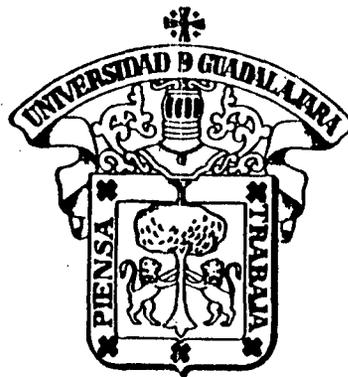


# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



COMPORTAMIENTO DE LA VACUNA VIRUS MUERTO EMULSIONADA DE NEWCASTLE  
CEPA KANSAS-MANHATTAN EN POLLOS DE ENGORDA DESAFIADOS CON  
CEPAS PATOGENAS DE NEWCASTLE

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

HUGO BERNALES CASILLAS

ASESOR

M.V.Z. FABIAN UVIÑA LUNA

GUADALAJARA, JALISCO 30 DE SEPTIEMBRE DE 1988

A Dios

cualquiera que sea su definición.

A mis padres

Salvador y Consuelo

A mis abuelos

Arturo y Francisca

A mis hermanos.

A mi esposa Ma. de la Paz  
por sus desvelos y apoyo.

A mis amigos y compañeros

Fermin.

Oscar.

Jose.

Salvador.

Dana.

Lourdes.

Ernestina.

Isidro.

Roberto.

Fausto.

Jose Ma.

A mi asesor

M.V.Z. Fabian Uviña Luna.

Al Q.B.F. J. de Jesus Illescas Castillo,  
persona que nos proporciono la vacuna y  
la ayuda necesaria para la elaboración  
del presente trabajo.

Al amigo y maestro

M.V.Z. Pedro Moran Duran,  
que colaboro en gran medida  
a mi formación profesional.

A mi amigo y compañero

M.V.Z. Saturnino Nava Arechiga

Al H. JURADO.

A MIS MAESTROS Y COMPANEROS

DE TODOS LOS GRADOS.

## INDICE .

CONTENIDO	PAGINA
I) INTRODUCCION	1
II) OBJETIVO	18
III) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
IV) HIPOTESIS	21
V) MATERIAL Y METODO	22
VI) RESULTADOS	24
VII) DISCUSION	28
VIII) CONCLUSIONES	30
IX) SUGERENCIAS	31
X) SUMARIO	32
XI) BIBLIOGRAFIA	33

## INTRODUCCION.

La enfermedad del Newcastle (ENC) es uno de los mayores - problemas que enfrenta la avicultura, por ser ésta enfermedad capaz de producir una alta mortalidad y disminución drástica en la producción de huevo. Muchas áreas de producción avícola del mundo se han visto amenazadas en años recientes por severas - epizootias de ENC del tipo velogénico. Esta enfermedad tiende a tornarse endémica una vez introducida en determinada área. En México la ENC tiene carácter enzootico (8,11,32,46,56).

Esta enfermedad es una infección viral aguda de fácil diseminación que afecta tanto a las aves domésticas como a las salvajes y de jaula (7,26,29,41,74). También puede afectar al ser humano expuesto al virus de la ENC (VENC) (vacunadores y gente de laboratorio) produciendo una infección que es usualmente persistente uno o dos días y eventualmente se vuelve severa pudiendo conducir a una disminución en la visión (7,13,26,41), así mismo se han reportado casos leves tipo influenza causados por el VENC en el hombre, encontrándose en él títulos bajos de anticuerpos (Ac's) - 8 a 54 HI - contra el virus, lo que demuestra la presencia de éste en el organismo (36).

La infección por el VENC se caracteriza por signos y lesiones respiratorias, digestivas y nerviosas en las aves (41,58). En pollos susceptibles se han reportado mortalidades hasta de un 100% (8,15,22), sin embargo la mayor parte de las veces la mortalidad es menor (56) siendo el problema los animales sobrevivientes debido a que pueden quedar "retrasados" y convertirse en animales de desecho (7,13), interrumpir la producción de hue

ve (16) • predisponer a la enfermedad crónica respiratoria complicada (ERCC), por ello las pérdidas económicas a causa de ésta enfermedad son altas (2,62,72).

#### HISTORIA.

La primer descripción de la ENC fué realizada por Kraneveld en 1926 de un brote ocurrido en la isla de Java, en las que fueron las Indias Holandesas orientales, hoy república de Indonesia. Doyle en 1927 describe detalladamente un brote de ésta enfermedad en una granja cercana al pueblo de Newcastle en Tyne (1,22, 26,38,56) ubicado en la costa noreste de Inglaterra y próximo a la frontera con Escocia (27). De ésta población toma su nombre la enfermedad. Este mismo año se reportan casos en la India, Ceylán y Filipinas. De 1926 a 1940 todos los casos graves de la ENC se reportan en/• cerca de los puertos (22), en 1944 se reporta la ENC en los E.U.A. (7,44) aunque ya había sido descrita en 1931 en ese país (13). En México la primera epizootia fué en Julio de 1946 (Téllez, Girón y Camargo), en su tesis profesional Olvera (1948) reporta una mortalidad de 300,000 aves tan sólo - en el D.F. (13,22,37,48).

#### ETIOLOGIA.

El agente causante de la ENC es un virus tipo RNA que está clasificado de la siguiente manera:

Familia: PARAMIXOVIRIDAE

Género: PARAMIXOVIRUS

Especie: VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE.

Esta clasificación es de acuerdo a la presentada por Matthews en 1979 (39).

La palabra mixovirus es una palabra griega que significa - descarga de baba mucosa • nasal, son virus que muestran una afi

nidad hacia materiales mucosos como los que hay en el tracto superior de aves y mamíferos (56).

La forma del VENC es más o menos esférica, aunque son comunes las formas pleomórficas. Las partículas típicas virales tienen un diámetro de 100 a 300 milimicrones (1). Este virus es estable, sobrevive durante 30 minutos a 56°C y conserva su capacidad infectante a 4°C. Este virus puede ser muy resistente si está protegido por proteínas, moco, sangre, etc., puede permanecer en las instalaciones avícolas por varias semanas o meses - (29,44,68).

El virus está presente en el aire exhalado, en descargas respiratorias, en heces, en huevos puestos durante la enfermedad clínica y en todo el cadáver durante la infección aguda y muerte del ave. La vía de infección natural es la respiratoria aunque también puede penetrar por vía oral y conjuntiva (se transmite por agua y alimento). Sin embargo en el aparato respiratorio el virus se replica antes de pasar a los sistemas por los cuales tiene afinidad. Generalmente el VENC se puede aislar en tráquea y cloaca (14,29,46).

El virus de la ENC que regularmente no infecta ni se replica en las células del sistema inmunológico puede también provocar inmunosupresión (60). Esta inmunosupresión que se observa en la ENC podría deberse a la acción de la neuramidasa viral en las membranas de los linfocitos, con lo cual se modificaría la circulación de los linfocitos en los órganos linfoides (69). Este virus es potente inductor de interferón (6,8,44,61).

Este virus es capaz de adherirse a los glóbulos rojos de diversas especies animales (56) lo que se manifiesta como hemoadsorción y hemoaglutinación (7,33) propiedades que tiene por

contener en la envoltante una franja de mixevirus compuesta de hemoaglutinina y proteina neuromidásica (22,44), también aglutina el VENC espermatozoides (56).

Factores como la concentración de amoníaco a 50 ppm. favorecen el grado de infección por el virus de ENC siendo el doble que en aves no expuestas a ésta concentración de amoníaco, debido al daño de la membrana mucosa del tracto respiratorio por el amoníaco (47).

