



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN DE DIFERENTES DOSIS DE UNA VACUNA RECOMBINANTE
COMERCIAL CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE APLICADAS EN
POLLOS COMERCIALES Y DESAFIADOS CON UNA CEPA VIRULENTE DEL
VIRUS DE NEWCASTLE

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA:
IGNACIO ARMANDO OSORIO REYES

TUTOR
RUBÉN MERINO GUZMÁN
(Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia, UNAM)

COMITÉ TUTOR
JOSÉ ÁLVARO AGUILAR SETIEN
(Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la producción y de la salud
animal, UNAM)

SOCORRO MAGDALENA ESCORCIA MARTÍNEZ
(Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia, UNAM)

MÉXICO, D.F. JUNIO 2015



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.

DEDICATORIA

Ignacio Osorio Gastélum Q.E.P.D

AGRADECIMIENTOS

Una vez más han cambiado todos sus sueños por los míos, espero tenerlos toda la vida para continuar agradeciéndoles todo lo que han sacrificado por mí y mis hermanos. Gracias **Cristina Reyes y José Osorio**.

Tu ayuda ha sido esencial, has estado conmigo incluso en los momentos más difíciles, gracias por no dejar que me rindiera, gracias por acompañarme en la mayor parte de este camino. La meta aún está lejos continuemos caminando. Te amo **Erika** (:

Sus conocimientos, sus orientaciones, su forma de trabajar, su persistencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación académica, ha inculcado en mí un sentido de responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podría haber concluido este trabajo. **Dr. Rubén Merino**, estoy enormemente agradecido por haber abierto para mí las puertas de esta facultad y haberme guiado como lo hizo, gracias!!!

Agradezco a la **Dra. Magdalena Escorcía**, por ser parte de mi formación académica, por guiarme durante estos dos años, tiene usted toda mi lealtad y admiración. A la doctora Fragoso y los doctores Aguilar, Ledesma, Montaño y García, gracias por su tiempo en la revisión de mi trabajo, sus contribuciones fueron muy valiosas.

Sin ustedes nunca hubiese terminado, gracias: Alma, Paty, Angélica, Mónica, Marcos, Tere, Alexandra, Carmelo, Juan, Roberto, Ruth, Marcela, Jonatán y Rodrigo, son ustedes grandes personas. Extraño Tehuacán, la humildad de su gente es ejemplar.

Siempre estaré en deuda, por creer en mi e impulsar mi desarrollo profesional hacia este gran objetivo. **Gracias Dr. Rolando**.

Agradezco mucho a los maestros y amigos de la
Universidad Nacional Autónoma de México

CONTENIDO

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
Epidemiología de la enfermedad de Newcastle en México.....	1
Etiología.....	2
Agente.....	2
Clasificación.....	2
Relación antigénica entre cepas.....	4
Presentaciones clínicas.....	5
Control y prevención.....	6
Respuesta inmune contra el VEN.....	7
<i>Sistema inmune innata</i>	7
<i>Inmunidad adaptativa</i>	7
JUSTIFICACIÓN.....	9
HIPÓTESIS.....	10
OBJETIVOS.....	10
Objetivo general.....	10
Objetivos particulares.....	10

MATERIAL Y MÉTODOS	11
Localización	11
Biológicos	11
Estrategia experimental	11
Pruebas serológicas.....	13
<i>Inmunidad sistémica y local (ELISA IgY e IgA)</i>	13
<i>Inhibición de la hemoaglutinación.</i>	13
<i>Antigenicidad cruzada</i>	13
<i>Virus sero neutralización – Índice de Neutralización</i>	14
Análisis estadístico	15
RESULTADOS.....	16
Experimento 1	16
Reacción post-vacunal	16
Grado de enfermedad	16
Supervivencia al desafío	17
Serología	17
Parámetros productivos	19
Excreción del virus de la enfermedad de Newcastle	19
Experimento 2	20
Reacción post-vacunal	20
Grado de enfermedad	20
Supervivencia al desafío	21
Serología	21
Parámetros productivos	22

Excreción del virus de la enfermedad de Newcastle	22
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES	31
ABREVIATURAS	32
CUADROS	34
FIGURAS	45
REFERENCIAS	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Similitud (%) de los genes F y HN de la cepa rP05 comparada con los virus utilizados en este estudio y una cepa representativa.	34
Cuadro 2. Estrategia experimental, resumen de los grupos vacunados en el experimento 1, n=12.	34
Cuadro 3. Estrategia experimental, resumen de los grupos vacunados en el experimento 2, n=10.	35
Cuadro 4. Reacción post-vacunal a diferentes dosis de las cepas vacunales LS y rP05, experimento 1.	35
Cuadro 5. Signos de enfermedad después del desafío con la cepa virulenta P05 del virus de la enfermedad de Newcastle, experimento 1.	36
Cuadro 6. Títulos de anticuerpos de la inhibición de la hemoaglutinación pre y post-desafío, experimento 1.	36
Cuadro 7. Valores de r1 y r2 obtenidos de las cepas del virus de la enfermedad de Newcastle confrontados con los antisueros generados, experimento 1.	37
Cuadro 8. Valores de relación antigénica entre las cepas rP05, LS y P05, experimento 1.	37
Cuadro 9. Media aritmética de los títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA IgY e IgA, experimento 1.	38
Cuadro 10. Virus sero-neutralización. Índices neutralizantes homólogos y heterólogos, experimento 1.	38
Cuadro 11. Peso final y conversión alimenticia a los 45 días de edad, experimento 1.	39

Cuadro 12. Excreción del virus de la enfermedad de Newcastle P05 2, 4 y 7 días post-desafío, experimento 1.....	39
Cuadro 13. Reacción post-vacunal a diferentes dosis de las cepas vacunales LS y rP05, experimento 2.....	40
Cuadro 14. Signos de enfermedad después del desafío con la cepa virulenta P05 del virus de la enfermedad de Newcastle, experimento 2.	40
Cuadro 15. Títulos de anticuerpos de la inhibición de la hemoaglutinación pre y post-desafío, experimento 2.....	41
Cuadro 16. Valores de r1 y r2 obtenidos de las cepas del virus de la enfermedad de Newcastle confrontados con los antisueros generados, experimento 2.	41
Cuadro 17. Valores de relación antigénica entre las cepas rP05, LS y P05, experimento 2.....	42
Cuadro 18. Media aritmética de los títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA IgY e IgA, experimento 2.....	42
Cuadro 19. Virus sero-neutralización. Índices neutralizantes homólogos y heterólogos, experimento 2.	43
Cuadro 20. Peso final y conversión alimenticia a los 45 días de edad, experimento 2.	43
Cuadro 21. Excreción del virus de la enfermedad de Newcastle P05 2, 4 y 7 días post-desafío, experimento 2.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análisis de conglomerados de la reacción post-vacunación, experimento 1.....	45
Figura 2. Análisis de conglomerados del grado de enfermedad post-desafío, experimento 1.	45
Figura 3. Porcentaje de supervivencia post-desafío. Diferente literal indica diferencia estadística, $P > 0.05$	46
Figura 4. Análisis de conglomerados de la reacción post-vacunación, experimento 2.	46
Figura 5. Análisis de conglomerados del grado de enfermedad post-desafío, experimento 2.	47
Figura 6. Porcentaje de supervivencia. Diferente literal indica diferencia estadística, $P > 0.05$	47

RESUMEN

La enfermedad de Newcastle tiene un gran impacto económico en la avicultura de México, la infección es causada por un virus del género *Avulavirus* clasificado en un solo serotipo, pero genéticamente dividido en 2 clases, la clase I consta de 2 genotipos, mientras la II incluye 16, de los cuales los genotipos III-IX y XI-XVI son virulentos. La prevención y control de la enfermedad tradicionalmente se basa en inmunizar con cepas de los genotipos I y II, aunque estas protegen eficazmente contra los signos y mortalidad, provocados por cepas virulentas del genotipo V, se ha demostrado que al inmunizar con genotipo homólogo a la cepa de desafío se disminuye la excreción viral. El objetivo general de este estudio fue evaluar diferentes dosis de una vacuna recombinante comercial (rP05) de genotipo homólogo al de desafío. Pollos de engorda comerciales libres de anticuerpos contra el virus de Newcastle, *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae* fueron vacunados a los 21 días de edad con diferentes dosis de las cepas rP05 o LaSota, y desafiados 14 días después con la cepa virulenta P05 de la enfermedad de Newcastle. Posteriormente se evaluaron la reacción post-vacunal, grado de enfermedad, inmunogenicidad, protección contra el desafío, antigenicidad cruzada, excreción viral y parámetros productivos. La cepa rP05 produjo menor reacción post-vacunal y respuesta de anticuerpos, mayor grado de enfermedad post desafío, y no se demostró mayor relación antigénica con la cepa de desafío. A pesar de que la cepa vacunal rP05 tiene mayor homología genética con la cepa de desafío, no mostró mayor protección que la vacuna de genotipo heterólogo LaSota.

Palabras clave

Virus de la enfermedad de Newcastle, vacunación, homología, rP05.

