



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Comparación de la respuesta vacunal contra la enfermedad de Newcastle
en pollos de engorda alimentados con Ocratoxina tipo A y *Salmonella*
enterica serovariedad Enteritidis.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

JUAN MANUEL TERRAZAS ESPINOSA

ASESOR:

M. en C. JUAN OMAR HERNÁNDEZ RAMÍREZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al 5' – 3' por darle sentido a mi vida.

A mi familia porque sin ellos no sería quien soy ahora y no estaría donde estoy si no me hubieran apoyado en cada paso que he dado.

A mis amigos de veterinaria porque las vivencias con ellos fueron, sin lugar a duda, experiencias únicas que nunca podré olvidar. Y porque nos hemos apoyado mutuamente en cada paso, salto o carrera que hemos dado. Porque es un privilegio poder elegirlos como familia.

A mis amigos que no son de veterinaria pero que siempre me han apoyado y siempre me han brindado su confianza y amistad.

A mi asesor por brindarme la gran oportunidad de trabajar en su equipo y por ofrecerme siempre su apoyo para concluir esta gran carrera.

A la Doctora Gabriela Sánchez Hernández, al MVZ Marco Antonio Mendoza, al MVZ Juan Sebastián Barrientos y al Doctor Abraham Méndez Albores por ofrecerme todo su apoyo y conocimiento para concluir esta gran carrera.

A la mismísima Universidad Nacional Autónoma de México, porque me ha acogido como a un hijo, para ser parte de su gran comunidad, de su gran familia de enormes profesionistas.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDO VISUAL.....	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
1.0 INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Mercado avícola para la producción de carne de pollo	11
1.1.1 Panorama mundial	11
1.1.2 Panorama en Latinoamérica	12
1.1.3 Panorama en México.....	12
1.2 Hongos productores de micotoxinas	13
1.2.1 Micotoxinas	15
1.2.2 Ocratoxina tipo A.....	16
1.2.3 Metabolismo de la Ocratoxina tipo A	17
1.2.4 Toxicidad	17
1.2.5 Presentaciones clínicas.....	18
1.2.5.1 Intoxicación aguda	18
1.2.5.2 Intoxicación crónica.....	18
1.2.6 Hallazgos micro y macroscópicos.....	19
1.2.7 Influencia en la inmunidad.....	19
1.2.8 Importancia de la Ocratoxina tipo A en la industria avícola	21
1.3 Salmonelosis.....	22
1.3.1 Género <i>Salmonella sp.</i>	22
1.3.2 Patogenia de <i>Salmonella sp.</i>	23
1.3.3 <i>Salmonella enteritidis</i>	24
1.3.4 Control y prevención contra SE.....	25
1.4 Enfermedad de Newcastle	26
1.4.1 Generalidades de la EN	26
1.4.2 Respuesta Inmune contra la EN	27
1.4.2.1 Respuesta innata.....	27

1.4.2.2	Inmunidad adquirida contra la EN	27
1.4.3	Prevención mediante vacunación	28
2.0	JUSTIFICACIÓN	29
3.0	HIPÓTESIS.....	30
4.0	OBJETIVOS.....	31
4.1	Objetivo general.....	31
4.2	Objetivos particulares	31
5.0	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	32
5.1	Actividades realizadas	32
6.0	MATERIALES Y MÉTODOS	34
6.1	Modelo biológico.....	35
6.2	Ocratoxina tipo A	35
6.3	<i>Salmonella enterica</i> serovariedad Enteritidis	37
6.4	Instalaciones y corraletas para aves.....	37
6.5	Alimento comercial	38
6.6	Procesamiento de las muestras	39
6.6.1	Toma de muestra sanguínea y obtención de suero	39
6.6.2	Cuantificación de anticuerpos contra Newcastle.....	39
6.6.3	Laminillas histológicas y micrografías	40
6.6.4	Bioquímica sanguínea	40
6.6.4.1	Proteínas totales	40
6.6.4.2	Albúmina	41
6.6.4.3	Alanina aminotransferasa (ALT).....	41
6.6.4.4	Gamma glutamil transpeptidasa (GGT).....	41
7.0	RESULTADOS	42
7.1	Cuantificación de títulos de anticuerpos al día 15 y 29	42
7.2	Relación del peso de bazo, bolsa cloacal e hígado respecto al peso del ave	43

7.3	Cuantificación de analitos al día 15.....	44
7.4	Cuantificación de analitos al día 29.....	45
8.0	DISCUSIÓN	46
9.0	CONCLUSIONES	50
9.1	Conclusión general	50
9.2	Conclusión particular.....	50
10.0	PROSPECTIVAS	51
11.0	REFERENCIAS.....	52
12.0	ANEXOS.....	57
12.1	Anexo 1: Gráficas de resultados.....	57
12.2	Anexo 2: Micrografías de los órganos en los diferentes tratamientos.....	62
12.2.1	Micrografías de hígado en los diferentes tratamientos.....	62
12.2.2	Micrografías de bazo en los diferentes tratamientos.....	65
12.2.3	Micrografías de bolsa cloacal en los diferentes tratamientos.....	67

ÍNDICE DE CONTENIDO VISUAL

ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN 1. FASES DE CRECIMIENTO FÚNGICO Y LOCALIZACIÓN DE SÍNTESIS DE MICOTOXINAS.....	13
ILUSTRACIÓN 2, 3. MICROGRAFÍAS DE HÍGADO H-E, TRATAMIENTO CONTROL.....	63
ILUSTRACIÓN 4, 5, 6, 7. MICROGRAFÍAS DE HÍGADO H-E, TRATAMIENTO OCRATOXINA.....	63
ILUSTRACIÓN 8, 9, 10, 11. MICROGRAFÍAS DE HÍGADO H-E, TRATAMIENTO <i>SALMONELLA</i>	64
ILUSTRACIÓN 12, 13, 14, 15. MICROGRAFÍAS DE HÍGADO H-E, TRATAMIENTO OTA+SAL.....	65
ILUSTRACIÓN 16, 17. MICROGRAFÍAS DE BAZO H-E, TRATAMIENTO CONTROL.....	67
ILUSTRACIÓN 18, 19. MICROGRAFÍAS DE BAZO H-E, TRATAMIENTO OCRATOXINA.....	67
ILUSTRACIÓN 20, 21. MICROGRAFÍAS DE BAZO H-E, TRATAMIENTO <i>SALMONELLA</i>	68
ILUSTRACIÓN 22, 23. MICROGRAFÍAS DE BAZO H-E, TRATAMIENTO OTA+SAL.....	68
ILUSTRACIÓN 24, 25, 26. MICROGRAFÍAS DE BOLSA CLOACAL H-E, TRATAMIENTO CONTROL.....	69
ILUSTRACIÓN 27, 28, 29. MICROGRAFÍAS DE BOLSA CLOACAL H-E, TRATAMIENTO OCRATOXINA....	70
ILUSTRACIÓN 30, 31, 32. MICROGRAFÍAS DE BOLSA CLOACAL H-E, TRATAMIENTO <i>SALMONELLA</i>	70
ILUSTRACIÓN 33, 34, 35. MICROGRAFÍAS DE BOLSA CLOACAL H-E, TRATAMIENTO OTA+SAL.....	71

TABLAS

TABLA 1. HONGOS PRODUCTORES DE MICOTOXINAS.....	15
TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS UTILIZADOS.....	31
TABLA 3. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA NEWCASTLE CEPA VACUNAL PARA EL DÍA 15 Y 29 POR EL MÉTODO ELISA.....	41
TABLA 4. RELACIÓN DEL PESO DE LOS ÓRGANOS LINFOIDES, BAZO Y BOLSA CLOACAL, E HÍGADO RESPECTO AL PESO CORPORAL DE LAS AVES (PORCENTAJE).....	42
TABLA 5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES, ALBÚMINA, GGT Y ALT CORRESPONDIENTES AL DÍA 15.....	43
TABLA 6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES, ALBÚMINA, GGT Y ALT CORRESPONDIENTES AL DÍA 29.....	44

GRÁFICAS

GRÁFICA 1. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA NEWCASTLE PARA EL DÍA 15 POR MÉTODO DE ELISA.....	56
GRÁFICA 2. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA NEWCASTLE PARA EL DÍA 29 POR MÉTODO DE ELISA.....	56
GRÁFICA 3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES AL DÍA 15.....	57
GRÁFICA 4. CUANTIFICACIÓN DE ALBÚMINA AL DÍA 15.....	57
GRÁFICA 5. CUANTIFICACIÓN DE GGT AL DÍA 15.....	58
GRÁFICA 6. CUANTIFICACIÓN DE ALT AL DÍA 15.....	58
GRÁFICA 7. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES AL DÍA 29.....	59
GRÁFICA 8. CUANTIFICACIÓN DE ALBÚMINA AL DÍA 29.....	59
GRÁFICA 9. CUANTIFICACIÓN DE GGT AL DÍA 29.....	60
GRÁFICA 10. CUANTIFICACIÓN DE ALT AL DÍA 29.....	60
GRÁFICA 11. RELACIÓN PESO DEL ÓRGANO/PESO DEL AVE: BAZO.....	61
GRÁFICA 12. RELACIÓN PESO DEL ÓRGANO/PESO DEL AVE: BOLSA CLOACAL.....	61
GRÁFICA 13. RELACIÓN PESO DEL ÓRGANO/PESO DEL AVE: HÍGADO.....	62

ABREVIATURAS

ALB – Albúmina

ALT – Alanina aminotransferasa

ANDEVA – Análisis de varianza

BCG – Bromocresol verde

CEA – Centro de Enseñanza Agropecuaria

cm – Centímetros

CO – Tratamiento control

DAS – Diacetoxiscirpenol

DON – Deoxinivalenol

EE – Error estándar

ELISA – Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

EN – Enfermedad de Newcastle

g – gramo(s)

GCP-2 – Proteína Quimiotáctica de Granulocitos tipo 2

GGT – Gamma glutamil transpeptidasa

GM-CSF – Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

GRO-a – Gen Alfa relacionado con el crecimiento

GRO-b – Gen Beta relacionado con el crecimiento

GRO-y – Gen Gamma relacionado con el crecimiento

H-N – Proteína Hemaglutinina-neuraminidasa

ICAM-1 – Molécula de adhesión intercelular tipo 1

IFN-y – Interferón Gamma

IL-8 – Interleucina 8

kg – Kilogramos

mL – Mililitros

mm – Milímetros

NIV – Nivalenol

NK – Células asesinas naturales

nm – Nanómetros

NRC – National Research Council

OIE – Organización Mundial de Sanidad Animal

OTA – Ocratoxina tipo A

OTA+SAL – Tratamiento con OTA y SE

PAMP – Patrones moleculares asociados con patógenos

PEEC – Químico atrayente epitelial ligado con patógenos

PMN – Células polimorfonucleares

PT – Proteínas totales

RPM – Revoluciones por minuto

SAL – Tratamiento con SE

SE – *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariedad Enteritidis

TNF-a – Factor de necrosis tumoral Alfa

tx – Tratamiento

U/L – Unidades por litro

UFC – Unidades formadoras de colonia

µg – Microgramos

UNIGRAS – Unidad de Investigación en Granos y Semillas

RESUMEN

Con el propósito de demostrar los efectos negativos de la Ocratoxina tipo A (OTA) sobre el sistema inmune se desafió a un grupo de pollos de engorda vacunado contra la enfermedad de Newcastle (EN) con esta micotoxina y posteriormente se inoculó a las aves con Salmonella enterica serovariedad Enteritidis (SE). De esta forma se puso a prueba a OTA y SE de forma aislada y en conjunto encontrando que la respuesta humoral contra la EN decayó tras la adición de OTA obteniendo un título de anticuerpos, al día 15, de 2 459.5, mientras que con la inoculación de SE se obtuvo un valor de 4 645.8; en conjunción se observaron títulos de 2 892.5 que comparando contra el grupo control con 8 278.6 se puede ver una disminución de más de 50%. Al día 29, con la adición de OTA se presentó un título de 1 811.1, seguido por OTA y SE con 2 124 y por último SE con un valor de 2 910.5, que resultan ser valores más bajos que el grupo control con 3 544.3, al tener que la adición de OTA de nuevo ocasionó una disminución de 50% de títulos de anticuerpos. Para respaldar los resultados se han realizado pruebas complementarias como la medición proteínas totales, albúmina sérica y enzimas hepáticas así como revisión histopatológica de órganos como hígado, bazo y bolsa cloacal.

ABSTRACT

In order to demonstrate the negative effects of Ochratoxin type A (OTA) on the immune system, a group of fattening chickens vaccinated with Newcastle disease (ND) were challenged with this mycotoxin and subsequently were inoculated with Salmonella enterica serovariety Enteritidis (ES).

In this way OTA and ES were tested in isolation and together finding that the humoral response against NE decayed with the addition of OTA obtaining an antibody titer, to day 15, of 2 459.5, while with the inoculation of ES was obtained a value of 4 645.8, in conjunction were observed titles of 2 892.5 that compared against the control group with 8 278.6 can see a decrease of more than 50%. Today 29, with the addition of OTA a titer of 1 811.1 was presented, followed by OTA and ES with 2 124 and finally it with a value of 2 910.5, which turns out to be lower values than the control group with 3 544.3, having that the addition of OTA again caused a decrease of 50% of antibody titers. To support the results, complementary tests have been carried out such as the measurement of total protein, seric albumin and hepatic enzymes and histopathological revision of organs such as liver, spleen and cloacal bursa.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Mercado avícola para la producción de carne de pollo

La carne de pollo se trata de la proteína animal más importante y más accesible para la población mexicana en relación con otras como el pescado, la res o el cerdo. En la actualidad se ha puesto en juego la producción de carne de pollo en México, pues el alza demográfica nos obliga a producir mayor cantidad de carne de pollo – hablando en unidades toneladas - al año para abastecer a la población (Industria Alimenticia, 2017). Esta proteína representa 48.67% del volumen total de la producción nacional respecto a carne en canal (Consejo Mexicano de la Carne, 2018). Lo mencionado antes muestra un panorama general de la importancia de la carne de ave para México.

1.1.1 Panorama mundial

Para el 2015, se registró una producción de 2 973 mil toneladas de carne de pollo, siendo México el séptimo país productor a nivel mundial, mientras que EU se mantiene como el productor principal con 17 966 mil toneladas. México importó para el mismo año 778 mil toneladas de carne de pollo, posicionándose como el tercer país que más carne de ave importa. En 2017 México produjo 3 400 mil toneladas de carne de pollo colocándose como séptimo país productor a nivel mundial e importó 750 mil toneladas con una disminución de importación de 3.6% respecto al 2015 (Consejo Mexicano de la Carne, 2018 bis).

1.1.2 Panorama en Latinoamérica

Entre 2016 y 2017 la producción latinoamericana de pollo creció a un ritmo de 4% en pollos de engorda. Siendo Brasil el principal productor con 51% de los pollos latinoamericanos, seguido de México con 14.5%. México registró un aumento de 5.35% en 2017 con relación al año anterior en cuanto a la producción a nivel Latinoamérica. Siendo así, la producción fue de 605.7 millones más de pollos de engorda en el año (Ruíz, 2018).

1.1.3 Panorama en México

En 2015, México generó 3 175 000 toneladas de pollo que aunada a la producción de huevo con 2.6 toneladas y 1.1 toneladas de pavo sumaron en total 131 000 millones de pesos mexicanos en valor de producción nacional (Industria Alimenticia, 2017).

En 2016 se produjeron en México 1 667.63 millones de pollos de engorda, mientras que en 2017 se estimó una producción de 1 727.3 millones de pollos, teniendo un crecimiento de 3.5% con relación a la producción nacional del año anterior (Ruíz, 2018).

En diciembre de 2017 se estimó una producción mensual de 294 475 toneladas de carne de pollo mientras que, para el mismo mes, en 2018 se calculó que se produjeron 305 506 toneladas, lo cual implicó un aumento de 3.7% respecto al año anterior (SIAP, 2018).

Con base a lo anterior, el incremento en la exigencia productiva lleva consigo de forma inevitable nuevos riesgos que se convierten en auténticos retos para la cría de las aves. Los tóxicos producidos por hongos, conocidos como micotoxinas, suponen uno de los dos más importantes riesgos. Las micotoxinas afectan de manera negativa a la salud de los animales reduciendo directamente la eficiencia alimenticia donde al considerar el aumento de precios de las materias primas se impone la necesidad de mejorar dicha eficiencia (González, 2014).