No existen diferencias antigénicas entre las distintas cepas pues sólo se ha identificado un serotipo, lo que varía entre cepas es su grado de patogenicidad (1,22,69) y el cual se ha clasificado de acuerdo a lo que tarda en matar al embrión de pollo de un día de edad inculado por vía intracerebral con una dosis mínima mortal (IDMM) (56), en tres tipos:

VELOGENICAS: 24 a 48 hrs.

MESOGENICAS: 48 a 96 hrs.

LENTOGENICAS: 96 a 120 hrs. (1,26,41,56).

El periodo de incubación de la ENC es de 3 a 4 días en cepas velogénicas, de 5 a 6 días en cepas mesogénicas y de 2 a 3 semanas en cepas lentogénicas (68). Se puede decir que el periodo de incubación es en general de 2 a 15 días (44). La severidad de la enfermedad está dada primariamente por la cepa infectante del virus.

Otra clasificación dada a las cepas del VENC ha sido de acuerdo a los lugares de alojamiento del virus en el organismo y que son:

PNEUMOTROPICOS

VISCEROTROPICOS

NEUROTROPICOS (1,22).

### PATOTIPOS PRINCIPALES.

Cinco patotipos son los conocidos de ENC: Doyle, Beach, Hitchner, Beaudette y Avirulenta Entérica (26). En México sólo reportan 4 patotipos principales: (33)

#### TIPO DOYLE:

Este patotipo fué el primeramente reportado en el año de 1927. Es el más común en México, especialmente en el noreste, centro y sureste. Es letal para aves de cualquier edad. También es conocido como viscerotrópico; presenta signos respiratorios y nerviosos. Es producido por cepas velogénicas como la Ixtapalapa, Querétaro y C.U., Chimalhuacán entre otras (5,26,51).

#### TIPO BEACH:

Este tipo fué descrito, 15 años después que el Doyle, en 1942 por Beach. Presenta signos respiratorios y nerviosos. Se presenta en aves de todas las edades, también es causada por ciertas cepas velogénicas de Newcastle como son G.B. Texas y California 11914 (26,31,51,66).

#### TIPO BEAUDETTE:

Fué descrito en 1946 por Beaudette y Black. Es una severa infección respiratoria que produce lesiones nerviosas. Sólo es fatal en animales menores de cuatro semanas y de vez en cuando en aves adultas. Es producida por virus de tipo mesógeno. Algunas de éstas cepas son utilizadas como vacunas viables v.gr.: la Roackin (26,29,33,51).

#### TIPO HITCHNER:

Fué descrito por Hitchner y Johnson en 1948. Causa un problema respiratorio y no presenta signos digestivos ni nerviosos. Difícilmente produce mortalidad en aves sanas. Puede desencadenar problemas de ERCC en aves infectadas por mycoplasma. Es producida por cepas lentogénicas como la Sota y B<sub>1</sub>. Se usan la

mayoría de éstas cepas como vacunas (26,33,51).

La ENC ha sido uno de los frenos al desarrollo de la avicultura en México debido a que desde sus inicios a mediados de la década de los 50's la industria avícola mexicana ha tenido que soportar los embates de ésta infección (que apareció una década anterior a la industria avícola) (34,64,70).

#### CONTROL DE LA ENC.

En países desarrollados como Canadá, E.U.A. e Inglaterra el tipo Doyle ha sido erradicado (33). Esto ha sido resultado de estrictos programas de erradicación, destinando grandes recursos económicos al pago de indemnizaciones a avicultores y técnicos que trabajaran en el control de la enfermedad (22). En nuestro país sólo contamos con la utilización de medidas sanitarias y programas de vacunación, gracias a ello ha disminuído notablemente la ENC (16,62,70).

La base para la obtención de una producción óptima con el mínimo de problemas infecto-contagiosos se encuentra definitivamente en las medidas higiénico-sanitarias que se adoptan en las explotaciones avícolas, sin importar su función zootécnica. Las medidas sanitarias tendientes al control de la ENC son importantes para excluirlas de las parvadas. Las medidas que es posible aplicar comprenden la limpieza y desinfección del pabellón, cambio de cama, aplicación de medidas de seguridad para impedir la introducción de la infección a los locales y la ventilación del pabellón. Todo ésto diluye el número de unidades infecciosas en circulación (24,26,65).

Otra base para el control de la ENC lo constituyen la inmunización y los adecuados programas de vacunación. Muchas de las fallas que se han tenido en el manejo de ésta enfermedad han

sido por no organizar debidamente (veterinarios y avicultores) programas preventivos basados en la correcta aplicación de vacunas y tiempos de aplicación (calendarios de vacunación) (4). Hay factores que influyen en las respuestas inmunológicas:

- el huésped
- la edad
- anticuerpos maternos
- método de administración
- vacuna (17).

Para llevar a cabo un calendario de vacunación hay que tomar en cuenta los siguientes puntos (18):

- 1.- la secuencia de las vacunaciones
- 2.- interferencia entre las distintas vacunas
- 3.- el tiempo necesario para el desarrollo de la inmunidad
- 4.- la duración de la inmunidad y la exposición al virus de campo
- 5.- diferencias de la enfermedad en los distintos organismos
- 6.- la respuesta inmune de los organismos
- 7.- manejo de todos los factores que influyen en los resultados de un particular calendario de inmunización.

La vía de administración tiene un efecto marcado sobre la protección e incidencia de la ERCC en pollos infectados con mycoplasma. La aplicación puede ser de dos tipos: individual y masiva, la protección individual suele ser mejor pero es poco práctica, la masiva es más práctica pero no provee niveles uniformes de Ac's (18,72).

La cepa particular del virus vacunal puede afectar el programa de vacunación; algunas cepas estimulan la alta producción de Ac's (640 a 2,560 HI) y otras cepas un bajo título que va de

10 a 40 HI (29). En general una cepa vacunal más virulenta puede estimular fuertemente la inmunidad a diferencia de otras cepas de ésta enfermedad menos virulentas, esto es porque difieren en su inmunogenicidad y su habilidad para causar una reacción vacunal (7,8;18,29).

Se han utilizado todo tipo de programas de vacunación que van desde la utilización del método simultáneo virus vivo-virus muerto, hasta la inmersión de la cabeza del ave en la vacuna. Todos los sistemas funcionan mientras no exista la exposición de campo. Hay programas que provocan un Newcastle clínico en la parvada o matan más por complicaciones postvacunales que por el Newcastle mismo (45).

#### TIPOS DE VACUNAS CONTRA ENC.

Desde su aparición la ENC ha suscitado un intenso estudio de las cepas del VENC para poder fabricar vacunas confiables y se han encontrado cepas muy inmunógenas pero altamente patógenas (12,18,37). Actualmente se cuenta con cinco tipos de vacunas contra la ENC (42):

##### 1.- VACUNA TCND:

Esta vacuna se desarrolló en los 60's, es producida en riñón de cerdo y produce una inmunidad duradera. No produce títulos de HI.

##### 2.- VACUNA TSND:

Actualmente se encuentra en investigación, se desarrolla entre 34 y 41°C. Sólo se produce en tracto respiratorio superior y produce inmunidad local. Esta vacuna puede revertir su virulencia.

##### 3.- VACUNA CLONADA:

Produce poca reacción, protege contra una gama estrecha de antígenos, aunque según Monte (45) es una vacuna que puede ser

muy útil por su baja reacción en comparación con otras cepas - como la Seta, ya que no produce los efectos negativos de éstas.

#### 4.- CEPAS LENTOGENICAS:

Son las más usadas. Son de éste tipo la Seta y la B1.

#### 5.- CEPAS MESOGENICAS:

Se usan como refuerzo en muchos países, pertenecen a éste grupo las cepas Reackin, Komarov, Kimber, MK<sub>107</sub> (7,12,55).

Las vacunas también se clasifican de acuerdo a la presentación del virus en (44):

A) Virus atenuados (modificados)

B) Virus inactivados (muertos).