ABSTRACT

Newcastle disease, which is caused by a virus of the genus *Avulavirus*, has a major economic impact on the Mexican poultry industry. Commonly, the prevention and control of the disease relies on immunization with strains of genotypes I and II, although these vaccines protect effectively against signs and mortality caused by virulent strains, it has been shown that when immunizing g with the homologous strain genotype, the virus shedding is decreased. The objective of this study was to evaluate different doses of a commercial recombinant Newcastle disease vaccine (rP05) of homologous genotype to the challenge strain. Three weeks old broiler chickens free of antibodies against Newcastle virus, *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* were vaccinated with different doses of rP05 or LaSota strains, and challenged 14 days later with the Newcastle disease P05 virulent strain. After challenge, extent of disease, immunogenicity, protection against mortality, cross antigenicity, virus shedding and productive parameters were evaluated. The rP05 vaccine strain produced less severe post-vaccination reaction and antibody response, greater extent of disease. Higher antigenic relationship between the rP05 and challenge strain was not demonstrated. Although the rP05 vaccine strain has more genetic homology with the challenge strain, it didn't show to confer a higher protection than the heterologous vaccine LaSota strain.

Keywords

Newcastle Disease Virus, vaccination, homology, rP05 strain.

INTRODUCCIÓN

Epidemiología de la enfermedad de Newcastle en México

La Enfermedad de Newcastle (EN) fue descubierta en 1926 en Indonesia (Doyle 1927; Luo *et al.*, 2013) y es conocida por las pérdidas económicas que causa a la industria avícola mundial, por ello es catalogada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como una de las enfermedades de los animales terrestres de declaración obligatoria (Gu *et al.*, 2011), la infección es altamente contagiosa y mortal, afecta a más de 250 especies de aves incluidas las domésticas y silvestres (Luo *et al.*, 2013; Mohan *et al.*, 2012), especialmente a las aves de corral (Maminaiina *et al.*, 2010).

En México, el virus de la enfermedad de Newcastle (VEN) fue reportado por primera vez por Bankowski y Velázquez en 1946 (Márquez 1978). En la década de 1970 y 1980, la EN fue reconocida como una 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, y utilizar programas de vacunación adecuados como complemento de un programa muy estricto de bioseguridad (Merino *et al.*, 2009); en 1995 se publicó la Campaña Nacional contra el VEN (Norma Oficial Mexicana NOM-013-ZOO-1994) la cual tiene por objetivo uniformar los procedimientos, actividades, criterios, estrategias y técnicas operativas para la prevención, control y erradicación de la EN en su presentación velogénica en todo el territorio nacional, incluyendo aves silvestres. Tras la realización de muestreos epidemiológicos en el 100% de las granjas avícolas en producción, así como en una muestra estadísticamente representativa de la avicultura de traspatio, sin detectar la presencia del agente etiológico, el 7 de marzo de 2013, mediante un acuerdo publicado en el Diario Oficial de la Federación se declara al Distrito Federal como zona libre de la EN en su presentación velogénica, esta fue la última entidad en obtener este estatus (DOF 2013). Aunque el país está próximo a ser declarado libre de la EN en la avicultura comercial, la presentación de focos en

aves de traspatio y de combate representa un riesgo de re-introducción de la infección en la avicultura industrializada (Merino *et al.*, 2012)

Etiología

Agente

Es un virus ARN que pertenece al género *Avulavirus*, subfamilia *Paramixovirinae* de la familia *Paramyxoviridae*, orden Mononegavirales (Liu *et al.*, 2013). El VEN forma un solo serogrupo (Paramyxovirus aviar I) pero utilizando anticuerpos monoclonales se han detectado diferentes subtipos antigénicos (Alexander *et al.*, 1986 y Alexander *et al.*, 1997). Es un virus envuelto con replicación en el citoplasma, el genoma está compuesto por una cadena simple, no segmentada, de sentido negativo (Xiao *et al.*, 2012), formada por seis genes, de los cuales la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y fusión (F), codifican glicoproteínas transmembranales que permiten la unión y fusión del virus a la célula huésped, pasos críticos en el establecimiento de una infección por VEN (Miller *et al.*, 2009).

El gen F codifica una glucoproteína que se sintetiza como una proteína de membrana integral de tipo I, cuando se traduce la proteína es biológicamente inactiva y es conocida como precursor F0, proteasas del huésped pueden escindir a F0 en F1 y F2, y convertir la proteína a un estado biológicamente activo. La escisión eficiente de F0 es dependiente de la secuencia de aa en el sitio de escisión. La proteína HN es una glicoproteína integral de membrana tipo II (Hines and Miller 2012), y se han detectado 3 diferentes genotipos de 571, 577 o 616 aa, y en algunas cepas lentogénicas de 616 aa de longitud es necesario la escisión de la proteína para ser biológicamente activa, sin embargo no existe correlación con la virulencia del VEN (Dortmants *et al.*, 2011).

Clasificación

Todos los Paramyxovirus aviares (APMVs por sus siglas en inglés) excepto el *Metapneumovirus aviar* son clasificados en el género *Avulavirus*. Los AMPVs han

sido divididos en 11 serotipos (AMPV-1 hasta el 11) basados en las pruebas de inhibición de la hemaglutinación (HI, por sus siglas en inglés) e inhibición de la neuraminidasa (IN) (Miller and Koch 2013). Todas las cepas del VEN pertenecen al AMPV-1. Los AMPV-2, -3, -6 y -7 han sido asociados con enfermedad en aves domésticas. Específicamente, el AMPV-3 puede causar enfermedad respiratoria leve y caída en la producción de huevo de pavos y gallinas (Kumar *et al.*, 2011). Además, se han utilizado anticuerpos monoclonales para clasificar las cepas del VEN en diferentes grupos antigénicos (Liu *et al.*, 2013); sin embargo, con el uso de la virus neutralización o la inmunodifusión en gel agar se detecta escasa variación antigénica entre las cepas (Miller and Koch 2013).

De acuerdo a la virulencia y base molecular de los VEN, la OIE emite una definición para los VEN de declaración obligatoria en el manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres, para ser clasificados en esta categoría estos deben cumplir al menos uno de los siguientes criterios:

- Múltiples aminoácidos básicos en el extremo C-terminal de la proteína F2 y fenilalanina en el residuo 117, la cual está en el extremo N-terminal de la proteína F1.
- Un índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) en pollos de un día (*Gallus gallus*) de 0,7 o superior (OIE 2012).

Actualmente se emplea una clasificación con base en las variaciones en la secuencia del genoma, lo que lleva a la creación de genotipos del VEN; esta clasificación se basó inicialmente en el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción y más tarde en la alineación de la secuencia de nucleótidos del gen F (Liu *et al.*, 2013). En el mundo existen dos sistemas de clasificación genética sin que haya consenso sobre cuál es el más apropiado, un sistema sugerido por Aldous en 2003 agrupa al VEN en seis linajes, y 13 sublinajes a los cuales, se añadieron 2 linajes y 3 sublinajes (Munir *et al.*, 2012, Briand *et al.*, 2014, Snoeck *et al.* 2009), un segundo sistema clasifica a las cepas del VEN en dos divisiones

representados por las clases I y II, la clase I la forman cepas con genoma de 15,198 nucleótidos (nt) de longitud y consta de 1 genotipo (anteriormente 9), formado por los sub-genotipos 1a, 1b y 1c, además de un segundo genotipo propuesto por Briand *et al* (2014), todos, excepto uno, son avirulentos para el pollo. La Clase II incluye 16 genotipos y son más virulentos que las cepas de la Clase I, contienen 15,186 o 15,192 nt, los genotipos III-IX, y XI-XVI son virulentos (Miller *et al.*, 2010; Kapczynski *et al.*, 2013; Diel *et al.*, 2012). Y en 2013 Snoeck *et al* caracterizó dos nuevos genotipos: XVII y XVIII aislados en África.

Los genotipos V – VIII son los que circulan mundialmente y contienen solo virus virulentos. Los virus del genotipo V emergieron en Centro y Sudamérica en 1970 y causaron brotes en Europa en el mismo año, también se presentaron en Norteamérica en Florida (1971, 1993) y California (1971, 2002), y aún circulan en México (Merino 2010).

Relación antigénica entre cepas

Existe similitud antigénica entre todas las cepas del VEN y protección cruzada frente al desafío con cualquier otro VEN. Es esta protección cruzada la que sirve como base en la vacunación con virus de baja virulencia para proteger contra virus virulentos (Miller *et al.*, 2013). Sin embargo, las cepas del VEN usadas para producir vacunas, tales como LaSota (LS) y B1, son filogenéticamente del mismo genotipo que los virus aislados en 1940, pero son filogenéticamente divergentes de las cepas aisladas en los brotes del VEN en América del Norte desde 1970, (Miller *et al.*, 2007).

En 1972, se señaló que las cepas del VEN aisladas en los EUA eran capaces de infectar a los pollos vacunados y que estos virus parecían parcialmente resistentes a los anticuerpos inducidos por las vacunas disponibles. Más recientemente, se ha demostrado que los programas actuales de vacunación en pollos comerciales en los EUA no son totalmente eficaces en la prevención de la enfermedad clínica y la

eliminación del virus después de la infección experimental con una cepa virulenta reciente (Miller *et al.*, 2007).

Los experimentos de la EN han demostrado que mediante el uso de vacunas formuladas con un virus del mismo genotipo al de desafío, tanto para el genotipo II como para el V, es posible disminuir tanto el número de aves que excretan el virus de desafío, como la cantidad excretada de aves individuales, (Miller *et al.*, 2013).