1.2 Hongos productores de micotoxinas

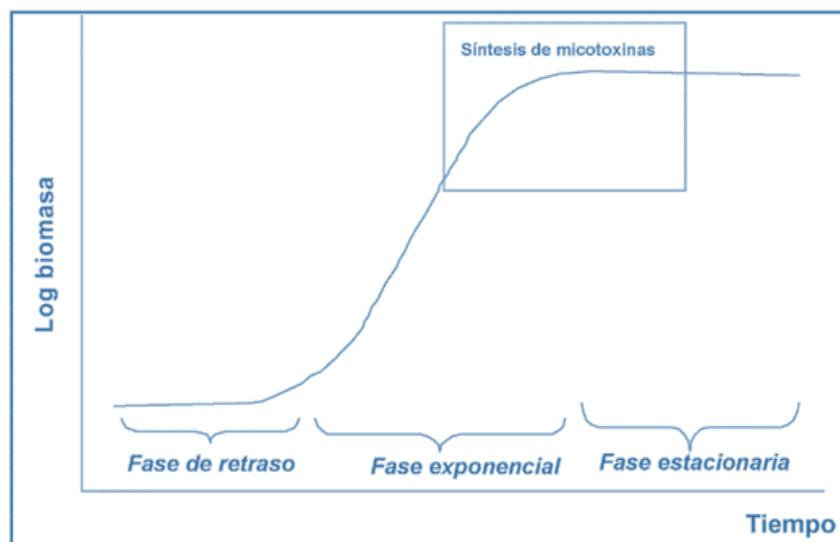
Dentro del reino de los hongos existen un grupo de hongos filamentosos, los cuales utilizan para su crecimiento una serie de sustancias químicas denominadas metabolitos primarios, como pueden ser ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos mayoritariamente. El uso de estos metabolitos primarios se asocia con la fase de crecimiento (Carlie *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 1995).

Los hongos crecen sobre materiales vegetales produciendo su deterioro. Forman metabolitos secundarios que favorecen la prevalencia del hongo frente a otros macroorganismos, muchos de los cuales son tóxicos para plantas y animales (Gómez, 2007).

Estos metabolitos son una serie de compuestos que no son esenciales para el crecimiento vegetativo en cultivo puro. Dentro de este grupo tenemos a los antibióticos y a las micotoxinas; estas últimas se suelen formar al final de la

fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento rápido del moho (Ilustración 1) (Carlie *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 1995). La ingesta y posterior afección de estas micotoxinas, que hacen enfermar a los animales, recibe el nombre de micotoxicosis (Gómez, 2007).

Ilustración 1. FASES DE CRECIMIENTO FÚNGICO Y LOCALIZACIÓN DE SÍNTESIS DE MICOTOXINAS



FUENTE: Soriano CJM (2007). Micotoxinas en alimentos. 1ª ed. Ediciones Díaz de Santos. España. P. 3 – 4.

1.2.1 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos de hongos que provocan cambios patológicos, tanto en seres humanos como animales mientras que la micotoxicosis son síndromes de la toxicidad resultante de la absorción de micotoxinas (FAO, 1991).

Se puede definir a una micotoxina como un producto natural producido por hongos que provocan una respuesta tóxica cuando se absorbe un bajo contenido de estas moléculas en vertebrados superiores y otros animales por una ruta o vía natural (Gómez, 2007).

El término micotoxina deriva de la palabra griega *mykes* (hongos) y del latín *toxicum* (veneno) (Torres *et al.*, 1995).

La toxicidad de las micotoxinas puede variar desde el desarrollo de actividades carcinogénicas, teratogénicas o mutagénicas hasta la producción de desórdenes de tipo hormonal o inmunosupresión y, dependiendo de la micotoxina, puede incluso ocasionar la muerte (De Lange *et al.*, 2000).

Las micotoxinas de mayor interés son las aflatoxinas, fumonisinas, *ocratoxina tipo A* (OTA), patulina, tricotecenos, zearalenona, etc. Las especies más frecuentes corresponden a los géneros *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.* y *Penicillium sp.* (Gómez, 2007), siendo la OTA una de las más importantes y de la que se hablará a continuación.

En el siguiente cuadro se enlistan los hongos productores de micotoxinas junto con las toxinas que producen respectivamente.

Tabla 1. HONGOS PRODUCTORES DE MICOTOXINAS	
Hongo	Toxina producida
Aspergillus	Aflatoxinas Esterigmatocistina Ocratoxina tipo A
Fusarium	Tricotecenos (DON, NIV, toxina T-2, DAS) Zearalenona, Fumonisinias Fusarina, moniliformina
Penicillium	Patulina, Citrinina Penitrem A Ocratoxina A Ácido ciclopiazónico
Alternaria	Alternariol
Claviceps	Alcaloides de ergotamina
Modificado de: Sanchis V, Martí S, Ramos AJ. Micotoxinas y seguridad alimentaria. Alimentación, Nutrición y Salud. 2004; 1: 17-23.	

1.2.2 *Ocratoxina tipo A*

Las ocratoxinas son un grupo de metabolitos tóxicos, producidas por varias especies de los géneros *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* (Etzel, 2002). Estos metabolitos están formados por un núcleo de isocumarina ligado a una molécula de L-fenilalanina y son designados A, B, C y D, siendo la OTA la más común y más tóxica para las aves (Swayne *et al.*, 2013).

La OTA fue originalmente aislada de *Aspergillus ochraceus*. Y es producida también por seis especies adicionales de *Aspergillus sp.* y un número similar de especies de *Penicillium sp.* (Huff *et al.*, 1981).

1.2.3 Metabolismo de la Ocratoxina tipo A

Tras la ingesta de la OTA se presenta una primera y rápida absorción de ésta en el estómago facilitada por sus propiedades ácidas, seguida de una absorción intestinal lenta favorecida por un gradiente de concentración entre la sangre y la luz intestinal (Galtier, 1991).

Una de las propiedades toxicocinéticas más significativas de la OTA es su alta afinidad por proteínas plasmáticas. Esta unión será determinante de la persistencia de la toxina en la sangre y por lo tanto de su toxicidad. El porcentaje de toxina unida a proteínas es muy alto en la mayoría de los casos y ello hace que la fracción libre sea menor de 0.2% (Delacruz *et al.*, 1990; Galtier, 1991).

La eliminación se da por filtración renal de los metabolitos tóxicos y por vía hepatobiliar (Hagelberg *et al.*, 1989).

1.2.4 Toxicidad

La OTA, que es la Ocratoxina más tóxica, es una nefrotoxina que causa hipertrofia y decoloración del riñón, así como acumulación de ácido úrico en humanos y cerdos. En aves se observa reducción en el crecimiento, disminución de la pigmentación y alteración en los procesos de coagulación sanguínea, también existe evidencia de problemas de patas en pollos de engorda; causa, además, inmunosupresión. A nivel celular, la OTA inhibe la síntesis de proteína (Etzel, 2002). Los signos clínicos, además de reducción y disminución en la ganancia de peso y pigmentación, incluyen enteritis y

diarrea; están relacionados con procesos infecciosos gastroentéricos asociados a fragilidad intestinal (Swayne *et al.*, 2013). La severidad del proceso toxicológico dependerá de la dosis ingerida de OTA y de complicaciones subsecuentes y pueden dividirse en intoxicaciones agudas, y crónicas.

1.2.5 Presentaciones clínicas

1.2.5.1 Intoxicación aguda

Durante la intoxicación aguda, los animales están deprimidos, con anorexia, ascitis, presentan edemas subcutáneos y mesentéricos (Etzel, 2002). A nivel histológico se observa nefrosis tubular e intersticial con inflamación heterofílica. Ocurren cambios vacuolares y necrosis en hepatocitos. La médula presenta supresión de la hematopoyesis y la depleción linfocítica ocurre en órganos linfoides (Swayne *et al.*, 2013).

1.2.5.2 Intoxicación crónica

En la intoxicación crónica disminuye el apetito y el crecimiento, aumenta el consumo de agua y aparece poliuria (Etzel, 2002; Romagnoli & Silva, 2009), glucosuria, proteinuria, enzimuria, disminución de la tasa de filtración glomerular y descenso de la osmolaridad de la orina (Scott, 1994).

1.2.6 Hallazgos micro y macroscópicos

La OTA produce a nivel histológico, edema, degeneración y necrosis epitelial tubular proximal y distal aguda en riñones, además de fibrosis intersticial. Inhibe la secreción normal de ácido úrico renal. A la necropsia, las lesiones incluyen palidez y tonalidad blanquecina de los riñones y del hígado. Los riñones afectados muestran, además, tumefacción, al tacto se perciben duros y pueden tener cristales de urato en forma de puntos blancos. Es mucho más frecuente que las aves sobrevivan con falla renal compensada y los riñones se observan agrandados, fibróticos y pálidos (Jordan *et al.*, 1998; Swayne *et al.*, 2013).

Gentles *et al.*, (1999) señaló que la OTA aumentó significativamente el ácido úrico sérico y los triglicéridos, pero redujo la proteína total, la albúmina y la concentración de colesterol, indicando que la baja concentración de proteína podría deberse a la reducción de la síntesis proteica hepática.

1.2.7 Influencia en la inmunidad

El mecanismo de acción de las micotoxinas sobre el sistema inmunitario es diferente, dependiendo del tipo de micotoxina que se trate. La inmunosupresión producida por micotoxinas se manifiesta como una disminución de los linfocitos T o B, supresión de los anticuerpos, retraso en la actividad de los macrófagos y neutrófilos o disminución de la actividad del complemento (Soriano, 2007) así como atrofia de los órganos linfoides durante el crecimiento de las aves. Las micotoxinas también ejercen daños

directos sobre el sistema inmune local a nivel del tracto gastrointestinal, incluyendo reducción de la integridad epitelial y función de la barrera epitelial (Davidson *et al.*, 2008).

La inmunosupresión inducida por las micotoxinas produce un efecto en cascada, el cual comienza por la reducción de la síntesis de proteína, disminución del nivel de albúmina y globulina séricas, reducción de los niveles de anticuerpos circulantes, el deterioro del sistema reticuloendotelial, reducción de la inmunidad mediada por células y el desarrollo anormal del timo y la bolsa cloacal. Además, la ocratoxicosis puede aumentar la susceptibilidad de las aves frente a la infección por *Salmonella sp.*, debido, en gran medida, al menor número de leucocitos circulantes y a su reducida capacidad fagocítica.

También se ha observado en pollos de engorda y otras especies de aves una menor respuesta inmunitaria a las vacunas. Se sabe que la ocratoxina causa regresión y agotamiento celular (linfocitos) de los principales órganos linfoides, lo que afecta de modo notorio la inmunidad celular en aves. En la ocratoxicosis se observa una supresión secundaria de inmunidad humoral menor y un decremento de inmunoglobulinas circulantes, como resultado del agotamiento de las células efectoras del sistema inmunológico, en especial los macrófagos (Beck *et al.*, 2016).

Efectos adicionales en la sangre incluyen anemia mielocítica y leucopenia. La OTA puede prolongar los tiempos de coagulación debido a una reducción de los factores de coagulación (Swayne *et al.*, 2013).

1.2.8 Importancia de la Ocratoxina tipo A en la industria avícola

La OTA comúnmente se encuentra contaminando maíz para alimentación de las aves. También se ha encontrado en sorgo, cacahuate, girasol, arroz y mijo, en menores cantidades. En gran número de muestras se han observado, también, la presencia de aflatoxinas (Swayne *et al.*, 2013).

La contaminación de los alimentos puede ocurrir en cualquier etapa en la producción de éstos hasta llegar al abastecimiento de granjas para alimentar a los pollos de engorda (Pinto *et al.*, 1996) y pueden resistir fácilmente bajo condiciones elevadas de temperatura y humedad (Swayne *et al.*, 2013). El nivel de contaminación de los granos cosechados al año puede variar de 25 a 40% (Sokoloviae *et al.*, 2008).

En un estudio se determinó que de 64 muestras de harina de soya 71.9% fue positivo a OTA. Asimismo, de 139 muestras de maíz 66.2% dio positivo a OTA (Castro *et al.*, 2015).

La alta ingesta de OTA provoca deterioro de la salud y de los parámetros zootécnicos de los animales. Las aves padecen depresión de la función inmune e incremento en la mortalidad; así como descenso en la utilización de la energía y la proteína. La OTA provoca mayor susceptibilidad a las enfermedades, problemas prolongados de salud en la parvada y posible falla de los programas de vacunación.

En conjunto, los efectos negativos por la intoxicación con OTA a partir de los alimentos contaminados, generan aumento en la susceptibilidad de los animales contra enfermedades gastroentéricas y multisistémicas comunes

como la salmonelosis, sobre todo, ante infecciones por enterobacterias cuyo impacto es económicamente grande (Denli *et al.*, 2006).

1.3 Salmonelosis

Las infecciones bacterianas causadas por el género *Salmonella* (salmonelosis) son responsables de enfermedades agudas y crónicas en las aves. Estas enfermedades causan pérdidas económicas importantes para los productores avícolas. Las aves y los productos avícolas están entre los más frecuentemente implicados como fuentes de alimento causantes de enteritis por *Salmonella sp.* en humanos (Swayne *et al.*, 2013).

El estrés por calor es capaz de aumentar las unidades formadoras de colonias de *Salmonella sp.* (UFC/g) en el bazo de los animales causando reducción en la ganancia de peso y en el consumo de ración y aumento en la mortalidad (Quinteiro-Filho *et al.*, 2010).

1.3.1 Género *Salmonella sp.*

El género *Salmonella* se considera uno de los más importantes patógenos transportados por alimentos, sobre todo los derivados de pollo, debido al hecho de que está distribuido de manera muy amplia en la naturaleza, a que cuenta con un gran número de reservorios, a que presenta serotipos inespecíficos a los hospederos y a que presenta cepas multirresistentes a los antimicrobianos (Bersot, 2006).

Las salmonelas tienen 40 factores de virulencia diferentes, mientras que algunas bacterias como *Escherichia coli* sólo tiene cinco. Crece a un pH de 6.5 a 7.5, pero puede sobrevivir a un pH de 4.5 a 9.5. La *Salmonella sp.* es un anaerobio facultativo que puede sobrevivir en ambientes de bajo oxígeno, por lo que puede sobrevivir en ambientes húmedos como la de las aves, siempre y cuando no pase por un ciclo de secado por calor (O'Keefe, 2013).

Dentro del género *Salmonella sp.* existen dos especies, una de las cuales (*Salmonella enterica*) incluye seis subespecies determinadas por reacciones bioquímicas. Sólo una de esas subespecies (*Salmonella enterica* subespecie *enterica*) es asociada con enfermedad en animales domésticos e incluye más de 2 500 serotipos como son *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Enteritidis (SE) y *S. enterica* subespecie *enterica* serovar Typhimurium (Swayne *et al.*, 2013).

1.3.2 Patogenia de *Salmonella sp.*

Después de la ingesta de agua y/o alimento contaminado, *Salmonella sp.* inicia su ciclo de infección invadiendo al hospedero a través de tejido linfoide, incluyendo las placas de Peyer y tonsilas cecales en las aves. Se adhiere apicalmente a las células epiteliales del íleon y a las células M (micropliegues en las Placas de Peyer) que, debido a la ausencia del borde de cepillo, representan una puerta de entrada ideal para las enterobacterias (Figuroa *et al.*, 2005).

Para un patógeno como SE, las células M forman una vía de acceso directo a la base de macrófagos y células dendríticas para el establecimiento de una infección intracelular y la difusión sistémica hacia hígado y bazo (Frías, 2009).

SE induce la migración de neutrófilos y macrófagos (PMN) así la liberación de citocinas proinflamatorias como IL8, GM-CSF, IFN γ , TNF α , GCP-2 (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos) GRO- α (gen α relacionado a crecimiento), GRO- β y GRO- γ que reclutan células fagocíticas y están involucradas en el proceso diarreico, también se habla de un quimioatrayente, aún no caracterizado, conocido como PEEC (pathogen-elicited epithelial chemoattractant). En la cara apical y lateral de los enterocitos sobreexpresa ICAM-1, que colabora en el movimiento fagocítico de los heterófilos (Figueroa *et al.*, 2005).

1.3.3 *Salmonella enteritidis*

Desde principios de 1980 se produjo un aumento mundial de casos de infecciones por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariedad Enteritidis (SE), lo que produjo un incremento de estas infecciones en el humano y en aves comerciales, provocando pérdidas económicas en la industria avícola (Hogue *et al.*, 1997).

SE es un enteropatógeno con frecuencia involucrado en brotes de infecciones transmitidas por alimentos, asociadas con el consumo de alimentos de origen aviar, tales como huevos y carnes mal cocidas (Prado *et al.*, 2002; Molback *et al.*, 2002).

SE es un serotipo adaptado en humanos. La población puede ser portador sano o asintomático, lo cual dificulta su control y aumenta el riesgo de infección de personas hacia aves y viceversa (O'Keefe, 2013).

En el sector avícola, la infección puede provocar serios problemas tanto en las gallinas de postura como en engorda; la infección a temprana edad puede producir mortalidad y disminución de la eficiencia productiva en las aves adultas; no obstante, la mayoría de las aves quedan en estado de portadoras sin presentación de signos (Gast, 1994).