Para nuestro trabajo tomaremos ésta clasificación de denominando vacunas virus vivo a las primeras y vacunas virus muerto a las segundas, según lo denominado por Márquez (37).

A continuación señalamos las ventajas y desventajas de éstas vacunas (18).

#### VACUNAS VIRUS VIVO

Ventajas	Desventajas
Protección heteróloga	Posibilidad de diseminación
Administración masiva	Reacciones postvacunales
Protección rápida	Vácuna lábil, requiere cuidados de almacenamiento y aplicación
Bajo costo (se ocupa poca dosis).	Dificultad para desarrollarse.

#### VACUNAS VIRUS MUERTO

Ventajas	Desventajas
Seguridad (no se disemina)	Protección homóloga
Vacuna estable	Administración individual
Fácil desarrollo.	Protección lenta
	Alto costo.

Estos 2 tipos de vacunas van a inducir la formación de Ac's a un nivel humoral y epitelial, así como la activación del sistema inmunocompetente. Los Ac's son inmunoglobulinas (Ig's) - cuyos niveles en el ave son los siguientes:

Ig G      300 - 700

Ig M      120 - 250

Ig A      30 - 60      Pertillo Alfonso (53).

La inmunidad producida por vacunas virus vivo es muy completa y va a inducir la formación de Ac's epiteliales (Ig A) y Ac's circulantes (33) aunque es débil y de corta duración (57).

La inmunidad producida por vacunas virus muerto es mayor, casi exclusivamente de Ac's circulantes (Ig G e Ig M), sin embargo es de duración prolongada. Estas vacunas no producen niveles adecuados de Ig A y la protección a nivel epitelios, por ello, es muy pobre o inexistente (33,37,57,58).

En la inmunidad materna a la ENC, conferida a los pollos, participan los 3 tipos de Ig's. Se ha reportado una inmunidad hasta de 20 días (41,69), sin embargo en México la mayor parte del pollo nace con títulos inferiores a 6 Log.<sup>2</sup> por lo que la sugerencia práctica de aplicar la vacuna de ENC al noveno día es aceptable (59), ya que una vacunación temprana puede restringir la formación de Ac's (67). Los Ac's maternos tienen mayor efecto contra el virus de Gumboro, sin embargo también pueden alterar la respuesta contra Newcastle o Bronquitis (19).

#### A) VACUNAS VIRUS VIVO:

Son vacunas producidas con virus atenuados cuya patogenicidad ha sido disminuída por sucesivos pases en embriones de pollo y/o cultivos celulares, pero manteniendo su poder inmunogénico. La mayoría de las cepas enzooticas de VENC son lentogénicas y

mesogénicas y de ellas se produce éste tipo de vacunas (1,37, 42,44).

En la primer vacuna virus vivo se utilizó la cepa Muktevar atenuada por pasaje de embrión de pollo en 1940 (28). Posteriormente se utilizó la cepa Roackin pero por vía intramuscular con gran éxito en condiciones severas. Otra cepa utilizada es la Komarov que en Israel ha dado buenos resultados. La cepa Rhaniket, que es el nombre hindú para la ENC, es un virus vacunal que provoca una reacción severa pero protege muy bien contra la enfermedad (33,34,55).

Las cepas más usadas en las vacunas virus vivo son las lentogénicas, que son las que se emplean en México, y se les conoce genéricamente como tipo B<sub>1</sub>, siendo la cepa la Sota y la B<sub>1</sub> las más conocidas (12,15,33,58). La cepa la Sota es más inmunógena que la B<sub>1</sub>, ha demostrado gran efectividad contra cepas velogénicas como la Fontana (10,42). Una cepa como la Sota al combinarse con mycoplasma u otras bacterias puede provocar una reacción muy severa. La cepa B<sub>1</sub>, por otro lado, es menos patógena que la cepa la Sota pues tiene menor capacidad de multiplicación y de invasión, por lo tanto la respuesta inmune y la reacción postvacunal es menor (33,41). Las vacunas virus vivo pueden transmitir agentes patógenos cuando la vacuna no es preparada con embriones libres de patógenos (SPF) (2,21,57,71).

La respuesta a las vacunas virus vivo lentógenas varía mucho de acuerdo a la forma en que se aplican y al tipo de cepa vacunal que se utiliza. La administración por agua de bebida - produce una respuesta mucho más deficiente que la aplicación por otras vías y la vacunación por aspersion da muy buena protección pero es desastrosa cuando existe mycoplasma ya que tiene una mayor reacción.

La aplicación conjuntival por instalación estimula la producción local de Ac's y de interferencia viral, bloqueando de ésta manera la multiplicación, limitándose la enfermedad a una infección subclínica del tracto respiratorio, lo cual tiene su base en la función biológica del sistema inmunitario secretorio por su actividad antiviral hacia los virus cuya puerta de entrada son las mucosas del organismo ya que se menciona que los títulos de Ac's de las mucosas están mayormente relacionados que los títulos en el suero, con la resistencia a la reinfección después del desafío subsiguiente con virus vivo patógeno. Por lo tanto la inmunidad a muchos virus respiratorios que producen la enfermedad localmente en la mucosa respiratoria está mediada por Ac's virales producidos localmente (Ig A). Este tipo de aplicación es el más usado en las explotaciones avícolas. La vacunación intramuscular (I.M.) posterior estimula la producción de Ac's circulantes (Ig G e Ig M) que actúan como barrera contra la diseminación del virus aislando así el sistema respiratorio de las aves sin ocurrir daños a los demás tejidos por los que éste virus tiene afinidad cuando existe una exposición al virus velogénico (2,14,33,58,72). Un estudio (23) revela que la vacunación en "brote" de Newcastle virus vivo depa la Sota previene la manifestación clínica y mortalidad aunque no totalmente.

Una vez vacunada el ave, los Ac's tardan de 5 a 7 días en desarrollarse y el "pico" lo obtienen 3 o 4 semanas postvacunación (55). Los virus de ésta vacuna se replican en las células epiteliales de la tráquea y allí mismo se puede aislar el virus fácilmente (18,22). Las vacunas a virus vivo no dan inmunidad duradera por lo que se tiene que vacunar constantemente (52,57).

Mediante el empleo de técnicas de recombinación de ADN será posible mejorar las vacunas de virus vivo modificando su

virulencia, antigenicidad, capacidad para diseminarse, persistencia y otras características. Las vacunas producidas por medio de clonación y expresión de genes no contienen el virus vivo de manera que se elimina el riesgo de que el virus vacunal pueda revertir el patógeno (23). Aunque no existe evidencia de que virus usados en vacuna se vuelvan virulentos a través de pasajes (7).

#### B) VACUNAS VIRUS MUERTO:

En estas vacunas el virus se encuentra inactivado y se prepara en emulsión oleosa o en hidróxido de aluminio (1,44,57).

Las vacunas inactivadas se vienen usando desde 1953, los primeros intentos se hicieron con tejidos infectados de aves enfermas, desgraciadamente no obtuvieron éxito e hicieron que éste tipo de vacuna fuera considerado ineficaz, a tal grado que hacia 1973 la vacunación a virus muerto es prácticamente abandonada. Fueron éstas vacunas las primeras en ser preparadas comercialmente. El descubrimiento de Freund (1942-1943) sobre la notable acción adyuvante de las emulsiones tipo agua-aceite para incrementar la respuesta de Ac's dió lugar a numerosas investigaciones sobre el mismo iniciándose así la vacuno-terapia experimental en la prevención de enfermedades en animales. Posteriormente al desarrollo del virus en cultivos puros en huevos embrionarios, se investigaron nuevamente las vacunas a virus muerto con métodos mejorados en la producción del virus. Esto se sumó al uso de adyuvantes como el gel de hidróxido de aluminio y después emulsiones oleosas, lo que mejoró en gran medida la inmunización y su efecto ya que se ha demostrado que un vehículo oleoso en ésta vacuna mejora su efectividad teniendo altos niveles de Ac's por más tiempo, debido al parecer a la prolongada permanencia

del antígeno viral que se logra con el adyuvante oleoso (9,33,37,57).