Presentaciones clínicas

La infección con cepas virulentas se caracteriza por presentar tres formas clínicas bien definidas; 1) cepas velogénicas viscerotrópicas: que se identifican por infecciones agudas y letales, por lo general con lesiones hemorrágicas en el tracto gastrointestinal. Tradicionalmente, las cepas mexicanas Iztapalapa, Querétaro y Chimalhuacán, entre otras, han sido clasificadas en este tipo de presentación. 2) cepas velogénicas neurotrópicas: se definen por una alta mortalidad después de un cuadro clínico respiratorio y neurológico, pero donde las lesiones gastrointestinales generalmente están ausentes; una cepa representativa de esta presentación es la Texas, cuya morbilidad puede llegar al 100% y la mortalidad puede ser del 50% en aves adultas y 90% en aves jóvenes. 3) cepas mesogénicas: causan síntomas respiratorios y neurológicos, pero con baja mortalidad, las cepas involucradas son: Roakin, Haifa-Komarov, Krananueid, H y Mukteswar (Miller *et al.*, 2010; Merino 2010).

Con la realización de numerosos aislamientos de VEN en diversos países, que producían signos clínicos muy leves o que eran totalmente asintomáticos, y además tenían un tiempo medio de mortalidad embrionaria (TMME) mayor a 90 horas, se originó el concepto de las cepas lentogénicas, que se han utilizado como virus vacunales activos que incluyen a las cepas: B1, LS y Clon 30, aunque llegan a ocasionar signos respiratorios de leves a moderados y disminución en los parámetros productivos como respuesta post vacunal (Merino 2010). Además, también existen infecciones asintomáticas, conocidas como presentación entérica,

que sólo es detectada por métodos serológicos y aparentemente no hay signos clínicos; las cepas involucradas son Ulster, 2C, QV4 y VG/GA.

Control y prevención

Dentro de la bioseguridad se pueden implementar diferentes estrategias para prevenir y controlar efectivamente la diseminación de enfermedades de las aves en producción, estas estrategias comúnmente incluyen la vacunación. El uso de vacunas en la producción avícola está dirigido tradicionalmente a evitar o minimizar la aparición de la enfermedad clínica en la explotación y, por lo tanto, evitar pérdidas en la producción. Las vacunas y programas de vacunación son muy variables, dependen de varios factores locales como el tipo de producción, programa de bioseguridad, patrón local de la enfermedad, inmunidad materna, vacunas disponibles, los costos y las pérdidas potenciales (Hassanzadeh *et al.*, 2013).

Generalmente, las vacunas se producen a partir de cepas lentogénicas, las cuales en ocasiones pueden causar disminución de la productividad en los pollos, por la inducción de una infección respiratoria leve, en particular cuando las aves están infectadas con otros patógenos respiratorios (*Mycoplasma* o *Escherichia coli*) o en combinación con factores de estrés ambiental como el hacinamiento, condiciones climáticas adversas, entre otras. En México, los esfuerzos para prevenir esta enfermedad se apoyan en vacunas de virus activo que están elaboradas con cepas de baja virulencia como la B1, C2, LS, Clone30, PHY.LMV42 y VG/GA, vacunas de virus inactivado que contienen las cepas Kimber, Ulster, LS, clone 30 o B1; también se dispone de vacunas recombinantes: B1-IA donde el vector cepa B1 expresa una proteína del virus de influenza, LS-IA el vector cepa LS expresa una proteína del virus de influenza, HVT-EN y HVT-F donde el vector herpesvirus del pavo expresa una proteína del virus de Newcastle; sin embargo, estas cepas son clasificadas en el mismo genotipo que los virus aislados en la década de 1940 (I o II), pero son filogenéticamente divergentes de cepas causantes de los brotes

recientes de la EN en América del Norte, clasificadas dentro del genotipo V (Miller *et al.*, 2007).

Respuesta inmune contra el VEN

Sistema inmune innato

Los principales componentes de la inmunidad innata son; (1) las barreras físicas; (2) células fagocíticas, incluidos macrófagos y células asesinas naturales (NK); (3) las proteínas del complemento y los mediadores de la inflamación; y (4) citoquinas. En general, la respuesta inmune innata a la infección contra el VEN es una reacción inmediata, mediada por receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que reconocen marcadores moleculares conservados evolutivamente en el patógeno, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), los PRR's inducen señales intracelulares responsables de la activación de genes que codifican citocinas pro-inflamatorias, factores anti-apoptóticos e interferón, diseñadas para limitar y contener la replicación viral (Kapczynski *et al* 2013).

La Infección in vitro con el VEN resulta en la inducción de óxido nítrico en células mononucleares y heterófilos de aves, en macrófagos se detecta Interferón alfa y beta y en células mononucleares interferón gama. Además, la infección de heterófilos de pollo disminuyó la capacidad de fagocitar a las bacterias, alterando su función y haciendo a las aves más susceptibles a una infección secundaria (Kapczynski *et al* 2013). En otros estudios las células esplénicas producen interleucina 6, interferón alfa y beta 6 horas después de la exposición a VEN virulentos, pero no a lentogénicos. El interferón gama secretado por las células NK y los macrófagos activos, promueve la inmunidad mediada por células (CMI) 1 día después de la infección (Miller *et al* 2013).

Inmunidad adaptativa

La CMI es la inmunidad adaptativa específica mediada por linfocitos T y ha sido sugerida como un factor importante para la protección de pollos vacunados contra VEN. Las subpoblaciones de linfocitos T, incluyen células T auxiliares CD4⁺ que

secretan citoquinas, y linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺, constituyen las principales células de la respuesta de la CMI (Kapczynski *et al* 2013).

Inmunidad mediada por células. En mamíferos y aves, la eliminación de patógenos intracelulares depende críticamente de CD8⁺ CTL, que reconocen péptidos derivados de antígenos presentados por medio del complejo principal de histocompatibilidad I (MHC I) en la superficie de las células infectadas. En los mamíferos, la CMI se asocia con cierto perfil de citoquinas. La mayoría de las citoquinas asociadas con Th1 en pollos están identificadas y pueden ser monitoreados (Schijns *et al* 2013).

Inmunidad humoral. Después de la exposición al VEN, los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas que secretan 3 tipos de anticuerpos neutralizantes específicos para el antígeno. Estos anticuerpos son necesarios para proteger a las aves contra la morbilidad y mortalidad después de la infección con VEN virulentos. En el pollo, 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 6 días después de la infección o la vacunación con virus activos, el pico de anticuerpos se alcanza entre 21-28 días después de la infección. Aproximadamente el 30% de IgY y 1% de IgM e IgA presentes en el plasma de la gallina se transfieren pasivamente a la descendencia y si los niveles de anticuerpos contra el VEN son lo suficientemente altos pueden proporcionar protección hasta que los niveles caen por debajo de un nivel de protección. Sin embargo este anticuerpo materno puede interferir con la vacunación con virus activo mediante la neutralización del virus vacunal (Kapczynski *et al* 2013).

Existe en el mercado una vacuna recombinante (quimera) comercial que comparte gran homología con las cepas de desafío de México (cepa rP05) Esta vacuna usa como vector a la cepa virulenta P05 (Absalón *et al.*, 2012) del genotipo V del VEN

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 genéticamente en la secuencia de aminoácidos en el sitio de activación con el objeto de cambiar su genoma altamente virulento a uno similar al de la cepa LS y así disminuir su virulencia (Morales *et al.*, 2011). En el cuadro 1 se muestran las similitudes de aminoácidos y nucleótidos de los genes clave en la neutralización del VEN (HN y F). Al comparar el genoma reportado de la cepa rP05 (Garzón *et al.*, 2013) con virus de genotipo homólogo y heterólogo, se observa mayor similitud con la cepa P05, genotipo V. La mayor homología en las proteínas HN y F sustenta la suposición de que la vacuna de genotipo V inducirá mayor protección. Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo general la evaluación del efecto de diferentes dosis de una vacuna recombinante quimérica comercial contra la EN sobre la supervivencia al desafío, los parámetros productivos, reacción postvacunal, inmunidad humoral (local y sistémica) y la excreción viral.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que todos los estados de México han sido declarados libres de la EN, hay indicios de que ocurren focos de la infección incluso después de una vacunación intensiva, y la severidad con la que un brote afecta a la parvada puede deberse a la divergencia antigénica entre la cepa de la vacuna y las cepas de campo circulantes. Las vacunas elaboradas con cepas de los genotipos I y II disponibles en el mercado inducen protección contra la morbilidad y la mortalidad, pero varios estudios han demostrado que no previenen la infección ni la excreción del virus, por lo que un desafío con cepas del VEN altamente virulentas del genotipo V se puede transmitir a aves susceptibles. Los estudios realizados por Xiao *et al.*, (2012) y Miller *et al.*, (2007 y 2009) demostraron que una vacuna del mismo genotipo a la del desafío causó mayor protección al reducir significativamente la excreción viral al compararla con vacunas de diferente genotipo. La vacuna con la cepa rP05 se ha posicionado como el producto líder en

México para la prevención de la EN; sin embargo, hay pocos trabajos que demuestren científicamente la efectividad del producto.

HIPÓTESIS

Si el virus de la vacuna con la cepa rP05, clasificada como del genotipo V tiene mayor homología con las cepas del VEN que circulan en México, entonces se requiere menor dosis de vacuna para conferir protección a las aves.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la eficacia de diferentes dosis de la vacuna recombinante de la cepa rP05 en pollos comerciales desafiados con una cepa virulenta de la enfermedad de Newcastle.