1.3.4 Control y prevención contra SE

Entre las medidas tradicionales de control y prevención destacan: utilización de pre y probióticos, medidas de bioseguridad (control de roedores y aves migratorias), vacunación y antimicrobianos; actualmente se ha comenzado a implementar el uso de bacteriófagos líticos.

Ninguna de estas medidas, aisladas o en asociación, ha logrado la eficiencia esperada por el sector avícola y con la emergencia de cepas multirresistentes a antimicrobianos el escenario de la salmonelosis se ha complicado al limitar con ello el abordaje profiláctico en animales (Borie *et al.*, 2008).

Las complicaciones de la ingesta de OTA junto con un proceso infeccioso por SE se ve reflejado sobre todo en el estado de salud de los pollos, en sus parámetros productivos y, no menos importante, en su estado inmunológico. Este último cobra gran importancia debido a que los programas de vacunación pueden llegar a ser infructíferos y fallar contra posibles brotes de

enfermedades, algunas de ellas tan importantes como la enfermedad de Newcastle.

1.4 Enfermedad de Newcastle

La enfermedad de Newcastle (EN) fue descubierta en 1926 en Indonesia (Luo *et al.*, 2013) y es conocida por las pérdidas económicas que causa a la industria avícola mundial, por ello es catalogada por OIE como una de las enfermedades de los animales terrestres de declaración obligatoria (Gu *et al.*, 2011).

1.4.1 Generalidades de la EN

La EN es producida por el *Paramyxovirus* aviar tipo 1. Este virus se distingue por poseer hemoaglutininas, polipéptidos que permiten a las partículas virales aglutinar eritrocitos de ave; así como una enzima denominada neuraminidasa responsable del efecto de elución (Miller *et al.*, 2009).

La infección es altamente contagiosa y mortal, afecta a más de 250 especies de aves incluidas las domésticas y silvestres, en especial a las aves de producción (Luo *et al.*, 2013).

En México, el virus de la EN fue reportado por primera vez en 1946 y entre 1970 a 1980 fue reconocida como infección endémica difícil de controlar y se describió que la prevención es posible al evitar el contacto entre las aves y el

virus de campo, así como utilizar programas de vacunación (Merino *et al.*, 2009).

1.4.2 *Respuesta inmune contra la EN*

1.4.2.1 *Respuesta innata*

La respuesta inmune inicial contra el virus es de tipo celular y puede ser detectada en 2 o 3 días posinfección con cepas vacunales vivas.

Los principales componentes de la inmunidad innata son: las barreras físicas; células fagocíticas, incluidos macrófagos y células asesinas naturales (NK); las proteínas del complemento y los mediadores de las respuestas inflamatorias; y citocinas. En general, es una respuesta inmediata que se activa por patrones propios de los patógenos conocidos como patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP).

La infección *in vitro* con el virus de la EN, resulta en la inducción de óxido nítrico en células mononucleares y heterófilos de aves. La infección en heterófilos de ave disminuyó la capacidad de fagocitar a las bacterias, alterando su función fagocítica y haciendo a las aves más susceptibles a una infección secundaria (Kapczynski, 2013).

1.4.2.2 *Inmunidad adquirida contra la EN*

Cuando las aves sobreviven a la infección, los anticuerpos pueden detectarse en suero de 6 a 15 días posinfección. El título depende en gran medida de la

cepa infectante. En condiciones normales, la respuesta máxima se presenta de 3 a 4 semanas posinfección.

Después de la exposición al virus de la EN, los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas que secretan tres tipos de anticuerpos neutralizantes específicos para el antígeno; los anticuerpos IgM, IgY (IgG aviar equivalente) e IgA son producidos como parte de la respuesta inmune. Los anticuerpos se detectan en el sitio de infección y circulantes en sangre a partir de los seis días después de la infección o la vacunación con virus vivos, el pico de anticuerpos se alcanza entre los 21 a 28 días después de la infección (Kapczynski, 2013).

1.4.3 Prevención mediante vacunación

Existe en el mercado una vacuna recombinante (quimera) comercial que comparte gran homología con las cepas de desafío de México (cep rP05). Esta vacuna usa como vector a la cepa virulenta P05 (Absalón *et al.*, 2012) del genotipo V del virus de la EN aislada de un brote en el estado de Puebla en 2005, expresa el gen de la proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) de alta patogenicidad y el gen que codifica para la proteína de fusión fue modificado a nivel genético en la secuencia de aminoácidos en el sitio de activación con el objetivo de cambiar su genoma altamente virulento a uno similar al de la cepa LS y así disminuir su virulencia (Morales *et al.*, 2011).

2.0 JUSTIFICACIÓN

Las micotoxinas como la OTA, presentes en muchos granos destinados a la alimentación de las aves de engorda, generan disminución en los parámetros productivos y en la inmunidad de éstas. En consecuencia, aumenta la susceptibilidad hacia enfermedades importantes como la salmonelosis, además de los efectos negativos que se generan en los cuadros de vacunación.

Con base a lo anterior, la importancia radica en el aumento de pérdidas por mortalidad generada por infecciones secundarias, y disminución en la ganancia de peso y aumento en la susceptibilidad hacia posibles brotes virales por una baja eficiencia en la respuesta humoral de las aves de engorda.

Por estas razones se pretende evaluar el efecto de dietas con OTA junto con la inoculación de SE y la relación de los efectos de estos últimos con la respuesta humoral generada por la vacunación contra Newcastle.

3.0 HIPÓTESIS

El consumo de alimento contaminado con ocratoxina tipo A por pollos de engorda vacunados contra la enfermedad de Newcastle y desafiados con *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis causará alteración en la respuesta inmune humoral, así como lesión tisular y celular.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la respuesta inmune humoral en aves de engorda en etapa de iniciación vacunadas contra la enfermedad de Newcastle, desafiadas con Ocratoxina tipo A (OTA) y *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis (SE).

4.2 Objetivos particulares

- Se cuantificará la respuesta humoral a través de los títulos de anticuerpos vacunales contra la enfermedad de Newcastle en los diferentes tratamientos a partir de una prueba inmunológica por medio de la técnica de ELISA indirecta.
- Se evaluarán el desarrollo de órganos a través del índice morfométrico (hígado, bazo y bolsa cloacal) en aves sometidas a diferentes tratamientos.
- Se evaluarán las alteraciones histológicas (hígado, bazo y bolsa cloacal) en aves sometidas a diferentes tratamientos.
- Se cuantificarán y evaluarán las alteraciones en diferentes analitos sanguíneos: proteínas totales (PT), albúmina sérica (ALB), enzimas de restricción hepática como son: alaninoaminotransferasa (ALT) y gammaglutamiltranspeptidasa (GGT) en aves sometidas a diferentes tratamientos.

5.0 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 80 aves Cobb 500, de un día de edad, sin sexar distribuidos de modo aleatorio en cuatro tratamientos (Tabla 2) con un par de repeticiones; cada repetición con 10 aves, durante 29 días y bajo condiciones monitoreadas respecto a temperatura de cajones, ambiental y humedad relativa; las aves tuvieron agua y alimento a libre acceso.

Los tratamientos estuvieron conformados por los siguientes grupos:

TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS UTILIZADOS				
Tratamiento/contenido	CO	OTA	SAL	OTA+SAL
SE (UFC)	0.0	0.0	1x10 ⁸	1x10 ⁸
OTA (µg/kg)	0.0	100	0.0	100

TRATAMIENTOS: CONTROL = SIN TOXINA, SIN SALMONELLA; OTA = OCRATOXINA 100 µg/kg, SIN SALMONELLA; SAL = SALMONELLA, 1X10⁸, SIN TOXINA; OTA + SAL = OCRATOXINA (100 µg/kg)+ SALMONELLA (1X10⁸).

5.1 Actividades realizadas

- Durante el día 1 se recibieron a las aves en el bioterio, fueron pesadas y agruparon aleatoriamente en los diferentes tratamientos.
- Para el día 7 se pesó de nuevo a cada ave en cada tratamiento incluyendo su repetición y se vacunó contra Newcastle.
- En el día 15 se pesó a todas las aves y se eligieron al azar cinco aves para obtención de sangre.
- Al día 21 se realizó pesaje de los animales y se revacunó contra Newcastle.

- Para concluir se pesó por última vez a las aves el día 29, se obtuvieron muestras de sangre de seis animales manera aleatoria para cada tratamiento incluyendo a su repetición, se eutanasió, se pesó y se realizó necropsia, los órganos fueron pesados y procesados para elaborar las laminillas histológicas.
- Después de este periodo, el procesamiento del suero, medición de analitos y elaboración de laminillas requirió de tiempo aleatorio por la disponibilidad de las instalaciones que se necesitaron en aquel momento.
- Cada día se cambió el agua, se midió temperatura, humedad relativa, se adicionó alimento suficiente, siempre llevando registros del alimento consumido y alimento adicionado.
- Al finalizar el proyecto, los datos obtenidos fueron evaluados mediante análisis estadístico para cada variable, se realizaron con base en un diseño completamente al azar (ANDEVA) y la comparación de medias se hizo utilizando la prueba de Tukey (con un valor de significancia de $\alpha < 0.05$). Para el análisis se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Centurión 16.

6.0 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en las siguientes instalaciones:

- El modelo experimental, manejo de las aves, obtención de muestras serológicas, eutanasia y procesamiento de órganos se realizó en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Campo 4).
- La producción y obtención de la OTA se realizó en el Centro de Asimilación Tecnológica (Campo 3) en la Unidad de Investigación de granos y semillas (UNIGRAS).
- La medición de la OTA y el procesamiento de bioquímica sanguínea se realizó en el laboratorio 14, en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM).
- El cultivo de SE se realizó en el laboratorio de bacteriología y micología veterinarias de la FESC.
- El procesamiento de muestras y evaluación histopatológica fue realizado en el Laboratorio de Patología Veterinaria de la FESC.
- La mezcla del alimento con los diferentes tratamientos se elaboró en la caseta de producción avícola en el Centro de Enseñanza Agropecuaria (CEA).

6.1 Modelo biológico

Las aves, Cobb 500 de un día de edad sin sexar, fueron compradas en una empresa que comercializa aves de engorda; se adquirieron ocho aves extra para cada tratamiento por posible mortalidad durante el estudio, siendo 88 aves en total.

6.2 Ocratoxina tipo A

Se utilizó una cepa de campo de *Aspergillus ochraceus* donada por la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM.

La cepa se sembró en medios de cultivo con agar CZAPEK en cuatro cajas de petri estándar y se mantuvieron durante 15 días en incubadoras 815-Precision Scientific Inc® a temperatura de 28 °C.

Para la obtención de la micotoxina se utilizaron 6 kg de sorgo que antes fue limpiado por tamizado en cribas de diferente medida para eliminar impurezas y de forma manual se quitaron los granos en mal estado. Después se realizó la limpieza de frascos con capacidad de 2 kg para colocar allí el grano a razón de 1.5 kg de grano por frasco. Hecho esto, se procedió a esterilizar los frascos con el sorgo. Una vez esterilizados y a temperatura ambiente se calculó la humedad relativa y se ajustó a 19% para promover el crecimiento de la cepa. Se realizaron seis cortes con sacabocados en el cultivo de o de *A. ochraceus* y con un asa de inoculación se depositaron los seis cortes en cada frasco colocando a diferente profundidad, para promover un crecimiento uniforme

dentro de los frascos. Éstos se mantuvieron durante 25 días en una incubadora 815-Precision Scientific Inc® a 27 °C con una humedad relativa de 19%.

Una vez pasados los 25 días, se esterilizó cada frasco para eliminar al hongo y esporas presentes, así preservando sólo a la OTA. Se hizo un muestreo aleatorio y se tomaron 100 g de muestra, se le adicionaron 10 g de sal (NaCl) y se colocó en una licuadora, se le agregaron 200 mL de metanol:agua (80:20), se licuó a alta velocidad por 1 min y el extracto se colocó en un filtro de papel aflautado para después recolectar lo filtrado en un recipiente. Se obtuvieron de este extracto 10 mL al que se le agregaron 40 mL de PBS Tween 20 a 0.1%. Por último, esta solución se filtró de nueva cuenta con una microfibra de vidrio de 1.0 µm (VICAM #g2005®). Con la ayuda del Kit OchraTest® del laboratorio VICAM se midió la cantidad de OTA basándonos en la metodología presentada por el laboratorio, el cual indica que a partir del empleo de columnas con anticuerpos monoclonales que después fueron interpretadas por medio de un análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución con fluorescencia.

Con una mezcladora para alimento Mix20-RODAS® se mezcló alimento comercial cuanto baste para el periodo de estudio con una matriz de alimento contaminado con una concentración de OTA a 100 µg/kg, este alimento fue para los tratamientos OTA y OTA+SAL.

6.3 *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis

El cultivo puro de SE fue otorgado por el laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinarias de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM.

Se cultivó con un asa de inoculación en un medio de cultivo líquido elaborado en un matraz de una capacidad de 60 mL por tres días, iniciando el día 23 para poder inocular a las aves el día 26, 27 y 28. Se realizó una dilución en el nefelómetro de MacFarlan para obtener una concentración de 1×10 UFC que después fue administrado a razón de 1 mL por ave en los tratamientos SAL y OTA+SAL.

La inoculación se realizó mediante sondas esofágicas por tres días seguidos iniciando el día 26 para cada tratamiento correspondiente.

6.4 Instalaciones y corraletas para aves

Se contó con un espacio dividido en dos secciones, una de ellas fungió para montar el estudio. El espacio se limpió y desinfectó con jabón común y cloro comercial, se colocó en el suelo un plástico protector y aislante, en el techo se colocó una red de hilo cáñamo donde se instaló un cableado específico para adaptar focos térmicos infrarrojos de la marca OSRAM® de 200 w y termostatos eléctricos de la marca SET®, modelo STC-9200, en esta misma red se colocó una serie de termómetros ambientales FridgeFrezer-HOOK® para controlar la temperatura del espacio de estudio. Para separar los tratamientos

se elaboraron ocho corraletas, con espacio suficiente para 15 aves, con rejillas plásticas Chick-Fence-Sephnos® lavadas y desinfectadas, cada corraleta estaba rotulada con el tratamiento a la que correspondía, contaba con un foco térmico y un termostato, además de un comedero TurboGrow-Sephnos® con capacidad para 5 kg y un bebedero plástico Inginition-Sephnos®; el bebedero y comedero estaban al nivel de piso, después y cuando las aves alcanzaron mayor altura, se colocó una base elevadora BaseMaxI Sephnos® y BaseMaxII Sephnos® en los bebederos y comederos respectivamente. La base de cada cajón cubierto con viruta de madera alcanzando un espesor de 5 cm. La puerta para entrar hacia los animales fue cubierta con un tapete sanitario con cloruro de benzaldehído de la marca KRIT® Germicida. Un día antes de la llegada de las aves se procedió a desinfectar el área con un sanitizante Orgánico RBM-TK® a base de compuestos orgánicos cítricos.

6.5 Alimento comercial

En este estudio se utilizó un alimento comercial para aves de iniciación cubriendo los requerimientos según la National Research Council (NRC). Dicho alimento tenía 22% de proteína cruda, 5% de grasas crudas, 5% de cenizas, 8% de humedad y 60% de extracto libre de nitrógeno.

Se dispuso de suficiente alimento para concluir el estudio y se fue seleccionando un gramaje suficiente para realizar una mezcla con la matriz contaminada con OTA para obtener un alimento con 100 µg/kg para aquellos tratamientos que requirieran de éste.

6.6 Procesamiento de las muestras

6.6.1 Toma de muestra sanguínea y obtención de suero

Los días 15 y 29 se tomaron seis muestras de 5 mL de sangre de cada tratamiento mediante punción intracardiaca con jeringas 21G X 32 mm BD®; la muestra fue colocada en tubos sin anticoagulante BD® y posteriormente fueron colocadas en gradillas de goma a temperatura ambiente, cuando la muestra ya estaba coagulada se procedió a centrifugar a 2 500 RPM por 10 min en una centrífuga VanGuardV6500-HAMILTONBELL®; el suero fue vertido en viales de vidrio estériles rotulados para su manejo, por último, fueron congelados para su futuro análisis.

6.6.2 Cuantificación de anticuerpos contra Newcastle

Para la titulación de anticuerpos se procedió a descongelar a temperatura ambiente los viales correspondientes al suero de las aves muestreadas los días 15 y 29. Se requirió del uso de una placa comercial Newcastle Disease Antibody Test Kit (NDV®) de Biochek, los sueros fueron preparados para hacer la medición de cada muestra basándonos en los procedimientos para la lectura e interpretación diseñados por BioChek Smart Veterinary Diagnostics®.