También en éstas vacunas se utilizan cepas de tipo lento--génico (1) debido a que éstas producen títulos más altos que las velogénicas (42). En México se utiliza la cepa la Sota en las - vacunas virus muerto (13,21,28,33,71).

En las vacunas inactivadas el poder inmunológico depende de la masa antigénica e cantidad de antígeno presente ya que no - ocurre replicación viral y por tanto ocupa un mayor número de virus que la vacuna modificada (8,42).

En las vacunas inactivadas es necesario verificar su poten-  
cia tomando muestras de sangre de las aves a las cuales se les aplicó la vacuna, 3 semanas después, y así conocer la titulación de Ac's en el ave, ya que cuando los fabricantes han usado una menor cantidad de antígenos en la mezcla la potencia de la vacu-  
na está reducida y por ende su calidad (22,42). La estabilidad y homogenicidad es vital en estas vacunas junto con la facilidad de inyectarse (42).

Las vacunas inactivadas están compuestas de líquido alanteoideo con VENC y tratados con formol o beta propiolactona para inactivar la partícula viral usándose más comúnmente el formol por ser más fácil de conseguir (1,22,25,28,33). Se conoce que al utilizar mayor cantidad de líquido alanteoideo (18% vs. 8%) induce mayores niveles de Ac's circulantes y ofrece mayor pre-  
tección al desafío (16).

La efectividad de la vacuna virus muerto emulsionada cepa la Sota es buena ya que eleva el título de Ac's circulantes -  
evitando con ello la mortalidad en las aves producida por el VENC (16).

La mayor ventaja es que no produce los efectos indeseables asociados algunas veces con la vacuna virus vivo (8). Su alto costo y su aplicación individual son una limitante (33). Sin embargo los niveles de Ac's que se alcanzan son mayores que los producidos con la vacuna virus vivo (58). A tal grado ha contribuido el uso de vacunas emulsionadas virus muerto que se ha logrado reducir la incidencia y severidad de ENC en algunas granjas y países. Sólo las vacunas inactivadas de alta potencia pueden conferir inmunidad duradera y efectiva (1,46).

Por ser la respuesta de ésta vacuna más humoral que epitelial, en las aves la aplicación simultánea virus vivo-virus muerto es lo más utilizado. Empleándose ésta vacuna en un intervalo de tiempo apropiado posterior a la vacunación de virus vivo hay una respuesta alta y duradera de Ac's en el ave (1,9, 15,16,21,26,33,38,58). Pollos vacunados con el método simultáneo tienen un título de 5 a 7 Log<sup>2</sup> en HI, aparentemente sucede que el virus vivo produce una inmunidad local y una sensibilización primaria mientras que la vacuna inactivada provee protección al ave en una edad más tardía (45).

Cuando la vacuna virus muerto se aplica como primera vacuna hay una respuesta inmunológica en el ave 8 a 10 días posteriores sin embargo lo más aceptado es que se desarrolla la respuesta inmunológica 15 días después (22,58).

#### DESCRIPCION DE LA VACUNA EMULSIONADA CEPA KANSAS-MANHATTAN:

Esta cepa es de tipo velogénico y muy antigénica teniendo títulos de HI superiores a los obtenidos con cepa la Sota virus muerto emulsionada (28). Esta vacuna ha sido comercializada en los E.U.A. (73) y en México en los 60's por un laboratorio americano en hidróxido de aluminio (28). En un trabajo publicado (31)

se menciona someramente ésta vacuna y se utiliza del mismo modo que la vacuna emulsionada cepa la Seta no mencionándose ninguna característica en especial. Actualmente ésta vacuna no se encuentra en el mercado pero se ha usado en solución oleosa en Guadaluajara y Tepatitlán (21,28). Los datos técnicos de la vacuna son los siguientes:

- Vacuna en suspensión oleosa virus muerto
- Paramixovirus multiforme cepa K-M, tipo velogénico
- Titulación de Ac's en pollo:

días	HI
7	320
14	1280
21	2560

- Titulación de la vacuna:

DIEP 50  $1 \times 10^{9.2}$  (dosis infectante embrión pollo).

#### METODOS DE EVALUACION .

Existen 2 formas de evaluar una vacuna, programa de vacunación y el método de aplicación (51):

1) Control serológico de las parvadas que ponen en evidencia la presencia de los Ac's circulantes que son reflejo de la protección del ave contra el VENC. Para llevar a cabo ese control se utiliza la prueba de HI (inhibición de la hemoaglutinación). Es importante recordar que además de la inmunidad humoral existen otros factores de resistencia como son la inmunidad local y celular e interferencia viral que coadyuvan este proceso. Por tanto esta prueba no indica la capacidad total inmunitaria del ave. Por todo esto animales con títulos bajos pueden resistir un desafío y con altos títulos pueden sucumbir (15,38,39,50,54,59).

A continuación señalamos los parámetros de titulación de

Ac's de pollos (HI) en dilución doble (iniciándose con 1 : 5):

HI < 10 mortalidad con el desafío

HI > 40 la mayoría de pollos desafiados sobreviven

HI > 320 pollos no desafiados pueden no tener síntomas

Fletcher (17).

Para conocer los títulos de HI es recomendable tomar 36 muestras de suero de los pollos por caseta para que el resultado sea estadísticamente confiable (70).

2) La prueba del desafío con un virus patógeno es la más evidente y directa. Es usada en laboratorio pero es impráctica en el campo por razones obvias. La interpretación del desafío se basa en la presentación de los signos clínicos y en la mortalidad que resulta del mismo (35,51).

Según lo asentado por ANECA (Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas) en su boletín (3) para el caso de cualquier vacuna inactivada se espera una potencia mínima del 90%, es decir que en un desafío controlado sobrevivan el 90% de los animales sin mostrar signos de enfermedad.

Por lo mencionado anteriormente hemos escogido el método del desafío para evaluar la respuesta inmunológica en las aves producida por la vacuna K-M virus muerto, ya que los resultados nos indican si las aves están efectivamente protegidas, que es lo verdaderamente importante (71).

Las cepas de VENC elegidas para el desafío son de gran virulencia y de tipo velogénico (28)., las cepas "Querétaro" y "Chimalhuacán" tienen los elementos H.N. y F. característicos de las cepas patógenas (20). La tercer cepa es la "Texas" muy utilizada en estudios de desafío de vacunas contra ENC ya que es una cepa de VENC de tipo neurotrópico (8,66).

**OBJETIVO**

CONOCER LA PROTECCION DE LA VACUNA EMULSIONADA ELABORADA CON VIRUS MUERTO DE NEWCASTLE CEPA KANSAS MANHATTAN, EN POLLOS DESAFIADOS CON LAS CEPAS PATOGENAS DE NEWCASTLE: "TEXAS", "CHIMALHUACAN" Y "QUERETARO" .

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En México, la vacuna virus muerto emulsionada contra la ENC es producida con cepa la Sota que es lentogénica. (7,33,41). En nuestro medio, Coacalco, Guadalajara, Tepatitlán, se producen constantes brotes de ENC aunque se use la combinación virus vivo-virus muerto que ha demostrado gran efectividad (8,9,15,16,21,32,52,71). Esto pone en duda la calidad de las vacunas utilizadas (15,32,49,57) y ésto se fortalece con el hecho de que la capacidad inmunogénica de diferentes lotes de vacuna emulsionada de un mismo laboratorio difieren entre sí (30). Ante las poblaciones víricas heterogéneas y los cambios antigénicos de los virus las vacunas que tradicionalmente daban buena protección han perdido su eficiencia. La patogenicidad de los virus de campo puede exacerbarse por falta de limpieza y desinfección entre crianzas así como por el uso de vacunas que permiten el desarrollo de aquellos virus más patógenos de la población aún cuando neutralizan los de baja patogenicidad (32,42). En nuestro país donde la ENC es enzootica los títulos de Ac's que produzca la vacuna deben ser altos (43). La situación actual exige que las vacunas actuales sean mejoradas usando inmunógenos adecuados (42).