Objetivos particulares

Evaluar en pollos de engorda comerciales: reacción post-vacunación, inmunidad humoral, inmunidad local, excreción viral, supervivencia al desafío, conversión alimenticia y peso final, utilizando diferentes dosis de la vacuna comercial recombinante de la cepa rP05.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización

La prueba biológica se realizó en las unidades de aislamiento de la empresa Investigación Aplicada S. A. (IASA) ubicadas en Tehuacán, Puebla. Las pruebas de virología y serología se realizaron en IASA y en el Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves (DMZA), de la FMVZ-UNAM.

Biológicos

Se utilizaron vacunas comerciales de virus activo de las cepas: LS y rP05. Las vacunas se titularon ($\text{DIEP}_{50}/\text{ml}$) y se ajustaron a diferentes títulos. Para el desafío se utilizó la cepa virulenta P05 del genotipo V del VEN, la cual fue aislada en el estado de Puebla en 2005, caracterizada por Absalón en 2012 y conservada en congelación en el cepario de IASA.

Estrategia experimental

Experimento 1: pollos comerciales de engorda, sexo mixto de 1 día de edad ($n=132$) fueron alojados en unidades de aislamiento con filtros para aire y presión negativa. A los 1 y 21 días de edad, de 15 pollos se recolectaron muestras de sangre sin anticoagulante para la obtención de sueros, fueron conservados en congelación a -20°C hasta evaluar la concentración de anticuerpos circulantes contra el VEN, *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) y *Mycoplasma synoviae* (Ms). Los anticuerpos contra el VEN se midieron mediante la prueba de HI método β , de acuerdo con la metodología previamente descrita (OIE 2012; Alexander-Senne, 2008), se usó como antígeno el virus LS; además, se midieron anticuerpos contra el VEN, Mg y Ms por medio de un kit ELISA comercial.

Al día 21 de edad se formaron 5 grupos de 12 pollos cada uno, para cada vacuna comercial, y se les aplicó por vía ocular $30\ \mu\text{L}$ de la vacuna correspondiente: recombinante rP05 o LS con los siguientes títulos antigénicos ($\text{DIEP}_{50}/\text{ml}$): grupo 1: $10^{7.5}$ 2: $10^{6.8}$, 3: $10^{5.8}$, 4: $10^{4.8}$ y 5: $10^{3.8}$, cuadro 2. Para evaluar la reacción post-

vacunal se modificó el modelo de Allan-Borland, 1979); las aves se observaron durante 13 días, se calificaron con los siguientes criterios: 0= normal, 1= estornudos o secreción nasal, 2= enfermedad respiratoria. Además, se incluyó un grupo no vacunado de 12 aves como control positivo de virus.

En los días 35 y 45 de edad se recolectaron muestras de sangre a 5 pollos de cada grupo para medir la inmunidad humoral sistémica por HI y virus seroneutralización (VSN) método α , en las dos pruebas se utilizaron los antígenos LS, rP05 y P05, también se empleó un ELISA comercial para cuantificar IgY sistémica y este día también se tomaron 5 hisopos traqueales que fueron conservados en viales con 0.5 ml de PBS a -20°C hasta cuantificar por ELISA la cantidad de IgA secretoria de la mucosa traqueal.

El día 35 de edad, todos los pollos se desafiaron por vía ocular y respiratoria con la cepa P05 del VEN genotipo V utilizando una dosis de $10^{7.8}$ $\text{DL}_{50}/0.2$ ml. Los pollos se observaron 2 veces al día, durante 10 días post-desafío, los signos de enfermedad compatible con la EN se registraron con la siguiente puntuación: 0= normal, 1= enfermo leve (estornudos, edema peri-ocular, plumas erizadas.) 2= enfermo moderado (dificultad para respirar, diarrea), 3= enfermo severo (postración, signos nerviosos) y 4= muerto. Al 2°, 4° y 7° día post-desafío, de los pollos con signos clínicos se tomó un pool de 3 hisopos traqueales y 3 cloacales para detectar aves positivas al gen de matriz (M) del VEN, excreción viral, por medio de la técnica de rRT-PCR, siguiendo el protocolo descrito por Wise *et al.*, (2004) en resumen, el primer paso de transcripción inversa se llevó a cabo durante 30 minutos a 50°C , seguido por 15 minutos a 95°C . Las condiciones de los ciclos para los iniciadores del gen de matriz (M+4100 5'-AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3'-M-4220 5'-CCTGAGGAGAG GCATTTGCTA-3') consistieron en 40 ciclos de 10 segundos de desnaturalización a 94°C , 30 segundos de hibridación a 52°C , y extensión a 72°C por 10 segundos.

Los pollos se mantuvieron bajo alimentación controlada, se registró el consumo de alimento, índice de conversión alimenticia y el peso semanal. Los pollos muertos por síndrome ascítico fueron excluidos de la investigación.

Pruebas serológicas

Inmunidad sistémica y local (ELISA IgY e IgA)

Se realizó la prueba ELISA técnica indirecta para cuantificar anticuerpos IgY circulantes contra el VEN, Mg y Ms de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit comercial NDV-0500®, MGA-0200® y MSA-0200® (AffiniTECH LTD., Bentonville, AR, USA), los sueros se diluyeron 1:400, las placas ELISA fueron leídas en un espectrofotómetro con un filtro de 405 nm y el título de anticuerpos se calculó con el software UniVet versión 1.2.7, se consideraron positivos a partir de un título de 400. Para medir IgA secretoria de la mucosa traqueal contra el VEN el kit NDV-0500 se modificó utilizando un conjugado anti-IgA de pollo diluido 1:8,000, las muestras no fueron diluidas, el cálculo de los títulos y la interpretación de los resultados fue el mismo que para IgY.

Inhibición de la hemoaglutinación.

Siguiendo la metodología descrita por Alexander-Senne (2008) en una placa con fondo en V se realizaron diluciones dobles seriadas del suero, se inició con dilución 1:10, posteriormente se agregaron 50 ul del antígeno viral con 8 UHA conocido en cada pozo. Se dejó incubar durante 30 minutos, después se agregaron 50 ul de eritrocitos de ave concentrados al 0.5%, la placa se incubo por 30 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó un suero con título conocido como control positivo y un control negativo, el titulo obtenido fue expresado como el reciproco de la dilución más alta del suero que fue capaz de inhibir las 8 UHA y fueron considerados positivos con un título $\geq 1:20$ (OIE, 2012).

Antigenicidad cruzada.

Para identificar las respuestas homólogas y heterólogas de cada uno de los virus (rP05, LS y P05) se realizó la metodología de HI antes descrita. Del título de anticuerpos obtenido de la confrontación de cada uno de los sueros con cada virus, se calculó la relación antigénica utilizando la ecuación descrita por Archetti y Horsfall (1950):

r= valor de relación antigénica

$$r = \sqrt{r_1 \times r_2}$$

r1= título heterólogo #2/ título homólogo #1

r2= título heterólogo #1/ título homólogo #2

Las cepas no tienen diferencia antigénica significativa cuando presentan un valor de relación antigénica (r) entre 0.5-2.0, otro valor indica que existe diferencia en la relación antigénica entre las cepas (Ibu *et al.*, 2008).

Virus sero neutralización – Índice de Neutralización

Se desarrolló un ensayo de sero-neutralización método alfa similar al reportado por Alexander y Senne (2008). Para ello cada cepa fue titulada y ajustada a 10^6 DIEP₅₀/ml. 0.400 ml de diluciones décuples seriadas de las cepas a evaluar fueron mezcladas con igual volumen de sueros con títulos fijos, y se incubaron durante 45 minutos a 37°C. Posteriormente, cada mezcla se inoculó en cinco embriones de pollo y se incubaron durante 5 días a 37°C, se utilizó un testigo positivo de virus. De acuerdo con Markham *et al.*, (1959) con índice neutralizante (IN) de 1.0 a 2.0 se considera que el suero es capaz de neutralizar al virus, en este estudio se consideró el IN de 1.0 como neutralizante del virus.

Experimento 2: Se formaron 3 grupos de 10 pollos de 21 días de edad cada uno y vacunados con la cepa recombinante rP05 con los siguientes títulos antigénicos (DIEP₅₀/ml); 1: $10^{6.6}$, 2: $10^{6.1}$ y 3: $10^{5.1}$, otros tres grupos de 10 pollos de 21 días de edad cada uno, fueron vacunados con la cepa comercial LS con los siguientes títulos 4: $10^{6.9}$, 5: $10^{6.4}$ y 6: $10^{6.1}$. Se utilizó un grupo 7 como control no vacunado, cuadro 3. Al día 35 todos los pollos fueron desafiados con la cepa P05 del VEN con una dosis de $10^{6.6}$ DL₅₀/0.2 ml. La metodología para la toma de muestras y evaluación serológica, virológica y parámetros productivos fue la misma que en el experimento 1.

Análisis estadístico

El título promedio de anticuerpos ELISA, peso final de los pollos y el índice de conversión alimenticia se analizó por análisis de la varianza y la prueba de Tukey para la comparación de medias entre grupos. La mortalidad y pollos excretando al VEN se analizó por medio de comparación por proporciones. En todos los casos el valor de alfa se estableció en 0.05.

El título de anticuerpos de la inhibición de la hemoaglutinación se comparó por relación antigénica (Archetti y Horsfall 1950) La reacción postvacunal y grado de enfermedad se evaluaron por análisis de conglomerados (técnica multivariante que agrupa variables con la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos, Vargas 1998).