La placa fue leída con un lector de ELISA automático Elx800 de la marca BIO-TEK®.

6.6.3 Laminillas histológicas y micrografías

Los órganos que se utilizaron para la realización de las laminillas fueron hígado, bazo y bolsa cloacal. Se procedió a cortar seis muestras de cada órgano mencionado por cada tratamiento en las aves que fueron eutanasiadas, se colocaron en frascos plásticos con formol a 10%, después de siete días se cortaron y se acomodaron en rejillas específicas para histología. Todos los implementos estaban antes rotulados con el nombre de los órganos y tratamientos correspondientes. Los tejidos ya fijados fueron procesados por el personal del Laboratorio de Histopatología del área de Patología Veterinaria de la FESC.

6.6.4 Bioquímica sanguínea

La medición de los valores bioquímicos y enzimas hepáticas fue realizada con un analizador semiautomático Innovation Biotech Co.® Modelo INV-1172 y se utilizaron reactivos del laboratorio WIENER-LAB®.

Se procedió a descongelar las muestras a temperatura ambiente. Para la medición se utilizó la metodología descrita por el laboratorio WIENER-LAB®.

6.6.4.1 Proteínas totales

Las proteínas totales se midieron bajo un análisis colorimétrico para proteínas totales-AA diseñado por WIENER-LAB®. Cuyo fundamento es una reacción entre los enlaces peptídicos con un ion cúprico en un medio alcalino, leída a una absorción de 540 nm.

6.6.4.2 Albúmina

La albúmina fue medida bajo un análisis colorimétrico para albúmina-AA diseñado por el laboratorio WIENER-LAB®. Dicha medición se fundamenta en la reacción específica de la forma aniónica de la 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfon ftaleína (BCG). La lectura se realizó a 625 nm.

6.6.4.3 Alanina aminotransferasa (ALT)

La ALT fue medida bajo el diseño analítico del laboratorio WIENER-LAB® donde se utilizó la técnica de reactivo único mezclando cuatro partes de reactivo A con una parte de reactivo B descrito por el laboratorio, leyendo la absorbancia/min a 340 nm de la muestra tres veces y promediando los resultados para obtener un valor único.

6.6.4.4 Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)

La GGT fue medida bajo el diseño analítico del laboratorio WIENER-LAB® donde se utilizó la técnica de reactivo único mezclando cuatro partes de reactivo A con una parte de reactivo B descrito por el laboratorio. Esta prueba se fundamenta en la reacción entre GGT que es una carboxipeptidasa con la glicilglicina mediante catalización. La muestra se lee a 410 nm y se registra la absorbancia/min tres veces y se obtiene un promedio que se utiliza para obtener el resultado final.

7.0 RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados expresados en media estadística +/- error estándar clasificados por orden de importancia y parámetro compatible y agrupado. En los anexos se exhiben los resultados en expresión gráfica clasificados de igual forma y las histogramas de los órganos estudiados a diferente aproximación, ordenados por tratamiento (tx) comenzando por el tx Control (CO), seguido de tx Ocratoxina tipo A (OTA), tx SE (SAL) y tx Ocratoxina tipo A + SE (OTA+SAL). Para mayor comprensión se observa en azul los datos más altos y en rojo los más bajos mientras que las literales indican la diferencia estadística.

7.1 Cuantificación de títulos de anticuerpos al día 15 y 29

TABLA 3. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA NEWCASTLE CEPA VACUNAL PARA EL DÍA 15 Y 29 POR EL MÉTODO ELISA			
TRATAMIENTO	MUESTRA	DÍA 15	DÍA 29
		MEDIA ± EE	MEDIA ± EE
CONTROL		8278.6 ± 965.3 ^c	3544.3 ± 432.6 ^c
OTA		2459.5 ± 80.5 ^a	1811.1 ± 59.9 ^a
SAL		4645.8 ± 518.0 ^b	2910.5 ± 281.3 ^{bc}
OTA + SAL		2892.5 ± 233.8 ^{ab}	2124.0 ± 12.5 ^{ab}

TRATAMIENTOS: CONTROL = SIN TOXINA, SIN SALMONELLA; OTA = OCRATOXINA 100 µg/kg, SIN SALMONELLA; SAL = SALMONELLA, 1X10⁸, SIN TOXINA; OTA + SAL = OCRATOXINA (100 µg/kg)+ SALMONELLA (1X10⁸). Las literales diferentes muestran diferencia estadística significativa.

En el día 15 se muestra que el tx CO se mantuvo con el título más alto de 8 278.6; en contraposición, el tx OTA se obtuvo el valor más bajo con 2 459.5. Mientras que en el día 29, el tx CO mostró una disminución de 57.2%, seguido por los tratamientos: SAL con 2 910.5 y OTA+SAL con 2 124 y OTA con 1 811.1.

7.2 Relación del peso de bazo, bolsa cloacal e hígado respecto al peso del ave

ÓRGANO	BAZO	BOLSA CLOACAL	HÍGADO
TRATAMIENTO	MEDIA ± EE	MEDIA ± EE	MEDIA ± EE
CONTROL	0.12 ± 0.01 ^{bc}	0.09 ± 0.00 ^a	10.81 ± 1.00 ^b
OTA	0.07 ± 0.00 ^a	0.15 ± 0.00 ^b	2.27 ± 0.26 ^a
SAL	0.14 ± 0.01 ^c	0.15 ± 0.01 ^b	3.22 ± 0.13 ^a
OTA + SAL	0.10 ± 0.00 ^b	0.22 ± 0.00 ^c	2.51 ± 0.14 ^a

TRATAMIENTOS: CONTROL = SIN TOXINA, SIN SALMONELLA; OTA = OCRATOXINA 100 µg/kg, SIN SALMONELLA; SAL = SALMONELLA, 1X10⁸, SIN TOXINA; OTA + SAL = OCRATOXINA (100 µg/kg)+ SALMONELLA (1X10⁸). Las literales diferentes muestran diferencia estadística significativa.

El bazo se observa muy disminuido en tamaño para el tx OTA con 0.07%, en contraparte el tx SAL con 0.14% presenta el valor más alto, mientras que el tx OTA+SAL está por debajo del tx CO con 0.10 y 0.12% respectivamente. La bolsa cloacal se observó muy disminuida de tamaño para el tx CO con 0.09, mientras que el tx OTA+SAL obtuvo el valor más elevado siendo 0.22. El hígado se observó muy agrandado de tamaño en el tx CO con 10.81%, mientras que los demás tratamientos se mantuvieron dentro de 2.27 a 3.22%.

7.3 Cuantificación de analitos al día 15

TABLA 5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES, ALBÚMINA, GGT Y ALT CORRESPONDIENTES AL DÍA 15				
ANALITO	PROTEÍNAS TOT. g/L	ALBÚMINA U/L	GGT U/L	ALT U/L
TRATAMIENTO	MEDIA ± EE	MEDIA ± EE	MEDIA ± EE	MEDIA ± EE
CONTROL	0.33 ± 0.01 ^a	0.1 ± 0.01 ^b	1.13 ± 0.21 ^a	0.17 ± 0.09 ^a
OTA	0.30 ± 0.05 ^a	0.09 ± 0.06 ^{ab}	1.49 ± 0.0 ^{ab}	0.10 ± 0.0 ^a
SAL	0.32 ± 0.02 ^a	0.07 ± 0.01 ^a	1.06 ± 0.51 ^a	0.16 ± 0.02 ^a
OTA + SAL	0.27 ± 0.00 ^a	0.06 ± 0.01 ^a	2.0 ± 0.0 ^b	0.25 ± 0.10 ^a

TRATAMIENTOS: CONTROL = SIN TOXINA, SIN SALMONELLA; OTA = OCRATOXINA 100 µg/kg, SIN SALMONELLA; SAL = SALMONELLA, 1X10⁸, SIN TOXINA; OTA + SAL = OCRATOXINA (100 µg/kg)+ SALMONELLA (1X10⁸). Las literales diferentes muestran diferencia estadística significativa.

El tx CO siempre se mantuvo con los valores de PT y ALB más elevadas, con 0.33 y 0.1 respectivamente. El tx OTA+SAL obtuvo los valores más altos para GGT con 2.0 y 0.25 para ALT. Mientras que para GGT y ALT los valores más bajos fueron dados por el tx SAL y OTA, respectivamente.

7.4 Cuantificación de analitos al día 29

TABLA 6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES, ALBÚMINA, GGT Y ALT CORRESPONDIENTES AL DÍA 29				
ANALITO	PROTEÍNAS TOT. g/L	ALBÚMINA U/L	GGT U/L	ALT U/L
TRATAMIENTO	MEDIA ± EE	MEDIA ± EE	MEDIA ± EE	MEDIA ± EE
CONTROL	0.20 ± 0.02 ^b	0.12 ± 0.00 ^{ab}	1.80 ± 0.21 ^a	0.11 ± 0.01 ^a
OTA	0.16 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.00 ^a	2.28 ± 0.03 ^{ab}	0.38 ± 0.04 ^b
SAL	0.34 ± 0.01 ^d	0.32 ± 0.00 ^c	2.25 ± 0.12 ^{ab}	0.37 ± 0.03 ^b
OTA + SAL	0.30 ± 0.00 ^c	0.19 ± 0.04 ^b	2.47 ± 0.01 ^b	0.29 ± 0.05 ^b

TRATAMIENTOS: CONTROL = SIN TOXINA, SIN SALMONELLA; OTA = OCRATOXINA 100 µg/kg, SIN SALMONELLA; SAL = SALMONELLA, 1X10⁸, SIN TOXINA; OTA + SAL = OCRATOXINA (100 µg/kg)+ SALMONELLA (1X10⁸). Las literales diferentes muestran diferencia estadística significativa.

El tx OTA se mantuvo muy por debajo de los demás tratamientos para el caso de PT con un 0.16, siendo el valor más alto para el tx SAL con 0.34. La albúmina se observó muy aumentada en el tx SAL con 0.32 y el valor más bajo fue del tx OTA con 0.08. El tx OTA+SAL obtuvo 2.47 para GT siendo el más alto, mientras que el ALT el valor más alto de 0.38 fue para OTA.

8.0 DISCUSIÓN

Autores como Soriano (2007), Swayne *et al.* (2013), Beck *et al.* (2016) concuerdan con que la presencia de OTA genera un deterioro del sistema inmune expresado como una disminución en la producción de inmunoglobulinas y un deterioro en células fagocíticas, dicho esto podemos determinar que, efectivamente se observó el título de anticuerpos más bajo, de día 15 y 29, para el tx OTA en comparación con el tx CO, seguido de éste por el tx OTA+SAL, cabe mencionar que ante la presencia de SE sí se observó un aumento de anticuerpos como respuesta, pero no fue tan elevada como se esperaría si la OTA no estuviera presente (Tabla 3). Beck *et al.* (2016) sugieren que la degeneración inmunológica puede ser ocasionada, también, por un desarrollo anormal de los órganos linfoides o de su atrofia. En contraposición, en este caso no se observó una depleción marcada del órgano, sino que para el caso de la bolsa cloacal en el tx OTA, tx SAL y tx OTA+SAL hubo un aumento de tamaño (Anexo 2).

Swayne *et al.* (2013) mencionan que la OTA, en un cuadro agudo, genera depleción de órganos linfoides. En nuestro caso, sólo se observó una disminución del tamaño del bazo para los tx OTA y tx OTA+SAL, lo cual es sugestivo de atrofia y pérdida de centros linfoides, observando al tx SAL con el valor predominante, nos sugiere que el órgano presentó a hiperplasia como mecanismo inmune para contrarrestar a SE y en contraparte a los tratamientos antes mencionados como órganos incapaces de hacer frente a la enfermedad. Mientras que Beck *et al.* (2016) sugieren que la presencia de OTA y otras micotoxinas genera un crecimiento anormal de la bolsa cloacal, nosotros

observamos un efecto contrario, donde el tx CO presentó el valor más bajo respecto al tamaño del órgano, aún por debajo del tx OTA; por otro lado el tx OTA+SAL arrojó el valor más elevado, lo cual puede indicar que el efecto de la OTA no fue suficiente para generar depleción linfocítica, aunado a la respuesta inmune celular contra SE mediante un proceso mitótico favorable. Cabe mencionar que el autor mencionado trabajó con más de una micotoxina, por lo que los daños pueden ser aún mayores, así lo indica Bennett *et al.*, (2003), quienes estipulan que las intoxicaciones por micotoxinas rara vez ocurren aisladas y donde la interacción entre dos o más clases de micotoxinas puede resultar en un daño aditivo o sinérgico. Para el caso del tejido hepático se observa una disminución en el tamaño de todos los órganos de los tx OTA, SAL y OTA+SAL. En las micrografías (Anexo 2) se aprecia un cambio vacuolar y necrosis significativos en los tratamientos mencionados. Etzel *et al.* (2002) y Swayne *et al.* (2013) han postulado que la OTA disminuye la síntesis de proteína, sobre todo la proveniente de hígado, además genera cambios vacuolares y necrosis, por cuyas razones se pueden presentar órganos muy pequeños en comparación con el tx CO. Cabe mencionar que Gentles *et al.* (1999) observaron valores bajos de proteína total y albúmina sérica a causa de la disminución en la síntesis hepática de estas. Jordan *et al.* (1998) y Swayne *et al.* (2013) mencionan el hallazgo de tejidos hepáticos blanquecinos o pálidos con necrosis en aves con ocratoxicosis crónica, con una disminución en el tamaño. En nuestras micrografías (Anexo 2) se observó no sólo vacuolización y necrosis en los tx OTA y OTA+SAL, sino que también en el tx SAL, aunado a este daño se observó infiltración linfocítica y granulocítica en las áreas perivasculares, siendo estos resultados posible efecto de un cúmulo de

colonias bacterianas en este tejido. Aunque los resultados en cuanto a comparación de tamaños, se aprecia una brecha muy grande entre el tx CO y los demás tratamientos. Beck *et al.* (2016) indican que la OTA puede facilitar la colonización multiorgánica por parte de SE, esto puede justificar el hallazgo tan notorio de células inflamatorias en el tejido hepático, además del esplénico (Anexo 2), como un signo de una colonización activa de SE en órganos como bazo e hígado como lo indican Figueroa *et al.* (2015) quien menciona que SE puede ser fagocitada y, protegida en el fagosoma, ser redirigida a estos últimos órganos para una posible infección multisistémica.

Para la cuantificación de las proteínas totales y albúmina del día 15, se mantuvo el tx CO con los valores más altos, mientras que el tx OTA+SAL y tx OTA obtuvieron los más bajos. El tx OTA+SAL mostró el valor más bajo de albúmina, seguido por el tx SAL. Estos resultados indican una disminución de proteína y de albúmina sérica en comparación con el tx CO tal y como lo establecen Gentles *et al.* (1999) y Etzel (2002) quienes mencionan que se ve reducida la formación de proteína y con ello una falla en la respuesta inmune humoral. El tx OTA cuenta con los valores más bajos de PT y ALB para el día 29, lo cual indica que ciertamente, la inmunidad humoral disminuye junto con el metabolismo de las proteínas de origen hepático según indican Beck *et al.* (2016), es importante mencionar que según Scott (1994) parte de la hipoproteinemia puede deberse a la proteinuria a consecuencia del cuadro nefrótico. El tx SAL obtuvo, para el día 29, los valores más altos para PT y ALB, haciendo evidente una respuesta activa contra el cuadro bacteriano.

Respecto a GGT y ALT, Campbell (2004) y Lumeij (1997) indican que la micotoxicosis genera un aumento de ALT, GGT y AST como indicativo de lesión hepatobiliar y renal. Para GGT y ALT al día 15 el tx OTA+SAL se mantuvo con los valores más altos, pero dentro del rango normal según indican los autores antes mencionados. Para el día 29 tx OTA+SAL obtuvo el valor más alto de GGT mientras que el tx OTA lo obtuvo en ALT. Cabe mencionar que para el día 15, los tx CO presentaron una cifra más alta que tx OTA y tx SAL para ALT lo cual podría indicar que existe un factor desconocido que está generando un daño leve pero significativo en el tx CO. Al día 29 el tx OTA+SAL en conjunto ejercen un daño sinérgico a nivel hepático pues el valor es más elevado de GGT que el tx OTA y tx SAL por separado, aunque para ALT el tx OTA+SAL obtuvo un valor por debajo del tx OTA y tx SAL.

9.0 CONCLUSIONES

9.1 Conclusión general

La administración de alimento contaminado con Ocratoxina tipo A con una posterior inoculación de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis disminuyó de manera notoria la respuesta inmune en aves de engorda vacunadas contra la enfermedad de Newcastle.

