ángulo) Link [En línea]
<http://www.webveterinaria.com/virbac/news16/aves.pdf>.

ANEXOS

Anexo 1. Títulos de anticuerpos por Prueba de Elisa Indirecto tratamiento A (pre reto)



Anexo 2. Títulos de anticuerpos por Prueba de Elisa Indirecta tratamiento A (post reto)



Anexo 3. Baterías que almacenan aves para experimentos



Anexo 4. Toma de muestras de sangre Pre desafío