RESULTADOS

Experimento 1

Reacción post-vacunal

El cuadro 4 muestra el registro de pollos de engorda comerciales que presentaron reacción a la vacunación después de ser inoculados con diferentes dosis de las cepas LS y rP05. En todos los grupos al menos 1 pollo fue evaluado en la categoría de 0 (sanos) o 1 (estornudos) y no se registró ningún pollo con grado 2 (enfermedad respiratoria), la cantidad de pollos por grupo (n=12) que presentaron estornudos fluctuaron entre 1 en los grupos control, rP05 $10^{4.8}$, rP05 $10^{3.8}$ y 4 registrados en el grupo LS $10^{5.8}$. La reacción postvacunal inició a los 2 días y persistió al 10° día post vacunación.

En la figura 1 se presenta el dendograma obtenido bajo la implementación del coeficiente de correlación de Pearson, las diferentes clases son agrupadas por similitudes que son resultado de la evaluación de la reacción post-vacunación de los grupos de pollos vacunados con diferentes títulos antigénicos vía ocular con las cepas rP05 o LS. Los grupos evaluados se concentran en 4 clases, los grupos que tuvieron más observaciones en la reacción post-vacunal: LS $10^{7.5}$ y LS $10^{5.8}$, se encuentran separados en un conglomerado independiente, lo que indica que existe diferencia en la reacción post-vacunal con el resto de grupos evaluados.

Grado de enfermedad

En el cuadro 5 se muestran los resultados después del desafío de los pollos con la cepa P05 del VEN y su observación durante 10 días. Los pollos en la categoría 4 (muerto) estuvieron en los grupos: control: 12/12, rP05 $10^{3.8}$: 10/12 y LS $10^{3.8}$: 3/12. Al final de los 10 días, en la categoría 3 (enfermo severo) no fue registrado ningún pollo ya que aquellos que en un momento determinado estuvieron clasificados en dicha categoría, posteriormente se registraron como muertos. En la clasificación 2 (enfermo moderado) se registraron 1 y 2 pollos de los grupos rP05

$10^{4.8}$ y LS $10^{3.8}$, respectivamente. La mayor parte de los pollos presentaron estornudos, conjuntivitis leve o secreción nasal, por lo que se clasificaron como 1 (enfermo leve).

El análisis de conglomerados del grado de enfermedad post-desafío se presenta en la figura 2. Se observa la formación de 3 clases, en dos de ellas están los grupos en los que se presentó mortalidad (control, rP05 $10^{3.8}$ y LS $10^{3.8}$) son colocados en dos clases similares entre ellas; a su vez, estas se encuentran separadas de la tercera formada por el resto de grupos en los que no hubo mortalidad.

Supervivencia al desafío

En la figura 3 se muestran los porcentajes de supervivencia de los diferentes grupos de pollos de engorda vacunados con las cepas LS y rP05, posteriormente desafiados vía ocular y nasal con una dosis de $10^{7.8}$ DL₅₀/0.2 ml de la cepa P05 del VEN. Los grupos vacunados con menor supervivencia de aves post desafío fueron: rP05 $10^{3.8}$ (2 pollos, 17% de supervivencia) y LS $10^{3.8}$ (9 pollos, 75% de supervivencia); en la comparación por proporciones no hubo diferencia estadística entre ellos y solo el grupo rP05 $10^{3.8}$ tuvo diferencia estadística con el resto de los grupos vacunados. El grupo control (0% de supervivencia) tuvo diferencia estadística con todos los grupos vacunados, excepto con el grupo rP05 $10^{3.8}$. El pico de mortalidad se observó en el 4° día post-desafío.

Serología

Al día 21 de edad el 100% de las muestras de ambos experimentos resultaron negativas para anticuerpos contra el VEN, Mg y Ms, medidos con los ensayos de HI y ELISA.

Antigenicidad cruzada. La prueba de inhibición de la hemoaglutinación cruzada se realizó utilizando 8 UHA de cada uno de los virus y fueron confrontados con cada uno de los antisueros. La media geométrica del título de anticuerpos obtenido se

presenta en el cuadro 6. Los títulos HI fueron transformados en valores r_1 y r_2 , los cuales se presentan en el cuadro 7 y los valores de r_1 y r_2 fueron usados en la fórmula de Archetti y Horsfall (1950), para calcular r , que se muestra en el Cuadro 8.

Los valores de relación antigénica cercanos a 1 en el cuadro 6, indica la especificidad de los anticuerpos generados por el virus homólogo. En los títulos de las respuestas heterólogas, resultado de la confrontación de un virus con los otros antisueros, la reacción es diferente, identificando diferencia antigénica entre la vacuna rP05 y P05 en los grupos rP05 $10^{6.8}$ (r : 0.44), rP05 $10^{5.8}$ (r : 0.5) y rP05 $10^{4.8}$ (r : 0.5) al día 35 de edad. Por otro lado al día 45 de edad se detectó diferencia antigénica entre las cepas LS y P05 en los grupos LS $10^{6.8}$ (r : 4.29) y LS $10^{3.8}$ (r : 2.38)

ELISA vs IgY. En el cuadro 9, se observa la media aritmética de los títulos de anticuerpo contra el VEN a los 35 (pre-desafío) y 45 (post-desafío) días de edad, obtenidos por la pruebas ELISA vs IgY circulante e IgA local de la mucosa traqueal. En las muestras del día 35 los títulos de anticuerpos de los grupos LS $10^{5.8}$ y LS $10^{6.8}$ fueron mayores ($P < 0.05$) que en el resto de los grupos. En el día 45 el título de anticuerpos del grupo LS $10^{6.8}$ fue estadísticamente diferente a rP05 $10^{6.8}$ y rP05 $10^{4.8}$, no hubo diferencia estadística con los demás grupos.

ELISA vs IgA. Al día 35 de edad el grupo LS $10^{6.8}$ tuvo mayor título de IgA que los grupos rP05, excepto rP05 $10^{6.8}$ y el grupo testigo, pero no tuvo diferencia estadística con los otros grupos LS. A los 45 días no se detectó diferencia estadística entre los grupos.

Virus sero-neutralización. En el cuadro 10 se muestra el índice de neutralización (IN) obtenido por el método alfa de la prueba de virus sero-neutralización en embrión de pollo, utilizando los antígenos vacunales y de desafío.

Al día 35 de edad, el suero de los grupos vacunados con rP05 o LS fue capaz de neutralizar al antígeno LS, con un mayor IN aparente en la reacción homóloga. Ninguno de los grupos vacunados reaccionó con el antígeno P05, excepto el grupo LS^{4.8}. La neutralización del antígeno rP05 aparentemente fue mayor con el suero heterólogo LS que con el homólogo rP05, incluso, se observa que el suero de los grupos rP05 10^{4.8} y rP05 10^{3.8} fueron incapaces de neutralizar al antígeno homólogo. Al día 45 de edad el suero de todos los grupos neutralizó tanto al antígeno homólogo como al heterólogo y no hubo diferencia en el IN entre ellos.

Parámetros productivos

El cuadro 11 muestra el peso final y la conversión alimenticia de pollos de engorda comerciales de 45 días de edad mantenidos en unidades de aislamiento con presión de aire negativo, alimentación restringida e iluminación continua, vacunados con las cepas rP05, LS y posteriormente desafiados con la cepa P05 del VEN. La conversión alimenticia más alta ($P < 0.05$) se observa en el grupo rP05 10^{3.8}. El peso final del grupo rP05 10^{5.8} fue mayor ($P < 0.50$) que el de los grupos rP05 10^{6.8}, rP05 10^{3.8} pero no fue mayor al de los grupos vacunados con LS.

Excreción del virus de la enfermedad de Newcastle

En el cuadro 12 se muestran los resultados de la evaluación de muestras a la presencia del gen M del VEN identificado mediante la técnica de rRT-PCR, se realizó un análisis de proporciones entre los grupos.

Independiente de la dosis vacunal, aparentemente se dio mayor excreción viral en los grupos vacunados con rP05 que con LS, se observó mayor cantidad de muestras positivas a los 4 días post-desafío que a los 2; a los 7 días solo una muestra del grupo vacunado con la menor dosis de LS resultó positiva, mientras que en 3 de los 5 grupos vacunados con rP05 se detectó al menos una muestra positiva. Las muestras del grupo testigo fueron positivas a los 2 y 4 días, no hubo aves sobrevivientes a los 7 días.

Se ha observado en diferentes investigaciones (Miller *et al.*, 2007; 2009; 2013) que aves vacunadas con cepa de genotipo homólogo al virus de desafío aportan ventajas al reducir la excreción viral, comparadas a las vacunas heterólogas. Con base en los resultados del experimento 1, se llevaron a cabo modificaciones en un segundo experimento para reforzar el análisis de la excreción viral.

Experimento 2

Reacción post-vacunal

En el experimento 2 (Cuadro 13), al igual que en el experimento 1, la única reacción a la vacuna que se registro fue en la categoría 1 (estornudos) y el número de pollos tuvo un intervalo de 1/10 en los grupos control, rP05 10^{6.1} y rP05 10^{5.1}, mientras la máxima observación en esa categoría fue para el grupo LS 10^{6.9} con 4/10 pollos. La reacción post vacunal persistió por el mismo periodo que en el experimento 1. En el análisis de conglomerados (Figura 4) los grupos fueron clasificados en 3 clases, de acuerdo con las similitudes de los registros de las observaciones de reacción post-vacunal, los grupos LS 10^{6.4}, LS 10^{6.9} y rP05 10^{6.6} están estrechamente relacionados por lo que se presentan en el dendograma en un solo conglomerado, en estos grupos se observó un mayor número de aves con reacción post-vacunal.