9.2 Conclusión particular

La adición exclusiva de OTA a un tratamiento generó disminuciones considerables en la medición de PT y ALB, mientras que el tx donde se inoculó en exclusiva SE no mostró efectos negativos con relación a los demás tratamientos de desafío. Por último, la adición de OTA y posterior inoculación de SE mostró cambios moderados para la medición de PT y ALB, complementando esto, se generó mayor daño hepático según lo muestran los resultados de GGT.

La OTA generó una disminución en el tamaño del hígado, no obstante, la bolsa cloacal conservó mayor tamaño y gramaje en ambos tratamientos con OTA con relación al tratamiento control, la adición de SE generó un aumento en el tamaño del bazo y a nivel histológico se observó una población celular linfocítica predominante. Cabe resaltar que el tx OTA+SAL obtuvo un mayor peso y tamaño de bolsa cloacal comparándolo con los otros tratamientos. El

hígado presentó daños histopatológicos más evidentes con la adición de SE que en el tx OTA y tx OTA+SAL.

Se puede apreciar cómo la OTA disminuye la resistencia hacia enfermedades por SE mediante una respuesta humoral; asimismo, también ocurrió una disminución en la respuesta humoral inducida mediante una vacuna contra Newcastle, lo cual indica que la presencia de OTA compromete la salud de las aves y los esquemas de vacunación llevando a pérdidas económicas en la industria avícola.

10.0 PROSPECTIVAS

Se demostró el efecto dañino de la Ocratoxina tipo A, pero no pudo demostrarse por completo el efecto en órganos como la bolsa cloacal, por lo cual se aconseja a quien pretenda dar seguimiento a la evaluación de los efectos de las micotoxinas ampliar el periodo de prueba para observar un grado mayor en los cambios patológicos de los órganos de las aves. Aunque la cronicidad de la ocratoxicosis es de mayor importancia en las aves productoras de huevo, es indispensable obtener datos que permitan desarrollar herramientas para el control de las micotoxicosis y la disminución de los efectos negativos de estas tanto en aves de postura como de engorda.

11.0 REFERENCIAS.

- **Beck et al.** 2006. Micotoxinas: efectos en la inmunidad y medidas de prevención. Rev. Sector pecuario: Aves/Cerdos. Año 02: 04: 04 – 08.
- **Bennett, JW.** 2003. Mycotoxins. Clin. Microb. Rev. 16 (3): 497
- **Bersot, LS.** 2006. *Salmonella* no Brasil: sua importância no abate de aves. In: V Simpósio de Sanidade Avícola de UFSM, Santa Maria.
- **Borie, C et al.** 2008. Prevención de la infección por *Salmonella enterica* subespecie enterica serotipo Enteritidis (*Salmonella Enteritidis*) en pollos mediante un bacteriófago. Arch. Med. Vet. 40, N° 2, 197-201 (2008)
- **Campbell, TW.** 2004. Clinical chemistry of birds . Veterinary Hematology and clinical chemistry. Williams & Wilkins. p. 479-492.
- **Carlie, MJ. et al.** 2001. The Fungi (2ª edition). Academia Press. Londres, Reino Unido.
- **Castro, J et al.** 2015. Cuantificación de micotoxinas en ingredientes alimenticios utilizados en la dieta de aves comerciales. Rev Inv Vet Perú 2015; 26(4): 558-564
- **Consejo Mexicano de la Carne.** 2018. Compendio estadístico 2017. Consejo Mexicano de la Carne con datos de la USDA, SIAP y Banco de México. México.
- **Consejo Mexicano de la Carne.** 2018. Situación internacional del sector cárnico. Consejo Mexicano de la Carne con datos del USDA, SIAP y Banco de México. México.
- **Davidson, F et al.** 2008. Avian Immunology, First edition. Ed Elsevier. London, UK.
- **De Lange, C et al.** 2000. The significance of antinutritional factors in feedstuffs for monogastrics animals. En: Moughan P, Verstegen M, Visser-Reyneveld M (eds). Feed evaluation principles and practice. Amstelveen, Holanda: Wageningen Pers. P 169-188

- **Delacruz, L et al.** 1990. The role of ochratoxin A metabolism and biochemistry in animal and human nephrotoxicity. *Journal of Biopharmaceutical Sciences* 1: 277-304.
- **Denli et al.** 2006. Contaminación por micotoxinas en los piensos: efectos, tratamientos y prevención. Facultad de veterinaria (UAB)
- **Etzel, R.** 2002. Myxotoxins. *J Am Med Assoc* 287: 425-427.
- **FAO.** 1991. Alimentación y nutrición. Manual para el control de calidad de los alimentos. 10: Capacitación en análisis de micotoxinas. 144 pag.
- **Figuroa, O et al.** 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Rev latinoam microbiol*; 47 (1-2): 25-42.
- **Frías, S.** 2009. Bacteremia por *Salmonella* no tifoidea en pacientes inmunocomprometidos. *Enf Inf Microbiol*; 29 (3): 145-149.
- **Galtier, P.** 1991. Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals. En: En: M Castegnaro, R Plestina, G Dirheimer, IN Chernozemsky, H Bartsch. *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*. Lyon: IARC Science Publications No. 115: 187.
- **Gast, R.** 1994. Understanding *Salmonella enteritidis* in laying chickens: the contributions of experimental infection. *Int J Food Microbiol* 21,107-116.
- **Gentles, A et al.** 1999. Toxicological Evaluations of Cyclopiazonic Acid and Ochratoxin A in Broilers. *Poultry Science*. v. 78, p. 1380-1384, 1999.
- **Gómez, AAE.** 2007. Alimentos y micotoxinas: Implicaciones en la seguridad alimentaria. *Rev. Farmacia Profesional*. Vol. 21, núm. 8, Septiembre 2007.
- **González, A.** 2014. Impacto y control de micotoxinas en alimentación Animal (Altech, España). Jornadas Profesionales de Avicultura en 2014. Salón Internacional de la Avicultura y Ganadería. Sevilla, España.
- **Gu, M et al.** 2011. Positive selection in the hemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus and its effect on vaccine efficacy. *Virol j.* 31(8): 150.

- **Hagelberg, S et al.** 1989. Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasmabinding properties. *Journal of Applied Toxicology* 9: 91-96.
- **Hogue, A et al.** 1997. Epidemiology and control of egg – associated *Salmonella enteritidis* in the United States of America. *Rev Sci Tech*; 16: 542–553.
- **Huff, D et al.** 1981. Synergism Between Aflatoxin and Ochratoxin A in Broiler Chickens. *Poultry Science*. v. 60, p. 550-555.
- **Industria Alimenticia.** 2017. Informe anual cárnico y avícola. Disponible en: <https://www.industriaalimenticia.com/articles/88696-informe-anual-cárnico-y-avícola>.
- **Jordan, FTW et al.** 1998. Enfermedades de las aves 3er edición. Manual Moderno.
- **Kapcysnki, S et al.** 2011. Evaluation of the Newcastle disease Virus F and HN proteins in protective immunity by using a recombinant avian paramyxovirus type 3 vector in chickens. *Journal of virology*, 85(13): 6521-6534.
- **Lumeij, JT.** 1997. Avian Clinical biochemistry . In: *Clinical biochemistry of domestic animals* 5th edition. San Diego, CA. Academic press, p. 932.
- **Luo, C et al.** 2013. Genome-wide association study of antibody response to Newcastle disease virus in chicken. *BMC genetics* 2013, 14(42) 1-9.
- **Merino, G et al.** 2009. Characterization of Newcastle disease viruses isolated from chicken, gamefowl, pigeon and quail in Mexico. *Vet Res Commun* 2009, 33: 1023 – 1030.
- **Miller, P et al.** 2009. Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. *Avian diseases*, 53: 39 – 49.
- **Molback, K et al.** 2002. Risk factors for sporadic infection with *Salmonella enteritidis*, Denmark, 1997-1999. *Am J Epidemiol* 156, 654-661.

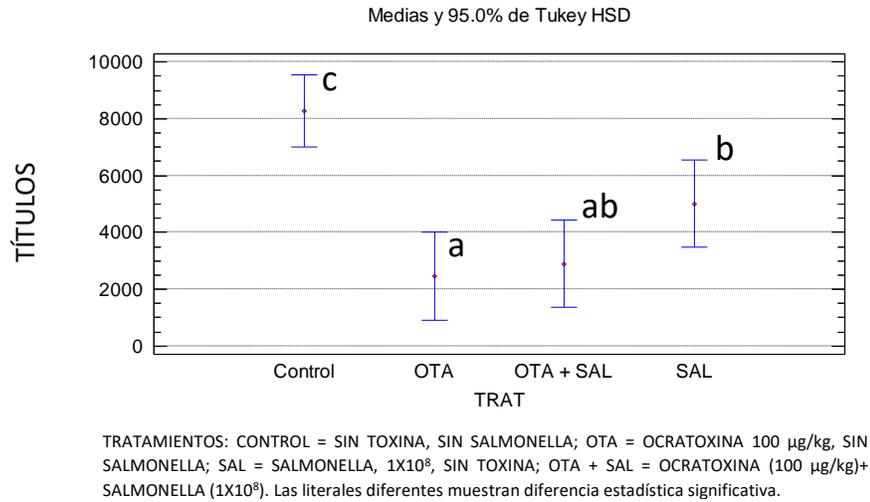
- **Morales, J et al.** 2011. Development of a recombinant vaccine and its efficacy in a trial with broilers. Memorias del XXII Latin American Poultry Congress; septiembre 6-9; Buenos Aires, Argentina.
- **O'Keefe, T.** 2013. Keeping your layer farm Salmonella enteritidis-free. News and analysis on the global poultry and animal feed industries. www.wattagnet.com
- **Pinto et al.** 1996. Hongos productores de micotoxinas en alimentos. Rev. Arg. Microb., Buenos Aires, v.28, n.3, p.147-162.
- **Prado, V et al.** 2002. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile: Periodo 1999-2000. *Rev Med Chil* 130, 495-501.
- **Quinteiro-Filho, WM et al.** 2010. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. *Poult. Sci.* 89(9):1905-1914.
- **Romagnoli, S et al.** 2009. Las Micotoxinas. ¿Qué sabemos sobre esta problemática? Revista agro mensaje de la facultad. ISSN 16698584. Instituto de genética experimental, facultad de ciencias médicas. Universidad nacional del rosario. Argentina
- **Ruiz, B.** 2018. Nutrido Crecimiento avícola en Latinoamérica en 2017. Rev. Industria Avícola. Abril 2018. p 6-32.
- **Scott, PM.** 1994. Penicillium and Aspergillus toxins. En: JD Miller, Mycotoxins in Grain. Compounds other than aflatoxin,. Trenholm, Eagan Press: 261.
- **SIAP.** 2018. Índice de volumen físico (IVF). Producción agropecuaria diciembre 2018. SEERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA (SIAP), SECRETARIA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL (SADER). México, CDMX.
- **Sokoloviae, M et al.** 2008. T-2 toxin: incidence and toxicity in poultry. *Arh Hig Rada Toksikol* 59:43-52

- **Soriano, CTM.** 2007. Micotoxinas en los alimentos. Ed. Díaz de Santos. España. P 17-18
- **Swayne *et al.*** 2013. Diseases of poultry. 23th edition. Ed. Wiley-Blackwell. Iowa, USA
- **Torres, E *et al.*** 1995. Quantification of aflatoxins in corn distributed in the city of Monterrey, México. Food Addit Contam. 12: 383-386.

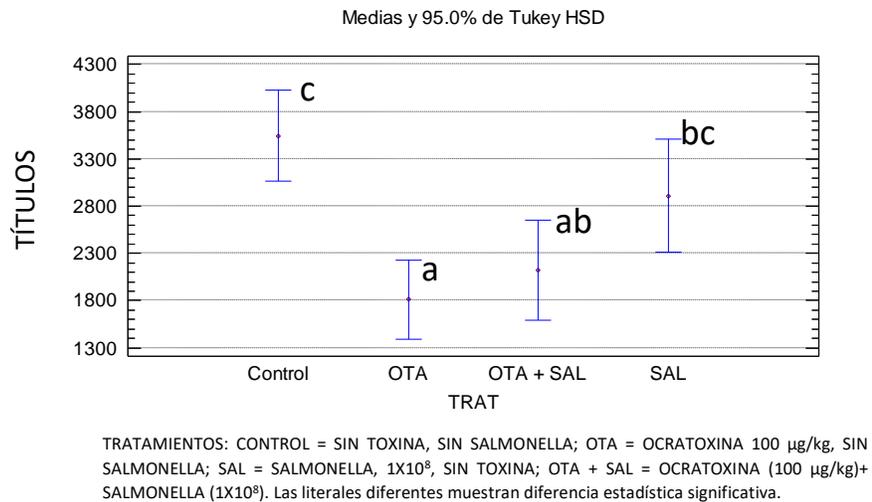
12.0 ANEXOS

12.1 Anexo 1: Gráficas de resultados

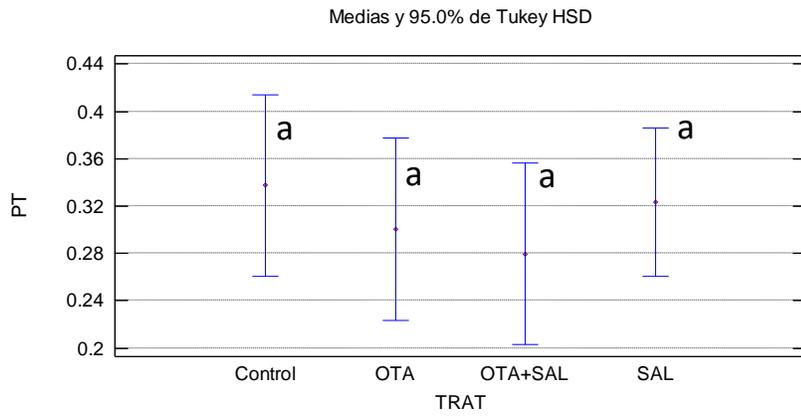
GRÁFICA 1. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA NEWCASTLE PARA EL DÍA 15 POR MÉTODO DE ELISA



GRÁFICA 2. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA NEWCASTLE PARA EL DÍA 29 POR MÉTODO ELISA

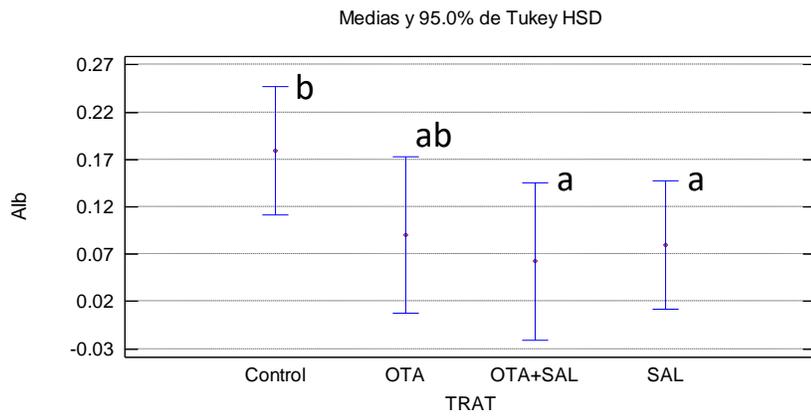


GRÁFICA 3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES AL DÍA 15



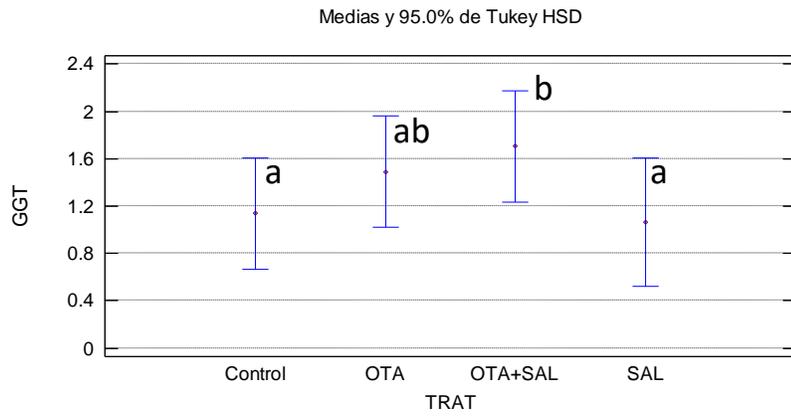
TRATAMIENTOS: CONTROL = SIN TOXINA, SIN SALMONELLA; OTA = OCRATOXINA 100 µg/kg, SIN SALMONELLA; SAL = SALMONELLA, 1X10⁸, SIN TOXINA; OTA + SAL = OCRATOXINA (100 µg/kg)+ SALMONELLA (1X10⁸). Las literales diferentes muestran diferencia estadística significativa.