Por otra parte el uso de virus vivo cepa la Sota implica un riesgo en parvadas con mycoplasma (21,57,71). En éstas parvadas los efectos postvacunales son muy severos (45).

Las vacunas virus muerto no tienen ese riesgo, sin embargo por no contar con una vacuna emulsionada confiable se tiene que revacunar con vacuna virus vivo ampliando la posibilidad de tener severas reacciones postvacunales por ERCC especialmente. En áreas endémicas como lo es Tepatitlán sería de gran ayuda contar con una vacuna emulsionada que por sí sola brindara protección o

que al combinarse con una vacuna menos inmunógena que la Sota, como es la B<sub>1</sub>, pero menos agresiva, nos diera protección contra ENC, sin necesidad de estar aplicando constantemente, hasta cada 30 días, vacunas virus vivo en explotaciones aviares (21).

En la presente tesis damos a conocer una vacuna poco empleada y conocida, que de lograr demostrar su eficacia en estudios en nuestro medio, puede convertirse en gran auxiliar en la prevención y control de la ENC. Se nos ha informado que la vacuna virus muerto emulsionada cepa K-M ha sido utilizada con buenos resultados en Tepatitlán y Guadalajara, teniendo un 100% de protección en aves vacunadas sanas (21,28).

No contamos con literatura acerca de esta cepa vacunal, ni trabajos en nuestro medio que nos den más datos acerca de su comportamiento; por ello es necesario realizar investigaciones sobre éste inmunógeno que nos permitan conocer sus alcances y -- limitaciones así como sus ventajas y desventajas.

HIPOTESIS:

SI LA VACUNA EMULSIONADA CEPA KANSAS-MANHATTAN TIENE UN ALTO INDICE DE PROTECCION NO HABRA SIGNOS, LESIONES NI MORTALIDAD EN LOS POLLOS VACUNADOS AL SER PUESTOS EN CONTACTO CON AVES INFECTADAS CON CEPAS PATOGENAS DE NEWCASTLE .

MATERIAL Y METODO.

. Aves:

100 pollos de raza hubard de 8 días de edad

4 pollos infectados con cepas patógenas, 2 con cepa "Texas", 1 con cepa "Querétaro" y 1 con cepa "Chimalhuacán"

75 dosis de vacuna emulsionada de Newcastle cepa "Kansas-Manhattan"

Comederos y bebederos suficientes

1 jeringa automática y 10 agujas.

. Lugar y Duración:

Las aves se colocaron en un cuarto que se adaptó dividiéndolo en cuatro mediante estructuras de madera con malla, de 1 metro de altura, al cual sólo tenía acceso el experimentador para darles alimento y bebida suficiente. El experimento duró 5 semanas.

. Experimento:

Se procedió a iniciar el experimento con 100 pollos raza hubard de 8 días de edad. Se les dividió mediante un muestreo al azar en 4 lotes de 25 pollos cada lote y se les asignó la letra A, B, C y D respectivamente, siendo elegido el lote A como testigo. Se les tuvo en observación durante 2 días para poder iniciar el experimento ya que si hubieran tenido menos de 10 días de edad podría haber ocurrido bloqueo por Ac's maternos (59,67). Inmediatamente se procedió a vacunar a los pollos de los lotes B, C y D por vía subcutánea de forma individual con una dosis de .5ml. de vacuna de Newcastle cepa "Kansas-Manhattan" virus muerte emulsionada, teniendo un título de  $\text{DIEP}_{50} 1 \times 10^{9.2}$ . Sólo las 25 aves del lote A permanecieron sin vacunación por

pertenecer al lote testigo.

. Desafío:

El desafío se llevó a cabo de la manera siguiente (71):  
Quince días después de la aplicación de la vacuna, a los 25 --  
días de edad, las aves fueron puestas en contacto con 4 aves pre-  
viamente infectadas con virus de Newcastle por vía oculo-nasal:

1 ave infectada con 200,000 unidades de cepa patógena "Texas"  
VENC en el lote A.

1 ave infectada con 200,000 unidades de cepa patógena "Texas"  
VENC en el lote B.

1 ave infectada con 200,000 unidades de cepa patógena "Chimal-  
huacán" VENC en el lote C.

1 ave infectada con 200,000 unidades de cepa patógena "Queréta-  
ro" VENC en el lote D.

. Observación:

Se llevó a cabo un registro diario por espacio de 21 días  
de los signos clínicos y el récord de muertes.

. Análisis Estadístico:

Se realizó la prueba  $X^2$ , según la forma descrita (40).

### RESULTADOS.

En el lote A (testigo) se fueron presentando signos clínicos y mortalidad por ENC entre el tercero y el décimo día posterior al desafío, siendo el décimo día la muerte del último de los pollos de éste lote (consultar cuadro # 1). A la necropsia se encontraron lesiones en intestinos y proventrículo característicos de ENC.

Los lotes B, C y D fueron observados por espacio de 21 días desde el momento del desafío y ninguna de las aves presentó signos de ENC. Pasados los 21 días se sacrificaron 5 aves de cada lote elegidas al azar y no presentaron lesiones por ENC a la necropsia. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > .01$ ) entre los datos observados y los esperados, después de 5 semanas de experimentación se dió por terminado nuestro estudio.

Los resultados demostraron un elevado nivel de protección al desafío como lo podemos observar en el cuadro # 2.

Las gráficas 1 (lote A, testigo) y 2 (Lotes B, C y D) ilustran la presencia de mortalidad en el lote testigo y la ausencia de ésta en los lotes experimentales, lo cual comprueba que en el presente estudio la cepa Kansas-Manhattan es 100% efectiva.

Cuadro # 1: Relación del número de aves que presentaron signos y muerte los días posteriores al desafío en el lote testigo.

---

Días post-desafío	# aves que presentaron signos de ENC.	Récord de muertes.
1	0	0
2	0	0
3	7	2
4	8	3
5	10	4
6	10	6
7	10	4
8	6	4
9	2	1
10	1	1