Grado de enfermedad

En el cuadro 14, se muestran los registros de signos de enfermedad del experimento 2, solo en el grupo control se registraron pollos en la clase 4 (muertos) 9/9, el único signo de enfermedad en los grupos vacunados fue secreción nasal, estornudos o conjuntivitis leve en los grupos LS 10^{6.4} 1/8 pollos y LS 10^{5.4} 2/10, por lo que se clasificaron en la categoría 1 (enfermedad leve).

El análisis de conglomerados del grado de enfermedad se presenta en la figura 5, el único grupo donde se registraron pollos en la categoría 4 (muertos) fue el

control, y este se encuentra en una clase distante al resto de grupos vacunados, en ninguno de ellos murieron aves a consecuencia del desafío.

Supervivencia al desafío

En la figura 6 se muestran los porcentajes de supervivencia de los diferentes grupos de pollos de engorda vacunados con las cepas LS y rP05, posteriormente desafiados vía ocular y nasal con una dosis de $10^{6.3}$ DL₅₀/0.2 ml de la cepa P05 del VEN. Todos los grupos vacunados tuvieron 100% de supervivencia y 0% en el grupo control, este último con diferencia estadística con el resto de grupos evaluados, la mortalidad del grupo control se presentó durante el curso del tercer y cuarto día post-desafío.

Serología

Al igual que en el experimento anterior al día 21 de edad el 100% de las muestras de ambos experimentos resultaron negativas para anticuerpos contra el VEN, Mg y Ms, medidos con los ensayos de HI y ELISA.

Antigenicidad cruzada. La media geométrica de los títulos de anticuerpos contra el VEN obtenidos por medio de la prueba de HI cruzada se presentan en el cuadro 15. Los valores r1 y r2 se presentan en el cuadro 16 y los valores r obtenidos de acuerdo a la fórmula de Archetti y Horsfall (1950), se muestra en el Cuadro 17.

Como se describió anteriormente resultados r entre 0.51 a 1.99 indican que no existe diferencia en la relación antigénica entre virus y cualquier valor fuera de ese rango se considera diferente antigénicamente, los resultados obtenidos en el experimento 2 indican que existe diferencia antigénica entre la vacuna rP05 y LS en los grupos rP05 $10^{6.1}$ (r: 0.44) y rP05 $10^{5.1}$ (r: 0.33), al día 35 de edad. Por otro lado al día 45 de edad se detectó diferencia antigénica entre las cepas rP05 y LS en el grupo rP05 $10^{6.1}$ (r: 0.44).

ELISA vs IgY. En el cuadro 18 se observa el resultado de los títulos de anticuerpos IgY del día 35 de edad indica que el grupo LS $10^{5.4}$ es mayor estadísticamente a todos los grupos vacunados con la cepa rP05 y testigo, al compararse con los demás grupos vacunados con la cepa LS no existe tal diferencia. En el muestreo del día 45 de edad el grupo LS $10^{5.4}$ fue estadísticamente diferente a los grupos vacunados con la cepa rP05.

ELISA vs IgA. En el muestreo pre-desafío del día 35 de edad se observó que los grupos LS $10^{6.9}$ y LS $10^{5.4}$ fueron mayores estadísticamente a todos los grupos vacunados con la cepa rP05 y testigo, el grupo LS $10^{6.4}$ tuvo diferencia estadística con los grupos rP05, excepto rP05 $10^{5.1}$. No se registró diferencia estadística entre grupos, en los títulos de anticuerpos del día 45, cuadro 18.

Virus sero-neutralización. En el cuadro 19 se muestra el IN del experimento 2. Al día 35 de edad, el IN de los grupos vacunados con LS es mayor contra los antígenos LS y P05 que el de los pollos inmunizados con la cepa rP05, aparentemente no hay diferencia en el IN de los grupos para neutralizar al antígeno rP05. El suero del grupo testigo no neutralizó a ninguno de los antígenos. En el día 45 de edad, el grupo rP05 $10^{5.1}$ mostró el menor IN contra los antígenos LS y rP05; aunque no se observa diferencia marcada en la neutralización de los antígenos LS y rP05 por el suero de los grupos vacunados con LS o rP05, aparentemente la neutralización del antígeno P05 es mayor con el suero de los grupos rP05 que con el de LS.

Parámetros productivos

En el experimento 2 no se encontró diferencia estadística en el peso final y conversión alimenticia entre los grupos evaluados (cuadro 20).

Excreción del virus de la enfermedad de Newcastle

El cuadro 21 muestra los resultados de la evaluación de muestras a la presencia del VEN identificado mediante la técnica de rRT-PCR, se realizó un análisis de

proporciones entre los grupos. Solo se detectó diferencia estadística en el día 4 post-desafío, en el grupo control se identificó en las cuatro muestras al gen M del VEN y cuando se compara a los grupos vacunados es diferente estadísticamente con aquellos que no tuvieron ninguna muestra positiva: rP05 $10^{6.1}$, rP05 $10^{5.1}$, LS $10^{6.9}$ y LS $10^{6.4}$.

DISCUSIÓN

En esta investigación se comprobó que la vacunación contra el VEN es sin duda una medida eficiente para prevenir y controlar la EN causada por cepas muy virulentas, sin embargo, la aplicación de virus activos tiene el inconveniente de crear reacción post-vacunal, y agentes infecciosos como *E. coli*, Mg y Ms pueden complicar los signos derivados de la aplicación y posterior replicación del virus vacunal en las células del tracto respiratorio, así lo demuestra la investigación realizada por Van y Goren en 1991, en comparación con la anterior investigación, en este trabajo la observación de solo estornudos como secuela de la aplicación de vacunas activas vía nasal en la evaluación de la reacción post-vacunal, fue previsible debido a que el experimento se realizó bajo condiciones controladas, en pollos libres de agentes infecciosos como Mg y Ms que pudieran causar un efecto adverso a la vacunación. La presentación de estornudos a partir del 2° día post-vacunación es coincidente con estudios precedentes realizados por Allan y Borland en 1979, donde solo se presentó este signo durante el monitoreo.

Allan y Borland demostraron que es posible que vacunas elaboradas de diferentes cepas son capaces de producir efectos diferentes en la reacción post-vacunal. En nuestros experimentos se demostró que un título antigénico mínimo de $10^{5.8}$ DIEP₅₀/ml o $10^{7.5}$ DIEP₅₀/ml en pollos de engorda vacunados con la cepa LS son suficientes para poder producir una reacción post-vacunal y que ésta pueda ser diferente a los grupos de pollos que fueron vacunados con la cepa rP05; no se detectó reacción post-vacunal estadísticamente significativa en el grupo $10^{6.8}$ DIEP₅₀/ml debido a que las observaciones de pollos en la categoría de estornudos en este grupo fue menor a los anteriores grupos y probablemente algún signo de reacción post-vacunal pudo pasar inadvertido. No obstante en el experimento 2 los grupos que fueron vacunados con la cepa rP05 solo en los pollos que fueron inoculados con un título antigénico de $10^{6.6}$ DIEP₅₀/ml fueron capaces de producir reacción post-vacunal que permitió diferenciarlos de los grupos que fueron inoculados con un título menor o del grupo control, comparado con el experimento

1, este título es menor a rP05 $10^{7.5}$ y $10^{6.8}$ DIEP₅₀/ml, sin embargo en ellos no se detectó diferencia estadística en la reacción post-vacunal, quizá porque la prueba utilizada es un modelo de evaluación subjetivo y posiblemente deba considerarse un tiempo de observación mayor a 5 minutos para obtener resultados más confiables.

Lo anterior indica que la vacuna recombinante rP05 es capaz de producir reacción después de la vacunación, sin embargo la vacuna de la cepa LS produce reacción post-vacunal aun cuando se utiliza un título antigénico menor, esto último es comparable a las investigaciones realizadas por Abdul en 2012, Allan y Borland en 1979, estudios donde se determinó que vacunas de la cepa LS causaban una reacción más alta comparadas a las cepas Clone30 y B1, sin embargo lo anterior contrasta con Perozo *et al.*, 2004, investigación en la que no encontraron diferencia estadística entre dos programas de vacunación en pollos bajo condiciones de campo utilizando la cepa LS, VG/GA y B1, lo anterior posiblemente debido a la neutralización viral que son capaces de realizar los anticuerpos maternos.

En la evaluación del grado de enfermedad, los grupos vacunados en donde se utilizaron títulos antigénicos superiores a $10^{4.8}$ DIEP₅₀/ml fueron capaces de proteger contra la mortalidad y signos severos de la EN, a pesar de lo anterior en ninguno de los títulos antigénicos utilizados en los diferentes grupos experimentales fue suficiente para prevenir la manifestación de al menos un signo compatible con la EN, ya que a partir de las 48 horas post-desafío se presentó en estos grupos conjuntivitis leve, estornudos o secreción nasal, por otro lado los grupos que presentaron un mayor grado de enfermedad son aquellos que fueron afectados por mortalidad y signos severos de la EN, estos grupos fueron vacunados con una menor dosis (rP05 $10^{3.8}$ DIEP₅₀/ml 83%, LS $10^{3.8}$ DIEP₅₀/ml 25% y control 100%) registrándose la mortalidad entre el día 3 y 6 post-desafío, en estos grupos se calificó con un grado de enfermedad mayor comparado al resto de grupos. No obstante en experimentos realizados por Bawala en 2009 obtuvo

resultados similares cuando se vacunaron aves SPF (del inglés: specific pathogens free) utilizando la vacuna de virus activo cepa lentogénica VG/GA con diferentes títulos antigénicos (10^3 , $10^{4.5}$ y 10^6 DIEP₅₀/ml), demostraron que utilizando la vacuna con título de 10^3 DIEP₅₀/ml el promedio de puntuaciones de signos clínicos es mayor a los grupos que se inmunizaron con $10^{4.5}$ y 10^6 DIEP₅₀/ml y muy parecido al grupo control, el modelo matemático que utilizó Bawala no permitió comparar estadísticamente a los grupos vacunados, pero en esta investigación se demostró que estadísticamente no existe diferencia significativa al utilizar un título antigénico de $10^{3.8}$ comparado a un grupo control sin inmunizar.