GRÁFICA 4. CUANTIFICACIÓN DE ALBÚMINA PARA EL DÍA 15



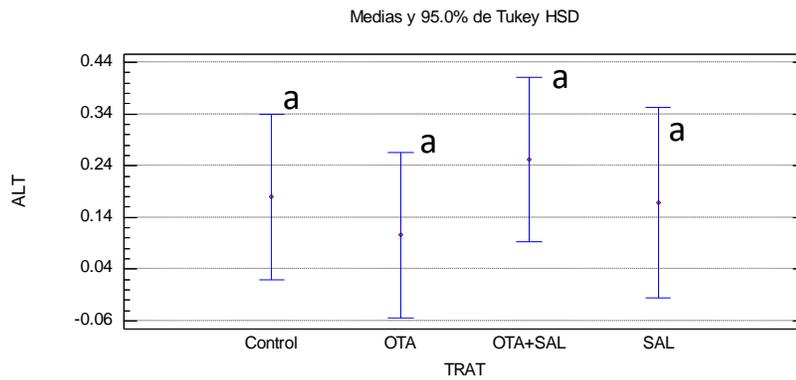
TRATAMIENTOS: CONTROL = SIN TOXINA, SIN SALMONELLA; OTA = OCRATOXINA 100 µg/kg, SIN SALMONELLA; SAL = SALMONELLA, 1X10⁸, SIN TOXINA; OTA + SAL = OCRATOXINA (100 µg/kg)+ SALMONELLA (1X10⁸). Las literales diferentes muestran diferencia estadística significativa.

GRÁFICA 5. CUANTIFICACIÓN DE GGT PARA EL DÍA 15



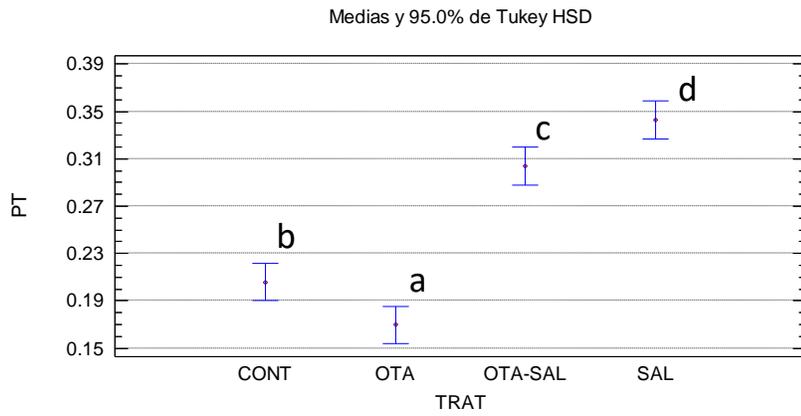
TRATAMIENTOS: CONTROL = SIN TOXINA, SIN SALMONELLA; OTA = OCRATOXINA 100 µg/kg, SIN SALMONELLA; SAL = SALMONELLA, 1X10⁸, SIN TOXINA; OTA + SAL = OCRATOXINA (100 µg/kg)+ SALMONELLA (1X10⁸). Las literales diferentes muestran diferencia estadística significativa.

GRÁFICA 6. CUANTIFICACIÓN DE ALT PARA EL DÍA 15



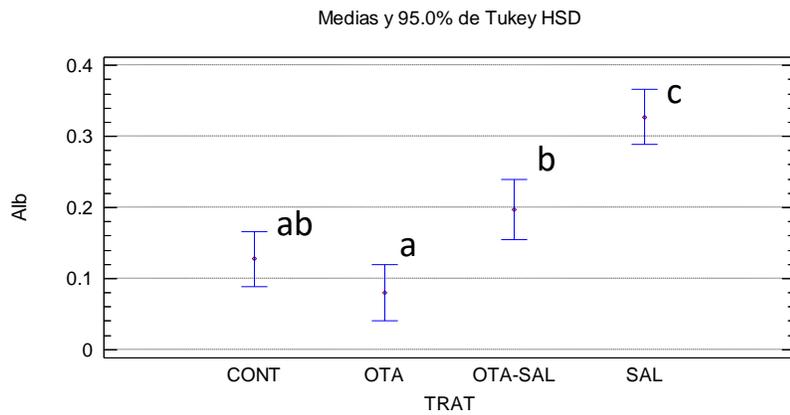
TRATAMIENTOS: CONTROL = SIN TOXINA, SIN SALMONELLA; OTA = OCRATOXINA 100 µg/kg, SIN SALMONELLA; SAL = SALMONELLA, 1X10⁸, SIN TOXINA; OTA + SAL = OCRATOXINA (100 µg/kg)+ SALMONELLA (1X10⁸). Las literales diferentes muestran diferencia estadística significativa.

GRÁFICA 7. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES PARA EL DÍA 29



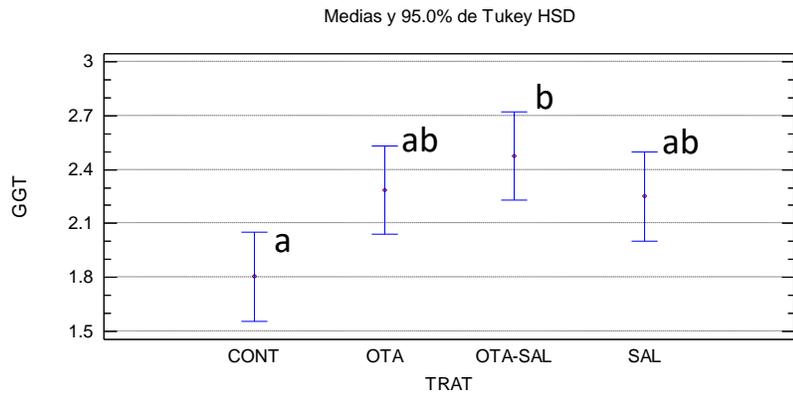
TRATAMIENTOS: CONTROL = SIN TOXINA, SIN SALMONELLA; OTA = OCRATOXINA 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, SIN SALMONELLA; SAL = SALMONELLA, 1×10^8 , SIN TOXINA; OTA + SAL = OCRATOXINA (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + SALMONELLA (1×10^8). Las literales diferentes muestran diferencia estadística significativa.

GRÁFICA 8. CUANTIFICACIÓN DE ALBUMINA PARA EL DIA 29



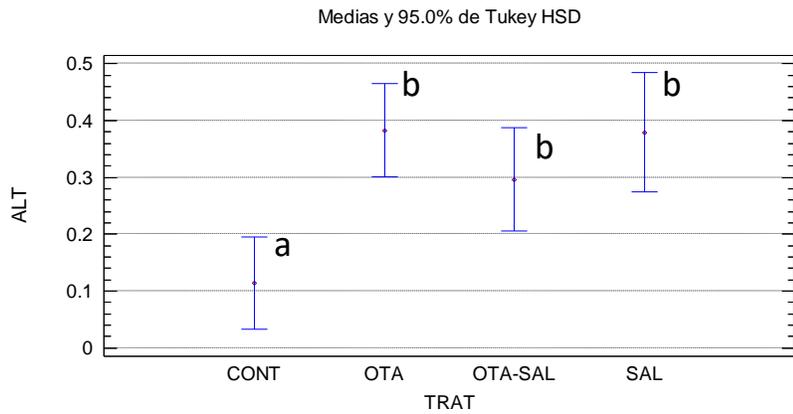
TRATAMIENTOS: CONTROL = SIN TOXINA, SIN SALMONELLA; OTA = OCRATOXINA 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, SIN SALMONELLA; SAL = SALMONELLA, 1×10^8 , SIN TOXINA; OTA + SAL = OCRATOXINA (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + SALMONELLA (1×10^8). Las literales diferentes muestran diferencia estadística significativa.

GRÁFICA 9. CUANTIFICACIÓN DE GGT PARA EL DÍA 29



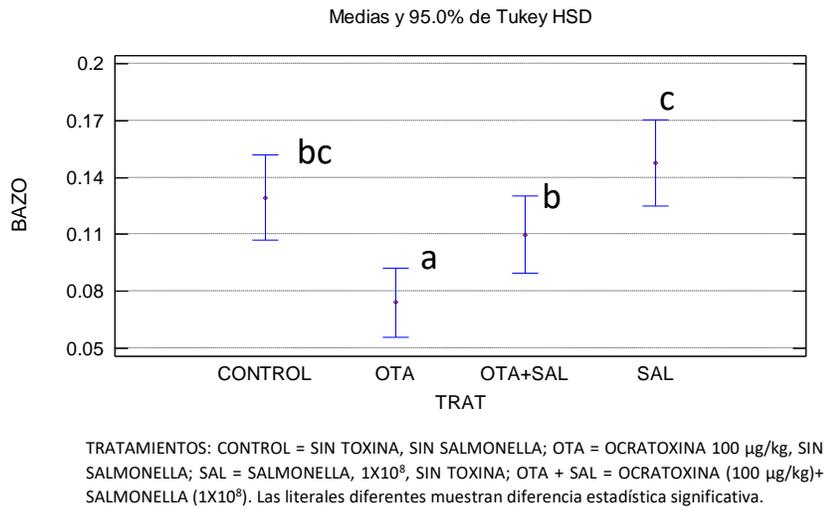
TRATAMIENTOS: CONTROL = SIN TOXINA, SIN SALMONELLA; OTA = OCRATOXINA 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, SIN SALMONELLA; SAL = SALMONELLA, 1×10^8 , SIN TOXINA; OTA + SAL = OCRATOXINA (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + SALMONELLA (1×10^8). Las literales diferentes muestran diferencia estadística significativa.

GRÁFICA 10. CUANTIFICACIÓN DE ALT PARA EL DÍA 29

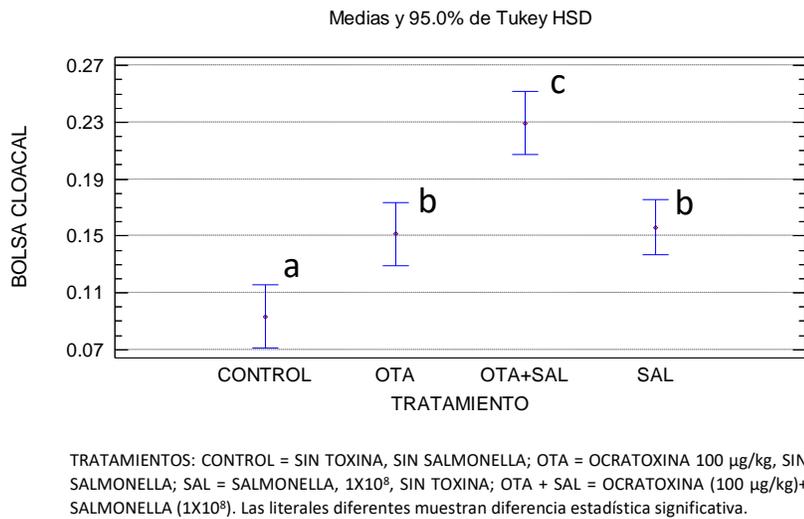


TRATAMIENTOS: CONTROL = SIN TOXINA, SIN SALMONELLA; OTA = OCRATOXINA 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, SIN SALMONELLA; SAL = SALMONELLA, 1×10^8 , SIN TOXINA; OTA + SAL = OCRATOXINA (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + SALMONELLA (1×10^8). Las literales diferentes muestran diferencia estadística significativa.

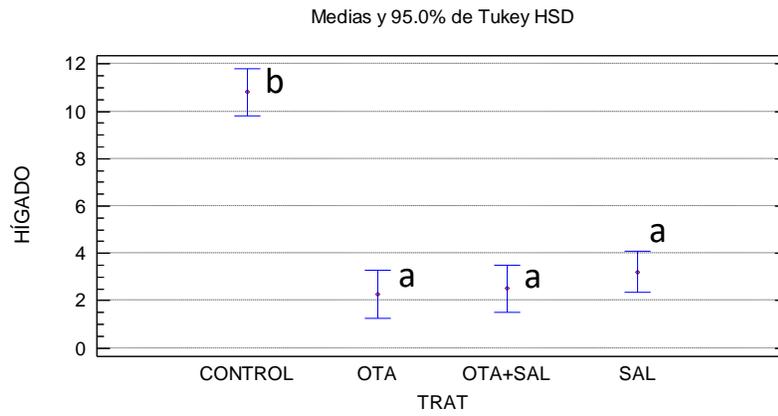
GRÁFICA 11. RELACIÓN PESO DEL ÓRGANO/PESO DEL AVE: BAZO



GRÁFICA 12. RELACIÓN PESO DEL ÓRGANO/PESO DEL AVE: BOLSA CLOACAL



GRÁFICA 13. RELACIÓN PESO DEL ÓRGANO/PESO DEL AVE: HÍGADO



TRATAMIENTOS: CONTROL = SIN TOXINA, SIN SALMONELLA; OTA = OCRATOXINA 100 µg/kg, SIN SALMONELLA; SAL = SALMONELLA, 1X10⁸, SIN TOXINA; OTA + SAL = OCRATOXINA (100 µg/kg)+ SALMONELLA (1X10⁸). Las literales diferentes muestran diferencia estadística significativa.

12.2 Anexo 2: Micrografías de los órganos en los diferentes tratamientos

12.2.1 Micrografías de hígado en los diferentes tratamientos

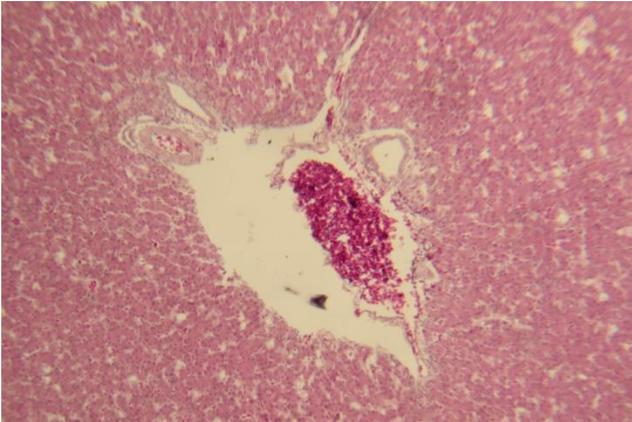


Ilustración 2. Hígado H-E, 10x Tratamiento CONTROL. Espacio porta sin cambios patológicos aparentes.

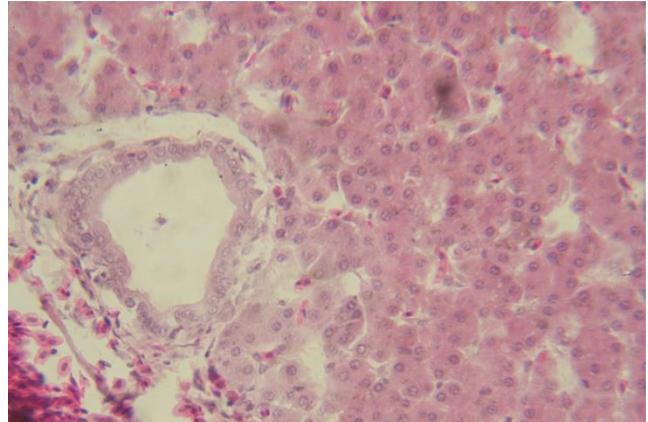


Ilustración 3. Hígado H-E, 40x Tratamiento CONTROL. Hepatocitos con degeneración albuminosa leve.

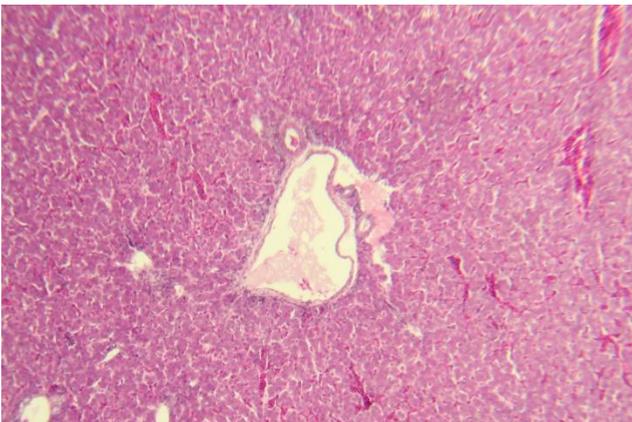


Ilustración 4. Hígado H-E, 10x Tratamiento OCRATOXINA. Se aprecian espacios portales con congestión difusa moderada.

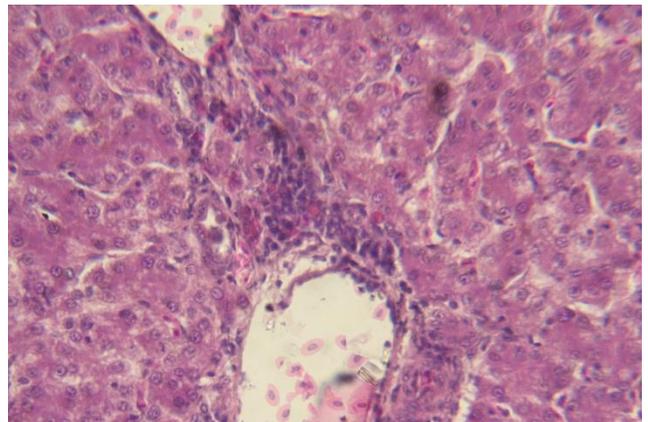


Ilustración 5. Hígado H-E, 40x Tratamiento OCRATOXINA. Se observa Infiltración linfocítica en área perivascular, hepatocitos con degeneración albuminosa difusa moderada y degeneración vacuolar.