---

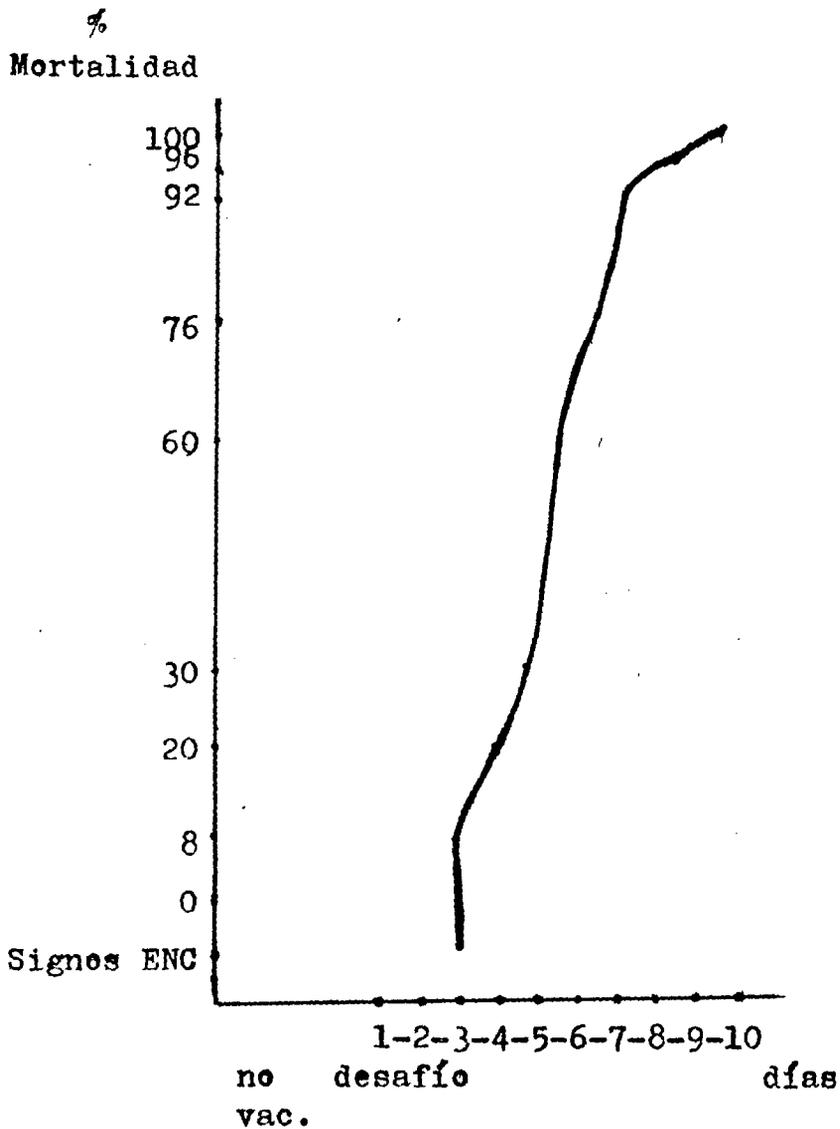
Cuadro # 2: Niveles de protección mostrada por lotes experimentales al desafío con cepas patógenas de ENC.

---

Vacunación lote desafío	No.aves protegidas/ No.aves desafiadas	% prot.	% mort.
Cepa K-M B "Téxas"	25/25	100	0
Cepa K-M C "Chimalhuacán"	25/25	100	0
Cepa K-M D "Querétaro"	25/25	100	0

---

Gráfica 1: Lote testigo A



En la gráfica 1 encontramos una mortalidad del 100% en el lote A que no fué vacunado y estuvo en contacto con aves infectadas con cepa "Texas", entre el tercero y décimo día posterior al reto.

Gráfica 2: Lotes experimentales B, C y D



En la gráfica 2 observamos claramente la ausencia de mortalidad en las aves de los lotes B, C y D que fueron infectadas con cepas patógenas, previa vacunación con la vacuna emulsionada virus muerto Kansas-Manhattan.

## DISCUSION.

Los resultados obtenidos estan de acuerdo con lo mencionado por Illescas (28), que una sola dosis de la vacuna virus muerto emulsionada cepa K-M es suficiente para proteger el ave de la ENC.

Investigaciones anteriores (16,32,49) mencionan la protección que confiere la vacuna emulsionada virus muerto cepa la Sota, contra la ENC, sin embargo no se han utilizado 3 cepas de alta patogenicidad como en la presente tesis para evaluar la protección de una vacuna virus muerto emulsionada en un mismo estudio.

Siendo la transmisión del VENC neurotrópico (67) por aire, en la presente prueba al estar en contacto estrecho las aves existió una combinación de las 3 cepas usadas en el desafío lo que exigió mayor protección de la vacuna en los pollos.

Se confirma lo mencionado en la literatura (20,57,58) que a partir de 10 a 15 días postvacunales hay respuesta de inmunidad contra la ENC en vacunas de éste tipo.

Por lo mencionado por varios autores (33,44) sabemos que la vacuna emulsionada no estimula la inmunidad epitelial como la vacuna virus vivo, sin embargo en la presente tesis no se necesitó el método simultáneo para obtener una protección total.

No se encontró referencia de otra cepa de Newcastle tipo velogénico (7,22,26,46) utilizada como vacuna.

A diferencia de trabajos anteriores (2,16,32,49) en el presente estudio se utilizó una técnica de desafío similar a la que ocurre en forma natural (que es el contacto de ave sana con

ave enferma) (22,26,46,71), por un virus altamente patógeno y velogénico de Newcastle. Ello nos permite realizar un estudio más cercano a las formas naturales de transmisión de la enfermedad.

Según lo descrito anteriormente (13,26,41,56,63) el tiempo de transmisión e incubación de la enfermedad con cepas velogénicas de ENC es en promedio de 3 a 4 días posteriores al contacto con el virus. Considerando ésto en la presente tesis, el periodo de observación post-desafío fué de 21 días tiempo suficiente para que se manifestaran signos, lesiones o mortalidad por ENC.

Este trabajo difiere con lo expuesto por Decanini(15) que los resultados de la inmunización sólo con vacuna emulsionada virus muerto dejan mucho que desear acerca de la protección con ferida cuando se aplica la vacuna alrededor de los 12 días y se desafía 21 días después. Esto es importante porque en el cam po es común la vacunación a los 12 días y es frecuente la exposición al virus de campo antes que los pollos cumplan las 4 -- semanas de edad.

### CONCLUSIONES.

- La vacunación con virus muerto emulsionada, cepa K-M es efectiva en la protección de pollos de engorda contra cepas patógenas velogénicas de Newcastle.
- Quince días posteriores a la aplicación de ésta vacuna los animales inmunizados soportaron el reto de cepas velogénicas patógenas de Newcastle, no existiendo mortalidad, lesiones ni signos provocados por ENC.
- Una sola aplicación de ésta vacuna fué suficiente para conferir inmunidad en los pollos.
- La aplicación de ésta vacuna emulsionada, a los 10 días de edad, en pollos de engorda desafiados 21 días después con cepas patógenas de virus de Newcastle es efectiva.
- Esta vacuna cumple satisfactoriamente el rango de 90% de aves sobrevivientes y sin signos de enfermedad posteriores al desafío según lo señalado por la A.N.E.C.A.
- Las aves no protegidas con la vacuna de Newcastle virus muerto emulsionada, cepa K-M murieron con signos y lesiones características de ENC.

### SUGERENCIAS.

Aunque en el presente estudio se concluye que esta vacuna protege contra la ENC se sugiere que, mientras no se cuente con un mayor número de investigaciones sobre ésta cepa, se utilice en combinación con vacuna virus vivo (cepa la Sota o B<sub>1</sub>) en orden a obtener una mayor protección. De seguir obteniéndose resultados positivos en los siguientes estudios se puede usar como vacuna única o combinada con cepa B<sub>1</sub>, virus vivo en granjas donde la ERCC sea un problema.

En futuros trabajos será conveniente conocer el tiempo mínimo de protección, posterior a la aplicación de ésta vacuna, contra el VENC, mediante el uso de retos sucesivos de 3,6,10 y 15 días después de inmunizados hasta encontrar aves resistentes al VENC. Así mismo es conveniente estudiar el tiempo máximo de protección contra el VENC en animales vacunados con ésta cepa, por lo que se deben hacer desafíos sucesivos 1,2,3, o los meses que sea necesario para encontrar aves susceptibles al VENC.

Se sugieren estudios comparativos entre la vacuna emulsionada cepa K-M y otras vacunas emulsionadas producidas en nuestro país con cepa la Sota.

Se sugiere se compare ésta vacuna que contiene aceite como adyuvante con una vacuna de ésta misma cepa que contenga hidróxido de aluminio como adyuvante para conocer si existen resultados similares o diferentes de protección contra el VENC.

Se sugieren estudios de HI para conocer la correlación que pueda existir entre la protección demostrada al desafío de cepas patógenas de Newcastle y el título de Ac's.