En los porcentajes de supervivencia logrados por los diferentes títulos antigénicos de las vacunas, solo en las dosis más bajas que fueron empleadas en los grupos rP05 $10^{3.8}$ y LS $10^{3.8}$ DIEP₅₀/ml la supervivencia disminuyó hasta un 17% y 75% respectivamente, sin haber diferencia estadística entre ellos, por otro lado el grupo LS $10^{3.8}$ si obtuvo diferencia estadística comparada al grupo control, aunque con los resultados anteriores es complicado realizar comparaciones objetivas con otros estudios debido a las diferencias en los biológicos utilizados y diseño experimental.

Existen pruebas estandarizadas para la caracterización de cepas del VEN, de acuerdo con Absalón *et al.*, en 2012 la cepa P05 utilizada en la presente investigación fue caracterizada y clasificada como velogénica al determinarse un TMME de 36 horas y un IPIC de 1.9, aunque en el estudio precedente de Bawala utilizaron las cepas GPMV (TMME: 48 y IPIC: 1.85) y RAINBOW (TMME: 48 y IPIC: 2.0) del VEN, igualmente clasificadas como velogénicas, la protección de la vacuna de la cepa VG/GA contra la cepa RAINBOW fue muy parecida en la presente investigación al obtener un 0% de protección utilizando una dosis de 10^3 y 94% de protección con una dosis de $10^{4.5}$ DIEP₅₀/ml. Por otro lado Garzón en 2013 demostró que utilizando un título de 10^8 DIEP₅₀/ml de la vacuna cepa rP05, esta es capaz de proteger a las aves ante un desafío con un virus virulento de la

EN, sin embargo no existe ningún antecedente de investigaciones realizadas con diluciones de los biológicos del presente trabajo.

Al día 21 de edad por medio de la prueba HI y ELISA no se detectaron anticuerpos contra el VEN, Mg y MS, así mismo Turblin en 2009 y Gaffar EM *et al.*, en 1993, determinaron por medio de HI en pollos de engorda comerciales que los anticuerpos maternos contra el VEN fueron negativos a la edad de 20 días, sin embargo Al-Zubeedy en 2009 cuando utilizó la prueba ELISA aún al día 21 de edad los títulos de anticuerpo contra el VEN se mantuvieron positivos. Gharaibeh y Mahmoud reportaron una significativa disminución de la media geométrica de los títulos de anticuerpos maternos contra Mg y Ms al día 10 de edad y completamente negativos al día 20 de edad. Esta diferencia en el título de anticuerpos posiblemente, es debido a la cantidad de anticuerpos que es capaz de transmitir las aves reproductoras a la progenie.

En la evaluación de la inmunidad sistémica al día 35 de edad, no se encontró diferencia estadística entre las dosis aplicadas de la cepa rP05, y los grupos que fueron vacunados con la cepa LS obtuvieron un título hasta 3 veces más alto de anticuerpos comparado con los grupos que recibieron un título antigénico homólogo de la vacuna rP05, de ellos los grupos LS $10^{6.8}$ y LS $10^{5.8}$ DIEP₅₀/ml tuvieron diferencia estadística, los restantes no mostraron tal diferencia (LS $10^{7.5}$, LS $10^{4.8}$ y LS $10^{3.8}$ DIEP₅₀/ml), resultados semejantes fueron obtenidos por León en 1993 y Cornax et al. en 2012, quienes utilizaron diferentes concentraciones de antígeno y el grupo vacunado con mayor concentración viral no obtuvo un título de anticuerpos diferente estadísticamente al de menor concentración, sin embargo, al parecer esto no es un comportamiento biológico constante ya que Cárdenas *et al.* en 2015 encontraron una estrecha relación entre la concentración viral alta y títulos de anticuerpos altos, por el contrario en este trabajo el grupo de mayor título LS $10^{7.5}$ DIEP₅₀/ml, obtuvo menor título de anticuerpos, de las 5 muestras evaluadas en este grupo, dos de ellas obtuvieron un resultado negativo, por lo que el promedio de ese grupo disminuyó significativamente.

La mayor inmunogenicidad de la cepa LS contrasta con los resultados obtenidos por Miller *et al.*, en 2009 ya que cuando inocularon aves con las cepas recombinantes rA-CAFHN y rA-CAHN obtuvieron títulos de anticuerpos más altos comparados con los obtenidos con la cepa LS, posiblemente debido a la mayor capacidad de replicación que tienen estas cepas recombinantes al insertarles los genes de una cepa virulenta, lo que ofrece la ventaja de un mayor título de anticuerpos, pero con el inconveniente de una posible reacción post-vacunal más severa. Por otro lado Xiao *et al.*, en 2012 generaron por ingeniería genética el virus no virulento Ban/AF, a partir del VEN cepa Ban/10 clasificado como velogénico, se investigó su inmunogenicidad comparándolo con las cepas comerciales B1 y LS demostrando que las cepas tradicionales son capaces de producir 2 veces más anticuerpos que la cepa Ban/AF, coincidiendo así con la presente investigación.

Además de la inmunogenicidad, también se evaluó la relación antigénica entre la vacuna recombinante cepa rP05, LS y P05, se consideró una relación antigénica significativamente diferente entre aquellos virus que obtuvieron un valor $r \leq 0.5$ o ≥ 2 , con los antígenos utilizados se detectó diferencia antigénica entre la cepa rP05 y P05 en el experimento 1 y entre las cepas rP05 y LS en el experimento 2, aunque se observa diferencia antigénica en el experimento 1 entre las cepas rP05 y P05, los valores r son cercanos al punto de corte en los grupos rP05 $10^{6.8}$ ($r:0.44$), rP05 $10^{5.8}$ (0.50) y rP05 $10^{4.8}$ (0.50), los anteriores valores no son tan contundentes como los que se registraron en el experimento 2, entre las cepas rP05 y LS, observándose un valor r mínimo de $r:0.33$ en el grupo rP05 $10^{5.1}$, además en el experimento 1 los grupos vacunados con la cepa rP05, los títulos obtenidos con el antígeno P05 fueron bajos y esto no ocurrió en el experimento 2, es necesario incluir mayor número de muestras para obtener resultados más precisos. La divergencia antigénica entre cepas ha sido estrechamente relacionada con la distancia genética entre cepas, y se ha reportado que los aminoácidos 193, 194, 201, 263, 266, 287, 321, 332, 333, 345, 347, 350, 353, 356,

494, 513, 514, 516, 521, 538, 540, 568 y 569 de la proteína HN (Gu *et al* 2011; Hu *et al* 2010; Iorio *et al* 1986; Iorio-Bratt 1983; Gong-Cui 2011) y los aminoácidos 72, 74, 75, 78, 79, 157, 161, 171, y 343 de la proteína F (Yusoff *et al* 1989; Toyoda 1988; Neyt 1989) son determinantes antigénicos. Un cambio en ellos puede afectar la neutralización viral, la proteína HN de la cepa rP05 conserva 100% de similitud genética con la cepa P05; sin embargo, en este estudio no se detectó consistencia en la similitud antigénica con las pruebas HI y VSN, estos resultados coinciden con los de Garzón en 2013 quién encontró títulos de anticuerpos más altos en la prueba HI utilizando el antígeno LS en muestras de sueros de aves que fueron inmunizadas con la cepa rP05, igualmente, Ibu en 2008 encontró títulos de anticuerpos HI más elevados con antígenos heterólogos

De acuerdo con la secuencia reportada por Garzón *et al.*, (2013)) la proteína F de la cepa rP05 tiene aminoácidos diferentes a los de la cepa P05; sin embargo, hasta el momento ninguno de ellos ha sido identificado como determinante antigénico en la neutralización viral; por lo tanto, genéticamente, la cepa rP05 conserva los epitopes necesarios para la neutralización viral, por lo que se considera necesario llevar a cabo un estudio serológico con anticuerpos monoclonales específicos para los aminoácidos que son diferentes. Aunque el porcentaje de homología genética de la región que codifica para la proteína F entre la cepas rP05 y P05 es similar (96%), los resultados de la VSN indican que los sueros de los grupos vacunados con la cepa rP05 no fueron capaces de neutralizar al antígeno de genotipo homólogo P05, y los sueros de las aves vacunados con la cepa LS si obtuvieron un índice neutralizante alto con el antígeno homólogo LS, comparado con los antígenos heterólogos en el experimento 1, lo que coincide con la relación antigénica encontrada en la prueba HI. Por otro lado, en el experimento 2 se registraron índices neutralizantes más altos con el antígeno P05 y relativamente más bajos con el antígeno LS, lo que concuerda con los valores r . Anteriormente Xiao *et al.*, (2012); Miller *et al.*, (2007,

2009 y 2013) han observado similitud antigénica entre cepas de genotipo homólogo.