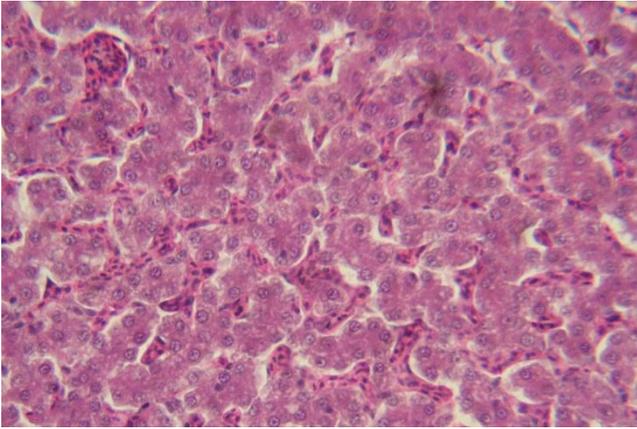


Ilustración 6. Hígado H-E. 40x Tratamiento OCRATOXINA. Se observa Congestión difusa moderada entre cordones hepáticos, degeneración albuminosa moderada y degeneración vacuolar.

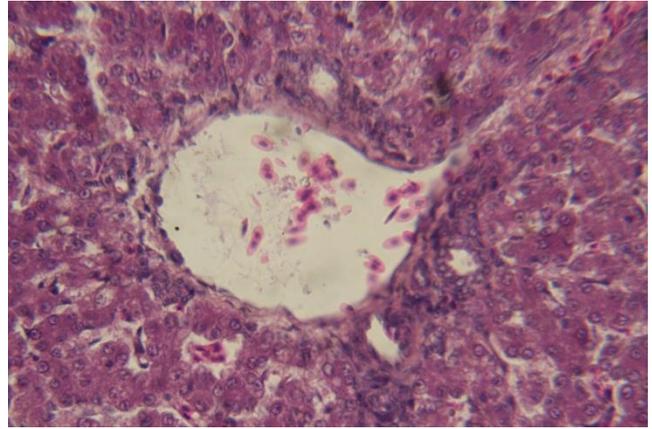


Ilustración 7. Hígado H-E. 40x Tratamiento OCRATOXINA. Se aprecia Hiperplasia de conductos biliares leve, hepatocitos con degeneración albuminosa y vacuolización celular.

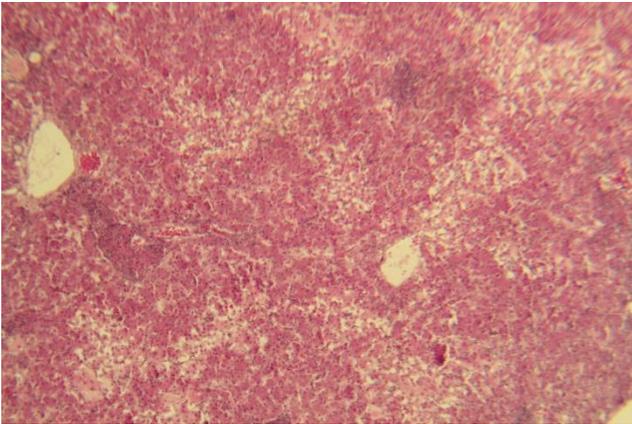


Ilustración 8. Hígado H-E. 10x Tratamiento *SALMONELLA*. Patrón con degeneración albuminosa difusa severa y degeneración vacuolar perilobulillar severa.

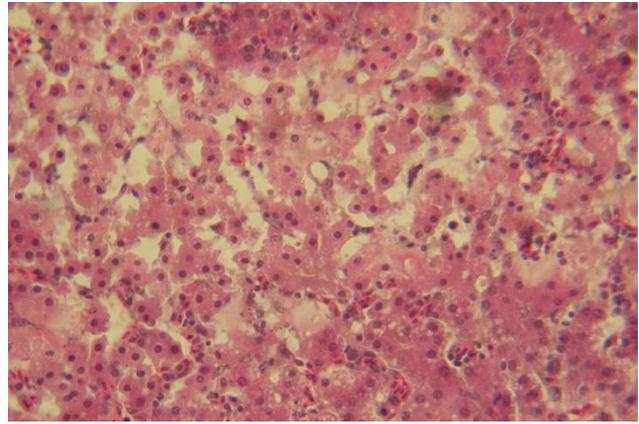


Ilustración 9. Hígado H-E. 40x Tratamiento *SALMONELLA*. Degeneración albuminosa severa, vacuolización hepática, necrosis licuefactiva y coagulativa perilobulillar y hepatocitos con picnosis, cariólisis y cariorexis.

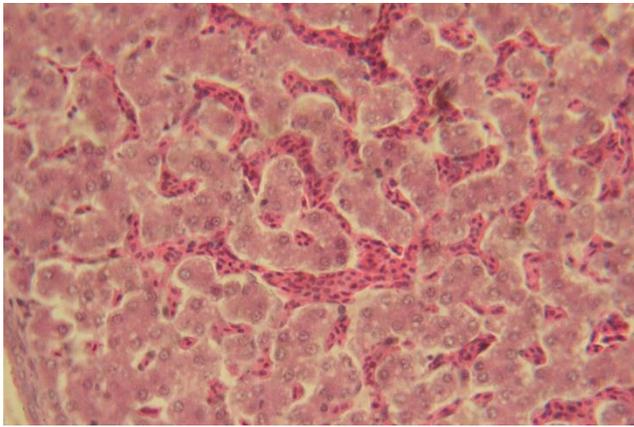


Ilustración 10. Hígado H-E. 40x Tratamiento *SALMONELLA*. Congestión severa con degeneración albuminosa moderada y vacuolización celular moderada.

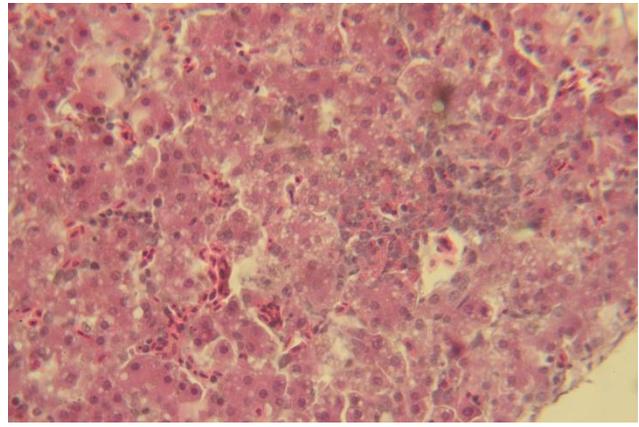


Ilustración 11. Hígado H-E. 40x. Tratamiento *SALMONELLA*. Degeneración albuminosa y vacuolar de moderada a severa con infiltrado linfocítico y eosinofílico y congestión leve.

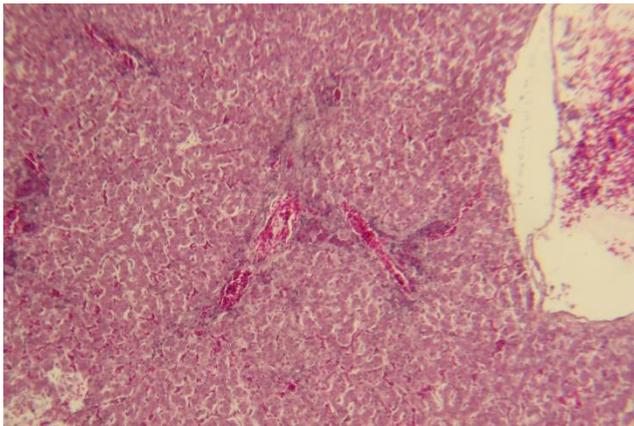


Ilustración 12. Hígado H-E. 10x Tratamiento OCRATOXINA-*SALMONELLA*. Espacio portal con infiltración linfocítica y eosinofílica moderada

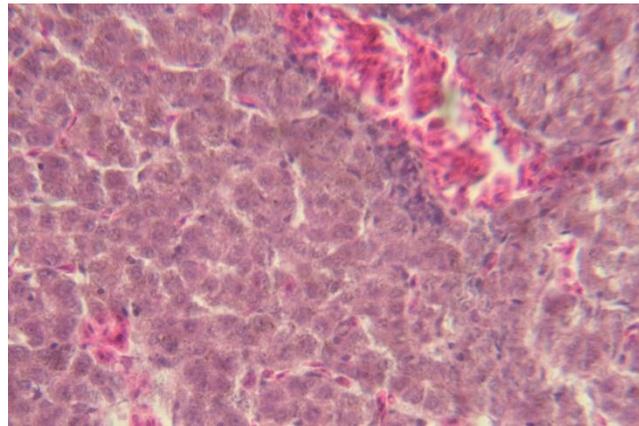


Ilustración 13. Hígado H-E. 40x Tratamiento OCRATOXINA-*SALMONELLA*. Se observó hemosiderosis moderada en difusa, degeneración albuminosa moderada e infiltración linfocítica leve.

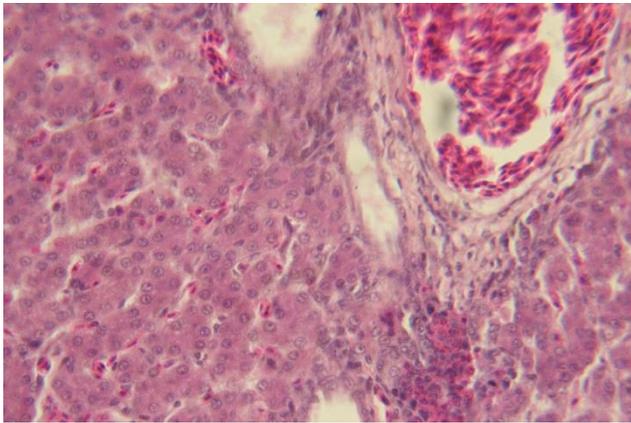


Ilustración 14. Hígado H-E. 40x Tratamiento OCRATOXINA-SALMONELLA.

Se observa degeneración albuminosa moderada, vacuolización leve, Hiperplasia de conductos biliares leve, infiltración eosinofílica moderada, congestión leve.

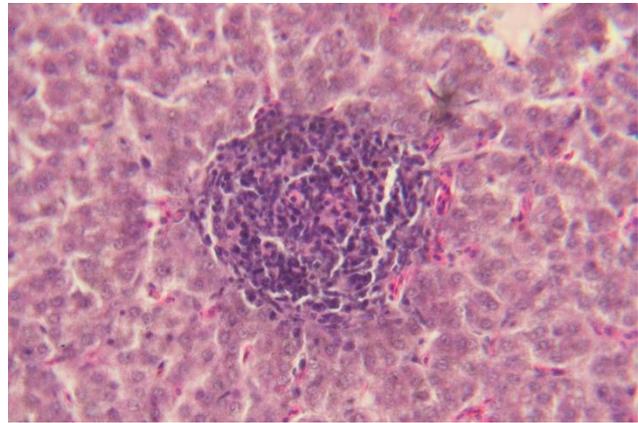


Ilustración 15. Hígado H-E. 40x Tratamiento OCRATOXINA-SALMONELLA.

Se aprecia un centro germinal linfoide, hepatocitos con degeneración albuminosa moderada, vacuolización celular leve y hemosiderosis leve.

12.2.2 Micrografías de bazo en los diferentes tratamientos

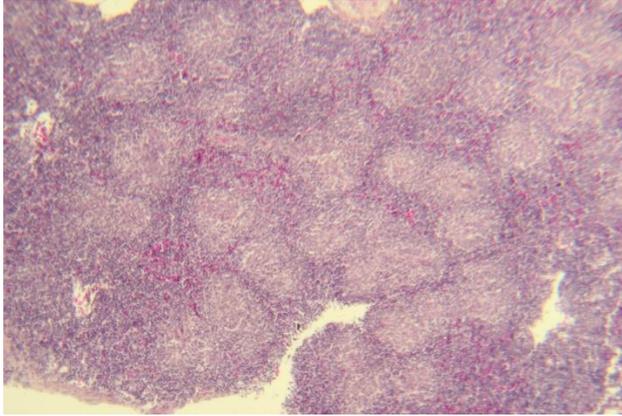


Ilustración 16. Bazo H-E. 10x Tratamiento CONTROL. Múltiples centros linfoides de tamaño promedio distribuidos aleatoriamente, zonas levemente congestionadas.

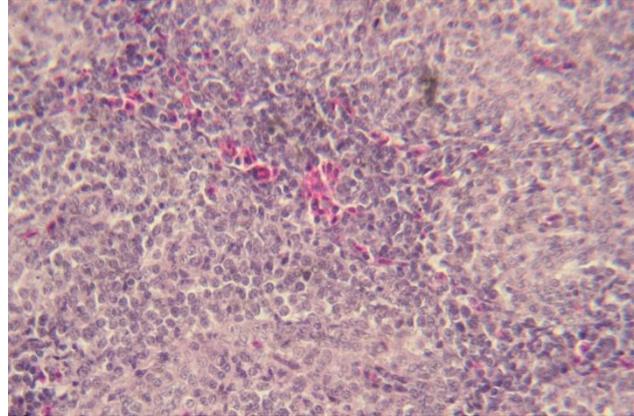


Ilustración 17. Bazo H-E. 40x Tratamiento CONTROL. Los centros linfoides abarcan en 80% del tejido respecto a la pulpa roja.

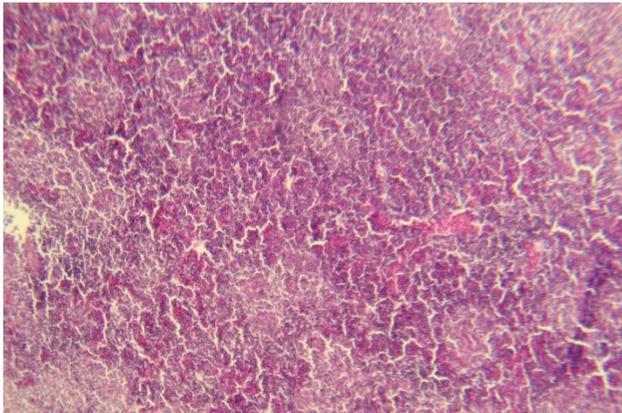


Ilustración 18. Bazo H-E. 10x Tratamiento OCRATOXINA. Centros linfoides escasos, disminuidos en tamaño, con pulpa roja muy abundante y congestionada.

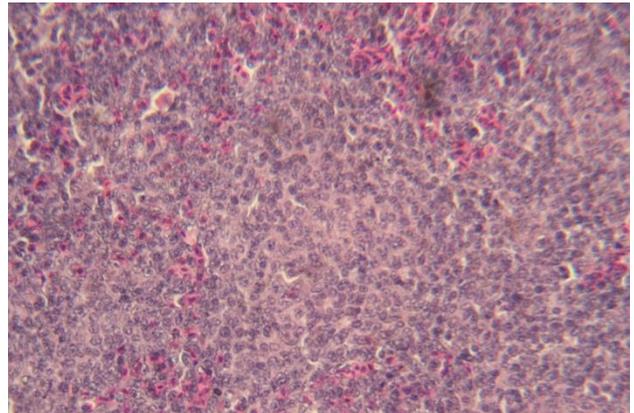


Ilustración 19. Bazo H-E. 40x Tratamiento OCRATOXINA. Centro germinativo muy reducido en tamaño, linfocitos periféricos con apoptosis. Los centros linfoides abarcan el 40% del tejido respecto a la pulpa roja.

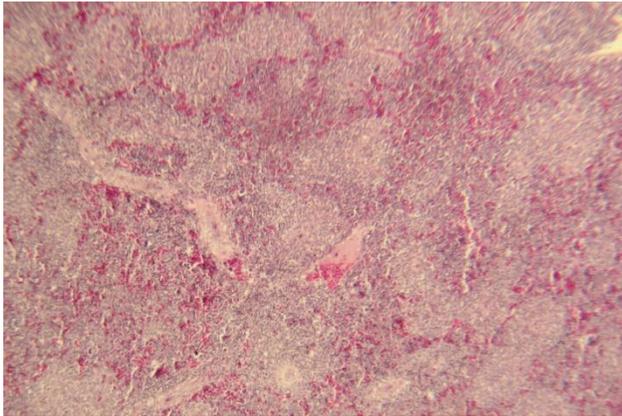


Ilustración 20. Bazo H-E. 10x Tratamiento *SALMONELLA*. Centros linfoides con coloración eosinofílica debido a alta división celular, pulpa roja muy congestionada.