### SUMARIO.

Se efectuó una prueba con 100 pollos raza hubard, para conocer la protección de la vacuna virus muerto cepa K-M emulsionada. Se dividió en 4 lotes de 25 pollos cada uno (lotes A, B, C y D). El lote A fue el testigo no vacunado, a los otros 3 lotes se les aplicó la vacuna.

Quince días posteriores a la aplicación de la vacuna se desafió a los 4 grupos con 4 aves infectadas previamente con cepas patógenas del virus de Newcastle. La ave para el lote A se infectó de cepa "Texas", la del lote B de cepa "Texas", la del C con cepa "Chimalhuacán" y la del D con cepa "Querétaro". Las 4 aves presentaban signos de ENC al ponerse en contacto con los lotes. El lote A presentó signos y lesiones característicos de la enfermedad, teniendo una mortalidad del 100%. Los lotes B, C y D no presentaron signos de la enfermedad ni mortalidad. Al final de la prueba, 21 días después del desafío, se sacrificaron al azar 5 pollos de los 3 lotes inmunizados y no se observaron lesiones de Newcastle. En el análisis estadístico se utilizó la prueba  $X^2$  y no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $P > .01$ ). Se espera se realicen más estudios acerca de ésta vacuna.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- ALLAN W.H., LANCASTER J.E., TOTH B. Vacunas contra la enfermedad del Newcastle. Colección FAO. No.10, Roma, 1980.
- 2.- ANDRADE LUIS, FERNANDEZ RAFAEL, RIVERA SERGIO. Evaluación de diferentes métodos de vacunación contra la ENC en pollos de engorda en el Estado Zuliz, Venezuela. Memorias IX congreso Latinoamericano. Acapulco Gro. Mayo 1985. México pp. 175-186.
- 3.- ANECA. Boletín informativo. No. 2. Enero-Marzo 1987.
- 4.- ANTILLON RIONDA A. Panorama de las enfermedades respiratorias en México. Memorias de enfermedades respiratorias de las aves. ANECA 1987. México. pp.45-48.
- 5.- ARTEAGA RAMOS A.J. Correlación entre anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación, pasivos y activos, título de la vacuna y resistencia contra ENC. Tesis profesional UNAM. México 1976.
- 6.- BANKOVSKY R.A., D.V.M., PH.D. Interferon and its role in Poultry Health. Am. J Vet Res, Vol.36, No.4. 1975. pp.494-496.
- 7.- BARNES H.J., et al. Avian Disease Manual. The American Association of Avian Pathologists. U.S.A. 1983.
- 8.- BEARD C.W. PH.D. et al. Immunity to Newcastle Disease. Am. J. Vet. Res., Vol.36 No.4.1975.

- 9.- BECERRA DIAZ A.F. Valoración de la Inmunidad usando diferentes programas de vacunación para la prevención de la ENC en pollos para abasto. Tesis profesional. U.de G. 1978.
- 10.- BENSON H.N., WENGER D.R., BEARD P.D. Efficacy of a commercial Newcastle vaccine against velogenic viscerotropic Newcastle disease virus. Avian dis. Vol.19, No.3. 1975. pp. 566-572.
- 11.- BURRIDGE M.J., RIEMANN H.P., UTTERBACK W.W. Methods of spread of velogenic viscerotropic Newcastle disease virus in the southern Californian epidemic of 1971-1973. Av. dis. Vol.19
- 12.- CAMPA AMIVIZCA F. Comparación entre la inmunogenicidad de las cepas Kimber y la Sota de la ENC en pollo de engorda. Tesis profesional UNAM. México 1978.
- 13.- CORREA GIRON PABLO M.V.Z., M.A. Enfermedades virales de los animales domésticos (monogástricos). 3a. Ed. del autor. México 1981.
- 14.- CRUZ COY J.S. Contribución al estudio inmunológico de las vacunas de ENC aplicadas por vía intramuscular virus vivo cepa la Sota. Tesis profesional UNAM. México 1981.
- 15.- DECANINI LUCIO, MARTINEZ EDUARDO, MARTINEZ LUCIO. Protección conferida por vacunas comerciales contra ENC. Memorias del IX Congreso Latinoamericano. Acapulco Gro. Mayo 1985. México pp.841-849.
- 16.- ESPINOZA G. LETICIA, LOZANO D. BERNARDO, ROSALES C. GREGORIO. Evaluación inmunológica de 2 vacunas emulsionadas contra la

ENC con diferentes cantidades de líquido alantoideo.  
Memorias del IX Congreso de Avicultura Latinoamericana  
Acapulco, Gro. Mayo 1985. México. pp.164-169.

- 17.- FLETCHER OSCAR. Sistema inmune de las aves. Memorias del curso de actualización sobre toxicología e inmunología aviar. México, Octubre 1986. pp.113-123.
- 18.- GERDON C. DAVID., D.V.M. Poultry Vaccination and immunity. Salsbury Laboratories, Inc. Charles City. Iowa. U.S.A. 1986.
- 19.- GLISSON R. JHON., D.V.M., PH.D. Técnicas de Vacunación, conceptos de actualidad. Memorias del curso de actualización sobre toxicología e inmunología aviar. México. Octubre 1986. pp.137-144.
- 20.- GOMEZ ARROYO F.E. Electroforesis comparativa de las proteínas del virus de la ENC (cepas "Querétaro", "Chimalhuacán", B<sub>1</sub>, la "Sota") en gel policramida. Tesis profesional UNAM México 1984.
- 21.- GONZALEZ FRANCO DAVID., M.V.Z. Comunicación personal. Tepatitlán, Jalisco. México 1988.
- 22.- GORDON R.F. et al. Enfermedades de las aves. 2a. Edición Ed. El Manual Moderno. México 1985.
- 23.- GRAHAM PURCHASE. Aplicaciones futuras de la biotecnología en las aves domésticas. Memorias del curso de actualización sobre toxicología e inmunología aviar. México. Octubre 1986 pp.145-169.
- 24.- HITCHNER B. STEPHEN. Protección contra Newcastle. Síntesis

- avícola. Vol.30.No.1. 1983.
- 25.- HITCHNER STEPHEN. Una re-evaluación de las vacunas inactivadas. Síntesis Avícola. Vol.4. No.7. 1986.
- 26.- HOFSTAD M.S., Diseases of poultry.Eigth Edition. Iowa State University U.S.A. 1984.
- 27.- IANTORNO/PAPA. Turning points. 2a. Edition. Addison-Wresley publishing company. Delawere U.S.A. pág. 73. 1987.
- 28.- ILLESCAS CASTILLO J.J. Q.B.P. Comunicación personal. Guadalajara, Jal. México 1988.
- 29.- ISOLATION AND IDENTIFICATION OF AVIAN PATHOGENS. 2nd.Edition Universiti of Pennsilvania. U.S.A. 1980.
- 30.- JUNCO R.A., LOZANO D.B., LUCIO M.B. Evaluación inmunológica de vacunas emulsionadas contra la ENC. Memorias del XI congreso anual ANECA, Puerto Vallarta, Jal. 1986. México. pp.77-80.
- 31.- KING D.J. Virus isolation from tracheal explant cultures and oropharingeal swabs in attempts to detect persistent Newcastle disease virus infections in chickens. Av.dis Vol. 29. No.2. 1985.
- 32.- LOZANO D.B., MORFIN F., LOZANO D.J. Comportamiento en el campo de las vacunas emulsionadas comerciales contra la ENC en polle de engorda. IX Congreso latinoamericano de avicultura. Acapulco, Gro. Mayo 1985. México. pp.195-205.