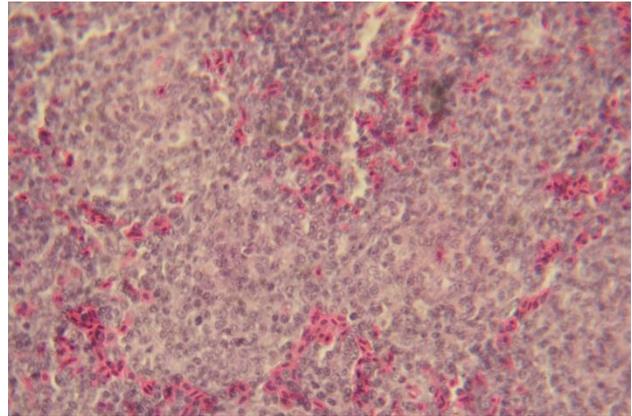


Ilustración 21. Bazo H-E. 40x Tratamiento *SALMONELLA*. Centros germinativos muy activos, representando el 70% de todo el tejido contra un 30% de pulpa roja.

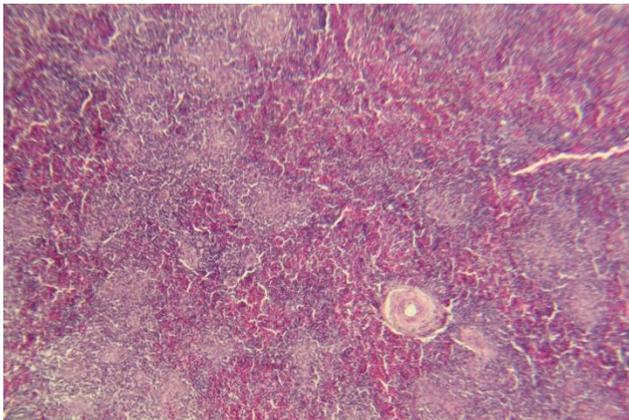


Ilustración 22. Bazo H-E. 10x Tratamiento OCRATOXINA-*SALMONELLA*. Centros linfoides con una coloración más basófila y de menor tamaño contrastando con TX OTA y SAL. Pulpa roja con congestión de Moderada a Severa.

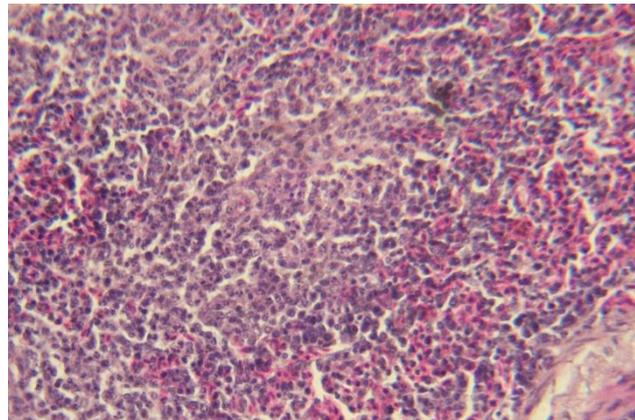


Ilustración 23. Bazo H-E. 40x Tratamiento OCRATOXINA-*SALMONELLA*. Centros linfoides muy reducidos en tamaño comparando con TX CONTROL, OCRATOXINA y *SALMONELLA* ocupando aproximadamente el 40% del tejido. Centros germinativos casi ausentes y linfocitos en picnosis, cariólisis y cariorexis. Pulpa roja con congestión moderada.

12.2.1 Micrografías de bolsa cloacal en los diferentes tratamientos

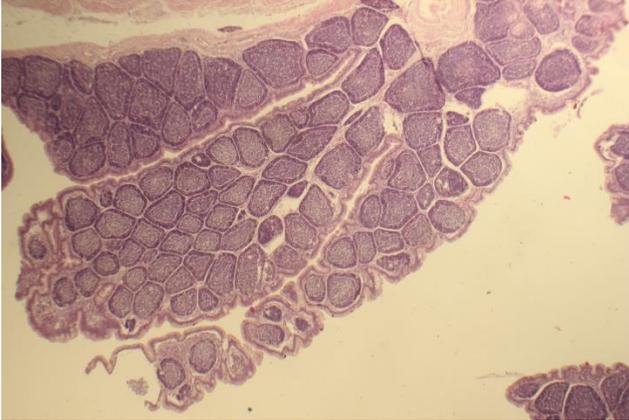


Ilustración 24. Bolsa Cloacal H-E. 4x Tratamiento CONTROL. Centros linfoides muy definidos, la corona linfoide y el centro germinativo mantienen una separación visual muy marcada.

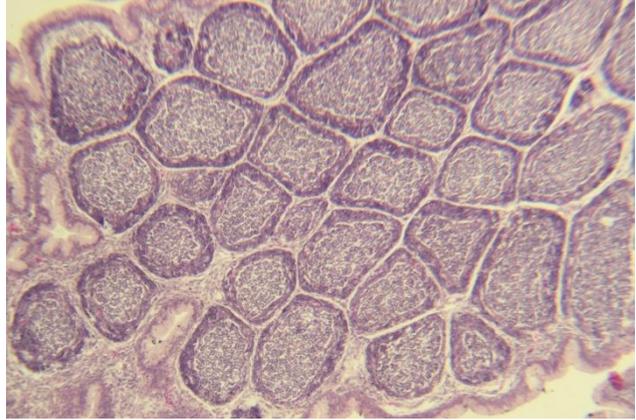


Ilustración 25. Bolsa Cloacal H-E. 10x Tratamiento CONTROL. Centros linfoides bien definidos, la corona linfoide es moderadamente más grande que el centro germinativo.

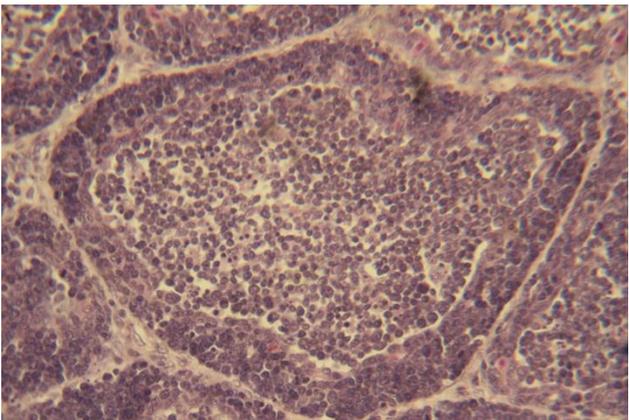


Ilustración 26. Bolsa Cloacal H-E. 40x Tratamiento CONTROL. Centro germinativo abundante, sin cambios aparentes que indiquen. Tejido interlobulillar muy escaso.

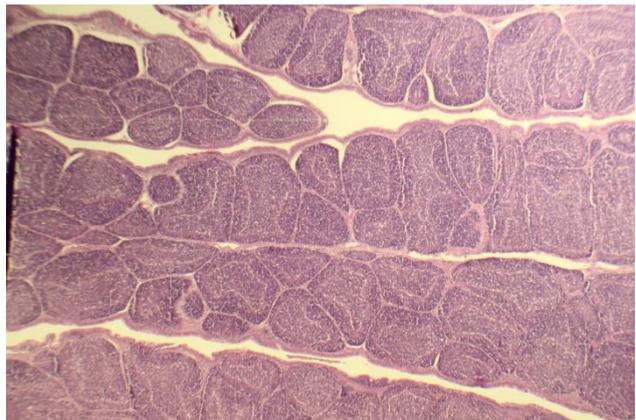


Ilustración 27. Bolsa Cloacal H-E. 4x Tratamiento OCRATOXINA. Centros linfoides bien definidos, con corona linfoide más abundante en comparación con TX CONTROL. Centro germinativo reducido levemente.

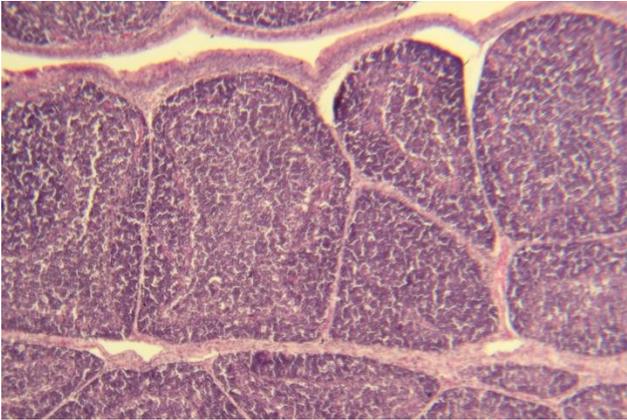


Ilustración 28. Bolsa Cloacal H-E. 10x Tratamiento OCRATOXINA. Se aprecia visualmente bien la división entre corona linfoide y centro germinativo, este último reducido de tamaño, pero siendo aún más grande que la corona.

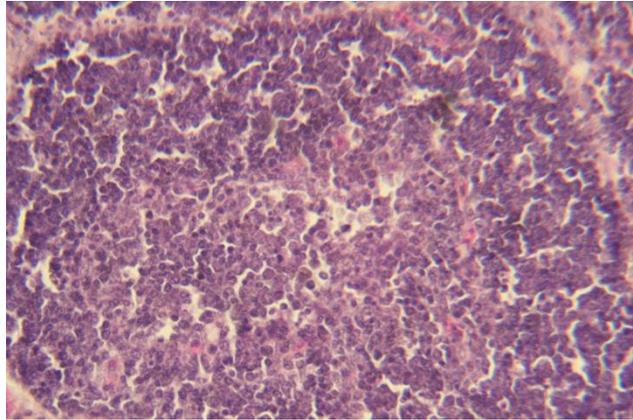


Ilustración 29. Bolsa Cloacal H-E. 40x Tratamiento OCRATOXINA. El centro linfoide se observa muy reducido en tamaño, pero con ausencia de núcleos picnóticos. Áreas acelulares muy visibles.

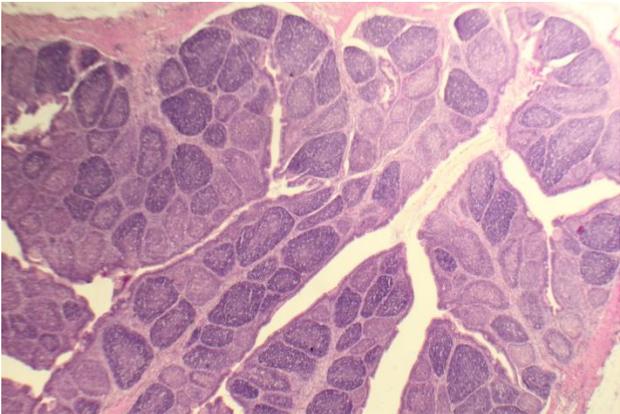


Ilustración 30. Bolsa Cloacal H-E. 4x Tratamiento *SALMONELLA*. algunos centros linfoides se observan basófilos indicativos de nula respuesta linfocítica, otros se aprecian muy eosiofilicos que corresponde a los centros con alta actividad mitótica.

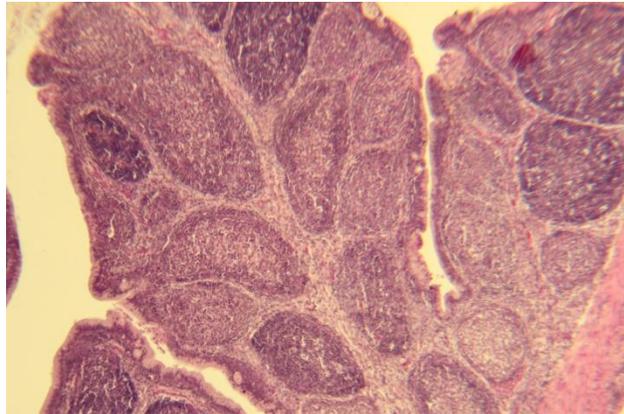


Ilustración 31. Bolsa Cloacal H-E. 10x Tratamiento *SALMONELLA*. El 60% de los centros linfoides tiene alta actividad mitótica, se aprecia una congestión leve y múltiples linfocitos maduros mezclados con el tejido interlobulillar.

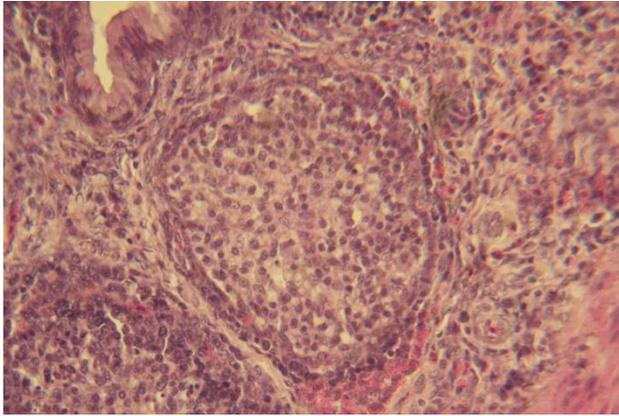


Ilustración 32. Bolsa Cloacal H-E. 40x Tratamiento *SALMONELLA*. Los centros germinativos se aprecian agrandados de tamaño, mientras que la corona linfoide es casi nula. Infiltrado eosinofílico inter y perilobulillar.

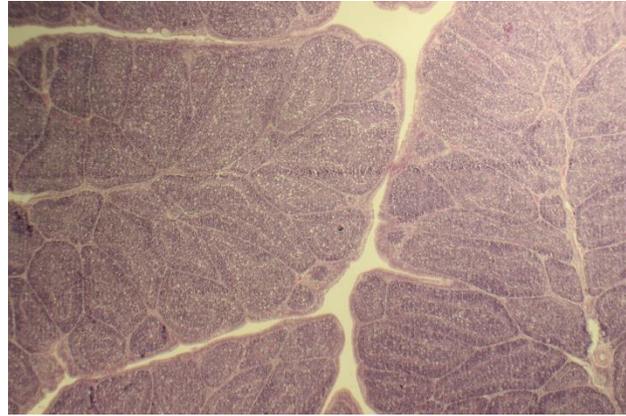


Ilustración 33. Bolsa Cloacal H-E. 4x Tratamiento OCRATOXINA-*SALMONELLA*. Corona linfoide se aprecia delimitada y un con menor tamaño en comparación con TX OCRATOXINA y TX *SALMONELLA*. Centro germinal se observa con una coloración blanquecina.

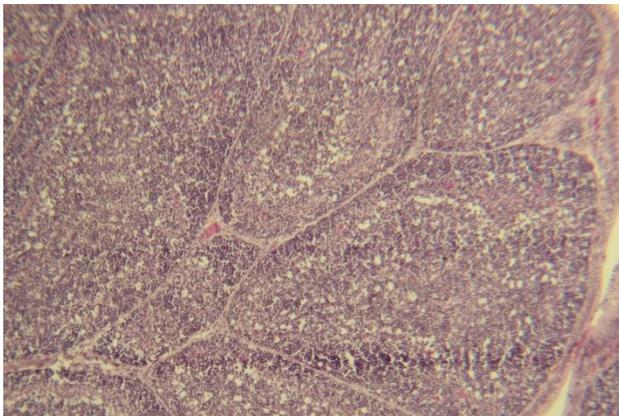


Ilustración 34. Bolsa Cloacal H-E. 10x Tratamiento OCRATOXINA-*SALMONELLA*. Los centros linfoides, en general, se aprecian con una apariencia vacuolar o con pérdida de tejido.

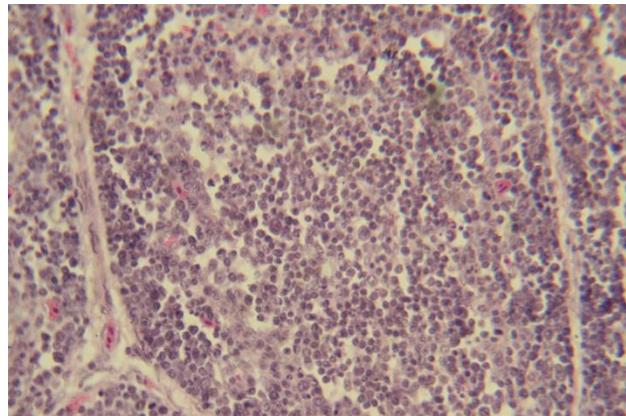


Ilustración 35. Bolsa Cloacal H-E. 40x Tratamiento OCRATOXINA-*SALMONELLA*. El tejido interlobulillar es muy escaso, los centros germinales presentan una pérdida de linfoblastos y algunos linfocitos con picnosis, cariólisis y cariorexis.