- 33.- LUCIO M.B., MOZQUEDA T.A. Enfermedades comunes de las aves domésticas. Edición del autor. México 1985.
- 34.- M.CUCA., ING.AGR. M.S. Fuentes de energía y proteínas para la alimentación de las aves. Ciencia y Veterinaria. Tomo 2 UNAM, México. 1978. pp.326-352.
- 35.- MATZER NORBERTO. Patología avícola aplicada a nivel de granjas. Industria avícola. Vol.30 No.4. 1983.
- 36.- MARQUEZ M., TELLEZ G. Encuesta serológica de población humana en contacto con aves explotadas industrialmente. Memorias del XIII Congreso anual ANECA, Acapulco, Gro. Mayo 1988. México. pp.13-17.
- 37.- MARQUEZ MIGUEL A. La anatomía de una vacuna. II Congreso de avicultura de Centroamérica y Panamá. San Salvador, El Salvador. C.A. 1976.
- 38.- MARQUEZ MIGUEL A. Comparación de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación con la prueba del desafío, para evaluar 2 calendarios de vacunación contra la ENC en pollos de engorda. Memorias del IX Congreso latinoamericano de avicultura. Acapulco, Gro. Mayo 1985. México.
- 39.- MATTEWS, R.E.F. Clasification and nomenclature of viruses. Third report of the international committee on Taxonomy of viruses. Intervirology. Vol.12. No.133. 1979.
- 40.- MENDEZ RAMIREZ I. El Protocolo de Investigación. Ed.Trillas México 1987.
- 41.- MERCK VETERINARY MANUAL. 6th. Edition. Merck and co.Inc. U.S.A. 1986.

- 42.- MEZA GABRIEL, DR. Producción de agentes inmunizantes (vacunas), Memorias del curso de actualización sobre toxicología e inmunología aviar. México D.F. 1986. pp.187-190.
- 43.- MEZA GABRIEL, DR. Control de calidad de agentes inmunizantes Memorias del curso de actualización sobre toxicología e inmunología aviar . México D.F. 1986. pp.183-185.
- 44.- MOHANTY/DUTTA. Virología Veterinaria. Ed. Interamericana México 1985.
- 45.- MONTE ERAIZER, DR. Inmunización de la gallina doméstica., Experiencias de campo en América latina, medio oriente y Africa. Memorias del curso de actualización sobre toxicología e inmunología aviar. México D.F. 1986. pp.175-182.
- 46.- MOZQUEDA TAYLOR, M.V.Z. La patología aviar en México. Industria avícola. Vol.32. No.5. 1985.
- 47.- NAGARAJA K.V. Efecto del amoníaco sobre la salud y el desempeño de la parvada. Memorias de actualización sobre manejo de aves. Guadalajara-Monterrey. Marzo 1988. México. pp.62-66.
- 48.- OLVERA HERRERA E. Algunas consideraciones sobre la ENC en el D.F. Tesis profesional UNAM. 1948. México.
- 49.- PAEZ G., URQUIZA B., LOZANO D., Evaluación de una vacuna emulsionada experimental contra la ENC en pollos de 1 y 8 días de edad. Memorias del XI Congreso anual de ANECA. Puerto Vallarta, Jal. 1986. México. pp.138-140.

- 50.- PEREZ MARQUEZ B., Q.B.P. Msc. Ph.D. La prueba de HI y su aplicación práctica en el diagnóstico de las enfermedades aviarias. Memorias de Inmunología Aviar. F.M.V.Z. UNAM México. 1988. pp.35-36.
- 51.- PFIZER. Manual de enfermedades respiratorias. México 1986
- 52.- P.G.BOX A virus vivo o a virus muerte. Ind. Avícola.Vol.31 No.9. 1984.
- 53.- PORTILLO HERAS ALFONSO. Algunas experiencias con inmunoterapia en pollos de engorda. XIII Convención anual ANECA Acapulco,Gro. 1988. México. pp.39-45.
- 54.- PUON HORITA ALMA D. Estudio de la inmunidad mediada por células en aves contra la ENC por la técnica en placa agarosa de Claussen. Tesis profesional UNAM 1980.
- 55.- RAYA RAFAEL, M.V.Z. Inmunización y manejo. Conferencia dictada en AVECAO . Guadalajara, Jal., México. 1988.
- 56.- REIS JULY JOSE. Doença de Newcastle. Atualizacão en Avicultura e ornitopatológico. 1 edicao. Sociedade paulista de medicina veterinaria/Instituto nacional de colonizacão e reforma agraria, revista aves e ovos. Sao Paulo Brazil. 1971.
- 57.- REYNOSO RAMIREZ MA. DEL LOURDES. Evaluación serológica de campo del grado de inmunidad contra la ENC conferido por 4 vacunas comerciales tipo virus emulsionado inactivado en aceite en aves para engorda. Tesis profesional U.de G. 1983.

- 58.- ROJO MEDIAVILLA ELENA. Enfermedades de las aves. Ed.Trillas México. 1984.
- 59.- SARFATI M.D., et al. Aplicaciones de la prueba de HI en el control de la ENC. Memorias de apoyo del laboratorio al diagnóstico. ANECA Monterrey. 1985. México, .pp.57-66.
- 60.- SHARMA J.M. Fisiopatología del sistema inmunológico y efectos de la infección viral sobre las células inmunológicas . Memorias de fisiopatología sistémica de la gallina doméstica. ANECA México D.F. 1987. pp.1-6.
- 61.- SIEGEL H.S. Mecanismos fisiológicos de los efectos ejercidos por el medio ambiente sobre el sistema inmunológico de las aves. Memorias de fisiopatología sistémica de la gallina doméstica ANECA. México D.F. 1987 pp.24-29.
- 62.- SENTIES CUE G. Impacto económico de las principales enfermedades que afectan a las aves de engorda y de postura en México. Memorias de la XIII Convención anual ANECA . Acapulco, Gro. Mayo 1988. México. pp.179-183.
- 63.- SINTESIS AVICOLA. Naturaleza de la enfermedad.Vol.4 No.2 1986.
- 64.- SOTO ERNESTO, SARFATI DAVID, PAEZ LILIA. Estudio de la utilización de productos emulsionados con la combinación del virus de la ENC y Haemophilus paragallinarum. Memorias XIII Convención ANECA. Acapulco Gro. Mayo 1988. México pp. 215-218.
- 65.- SOTO ERNESTO, M.V.Z. Sanidad e higiene en las explotaciones avícolas. Memorias del curso de actualización sobre el

manejo de las aves. ANECA, Marzo 1988. Guadalajara, Jal.  
México pp.1-5.

- 66.- SPALATIN J., HANSON R.P. Epizootiology of Newcastle disease in waterfowl. Av.Dis. Vol.19 No.3 1975. pp.573-582.
- 67.- STONE H.D., BONEY W.A., CORIN M.F. Response of congenitally immune chicks to viscerotropic velogenic Newcastle disease virus. Av.Dis Vol.19 No.4 1975. pp.651-656.
- 68.- THACKER LEON H. Enfermedades respiratorias. Patología e Inmunidad. Memorias de fisiopatología sistémica de la gallina doméstica ANECA. México D.F. 1987. pp.44-57.
- 69.- TIZARD I. Inmunología veterinaria 2a. Edición . Ed.Intera-  
mericana. México 1984.
- 70.- URQUIZA B.O., LOZANO D.B. Evaluación estadística de la prueba de HI contra el virus de la ENC en parvadas de pollo de engorda. Memorias de la XIII Convención ANECA Acapulco, Gro. Mayo 1988. México. pp.149-151.
- 71.- UVIÑA LUNA FABIAN. M.V.Z. Comunicación personal. Guadalajara, Jal. México. 1988.
- 72.- VILLEGAS PEDRO et al. Effect of route of Newcastle disease vaccination on the incidence of airsacculitis in chickens infected with mycoplasma synovae. Av.Dis. Vol.20 No.2. 1976 pp.395-399.
- 73.- VADEMECUN. Labs. Cutter U.S.A. 1959.
- 74.- W.DICK JOHN. Los virus que afectan a las aves. Ind.Avícola Vol.28 No.1 1981.