De acuerdo con Wise *et al.*, en 2004, la sensibilidad de la prueba rRT-PCR utilizada en este trabajo permite detectar muestras positivas al gen M del AMPV-1 con un título igual o mayor a 10^3 copias virales. Los grupos en donde más muestras fueron detectadas como positivas con excepción del grupo rP05 $10^{5.8}$ pertenecen a aquellos que fueron vacunados con una dosis más baja ($10^{3.8}$) y control, los grupos anteriores que obtuvieron un mayor número de muestras positivas a la excreción viral, fueron evaluadas con un menor título ELISA de IgA traqueal al día 35 y 45 de edad, la cual participa activamente en la neutralización viral e impide la excreción viral, de acuerdo con los estudios de Paniago 2007 y Corbanie 2007.

La diferencia estadística observada en la conversión alimenticia corresponde a los pollos vacunados con la dilución rP05 $10^{3.8}$, este grupo fue observado con un mayor grado de enfermedad post-desafío comparado al resto de grupos vacunados, de igual forma se vio afectado en el peso final, pero en esta variable solo mostró diferencia con un grupo debido a que los pollos sobrevivientes obtuvieron un peso final relativamente alto, estos pollos no fueron afectados por signos severos de la EN. Aunque en algunos grupos en la evaluación del peso final se registraron diferencias estadísticas, no se encontró consistencia de los resultados en el experimento 2, además de que las diferencias antes mencionadas solo se encontraron entre los grupos vacunados con la cepa rP05 y no cuando se compararon con los grupos vacunados con la cepa LS. Sin embargo, Morales *et al.*, 2011 han demostrado que la vacuna de la cepa rP05 en pollos bajo condiciones de producción comercial son capaces de obtener mejores parámetros productivos que cuando son vacunados con la cepa LS.

CONCLUSIONES

Aunque existen referencias bibliográficas que demuestran diferencias en la antigenicidad proporcionada por cepas de genotipo heterólogo y homólogo, en esta investigación no se detectó una mayor similitud antigénica entre la cepa rP05 y P05 comparada a la cepa heteróloga LS del genotipo II, con las pruebas serológicas de HI y VSN.

No es posible disminuir la dosis hasta un título antigénico de $10^{3.8}$ DIEP₅₀/ml y proporcionar protección superior al 90% contra el desafío exigido en la NOM-052-ZOO-1995, por lo tanto se rechaza la hipótesis.

Además, se demostró que las aves que reciben una dosis vacunal con título antigénico igual o superior a $10^{4.8}$ DIEP₅₀/ml de las cepas rP05 y LS están protegidas contra signos severos de la EN; sin embargo, ninguna de las dosis utilizadas protegió contra signos leves, aunque estos no afectaron el desempeño productivo de los pollos bajo condiciones de aislamiento, no se debe descartar que en condiciones de campo los microorganismos oportunistas puedan complicar la enfermedad y afectar los parámetros productivos, incluyendo mayor severidad de la reacción post-vacunal.

No se encontró diferencia en el número de aves excretando virus en los grupos vacunados con genotipo homólogo comparado con aquellos grupos de pollos vacunados con un genotipo diferente al virus de desafío.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
APMV	Avian paramyxovirus, paramyxovirus aviar
CD8 ⁺	cluster of differentiation, Cúmulo de diferenciación 8
CMI	cell-mediated Immunity, inmunidad mediada por células
CTL	cytotoxic T cell, célula T citotóxica
DIEP	Dosis infectante en embrión de pollo
DMZA	Departamento de medicina y zootecnia avícola
DOF	Diario oficial de la federación
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EN	Enfermedad de Newcastle
F	Fusión
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
g	Gramo
HI	Hemagglutination inhibition, inhibición de la hemoaglutinación
HN	Hemaglutinina-Neuraminidasa
IASA	Investigación Aplicada, Sociedad Anónima
IgA	Inmunoglobulina A
IgY	Inmunoglobulina Y
IN	Índice de neutralización

IPIC	Índice de patogenicidad intracerebral
LS	LaSota
M	Matriz
MCH	Major histocompatibility complex, complejo principal de histocompatibilidad
Mg	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
Ms	<i>Mycoplasma synoviae</i>
NI	Neuraminidase inhibition, inhibición de la neuraminidasa
NK	Natural killer, asesinas naturales
Nt	Nucleotido
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns, patrones moleculares asociados a patógenos
PRR	Pattern recognition receptor, receptores de reconocimiento de patrones
R	Valor de relación antigénica
SPF	Specific Pathogens Free, libre de patógenos específicos
TMME	Tiempo medio de mortalidad embrionaria
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
VEN	Virus de la enfermedad de Newcastle
VSN	Virus sero-neutralización

CUADROS

Cuadro 1. Similitud (%) de los genes F y HN de la cepa rP05 comparada con los virus utilizados en este estudio y una cepa representativa.

Genotipo	II		V		V	
Cepa	LaSota (AF077761)*		P05 (HM117720)		Chimalhuacán (KJ577136)	
Gen	% (nt)	% (aa)	% (nt)	% (aa)	% (nt)	% (aa)
F	90	94	96	96	96	95
H	85	89	100	100	99	99

* Entre paréntesis se muestra el número de acceso GeneBank.

Cuadro 2. Estrategia experimental, resumen de los grupos vacunados en el experimento 1, n=12.

Grupos	Vacuna	Título aplicado Log10 DIEP₅₀/mL
1	rP05	7.5
2		6.8
3		5.8
4		4.8
5		3.8
6	LS	7.5
7		6.8
8		5.8
9		4.8
10		3.8
11	Testigo	Sin vacunar

Cuadro 3. Estrategia experimental, resumen de los grupos vacunados en el experimento 2, n=10.

Grupos	Vacuna	Título aplicado Log10 DIEP ₅₀ /mL
1	rP05	6.6
2		5.1
3		5.1
4	LS	6.9
5		6.4
6		5.4
7	Testigo	Sin vacunar

Cuadro 4. Reacción post-vacunal a diferentes dosis de las cepas vacunales LS y rP05, experimento 1.

Grupo	Reacción post-vacunal		
	Sano	Estornudos	Enfermedad respiratoria
rP05 10^{7.5}	10/12	2/12	0/12
rP05 10^{6.8}	10/12	2/12	0/12
rP05 10^{5.8}	10/12	2/12	0/12
rP05 10^{4.8}	11/12	1/12	0/12
rP05 10^{3.8}	11/12	1/12	0/12
LS 10^{7.5}	9/12	3/12	0/12
LS 10^{6.8}	10/12	2/12	0/12
LS 10^{5.8}	8/12	4/12	0/12
LS 10^{4.8}	10/12	2/12	0/12
LS 10^{3.8}	10/12	2/12	0/12
Testigo	11/12	1/12	0/12

Cuadro 5. Signos de enfermedad después del desafío con la cepa virulenta P05 del virus de la enfermedad de Newcastle, experimento 1.

Grupo	Signos post-desafío				
	Sano	Enfermo (leve)	Enfermo (moderado)	Enfermo (severo)	Muerto
rP05 10 ^{7.5}	6/12	6/12	0/12	0/12	0/12
rP05 10 ^{6.8}	2/12	10/12	0/12	0/12	0/12
rP05 10 ^{5.8}	2/11	9/11	0/11	0/11	0/11
rP05 10 ^{4.8}	1/10	8/10	1/10	0/10	0/10
rP05 10 ^{3.8}	1/12	1/12	0/12	0/12	10/12
LS 10 ^{7.5}	6/12	6/12	0/12	0/12	0/12
LS 10 ^{6.8}	1/12	11/12	0/12	0/12	0/12
LS 10 ^{5.8}	4/12	8/12	0/12	0/12	0/12
LS 10 ^{4.8}	3/12	9/12	0/12	0/12	0/12
LS 10 ^{3.8}	2/12	4/12	0/12	0/12	3/12
Testigo	0/12	0/12	0/12	0/12	12/12

Cuadro 6. Títulos de anticuerpos de la inhibición de la hemoaglutinación pre y post-desafío, experimento 1.

Antígeno Grupo	35 días de edad (pre-desafío)			45 días de edad (post-desafío)		
	rP05	LS	P05	rP05	LS	P05
rP05 10 ^{7.5}	80* ±44**	61 ±70	26 ±29	2941 ±1145	1280 ±1871	640 ±944
rP05 10 ^{6.8}	211 ±113	106 ±63	30 ±27	557 ±392	184 ±72	80 ±44
rP05 10 ^{5.8}	121 ±104	61 ±54	26 ±14	5881 ±2290	2229 ±1594	1470 ±1888
rP05 10 ^{4.8}	61 ±54	20 ±29	13 ±5	640 ±2103	557 ±971	139 ±531
rP05 10 ^{3.8}	11 ±4	11 ±4	10 ±0	2560 ±2715	640 ±679	640 ±0
LS 10 ^{7.5}	160 ±236	139 ±98	70 ±49	557 ±392	320 ±475	368 ±1041
LS 10 ^{6.8}	368 ±215	279 ±196	160 ±236	1114 ±1052	243 ±279	970 ±859
LS 10 ^{5.8}	485 ±999	422 ±581	320 ±472	970 ±1272	422 ±451	485 ±175
LS 10 ^{4.8}	320 ±468	279 ±485	184 ±303	1280 ±701	485 ±417	640 ±485
LS 10 ^{3.8}	23 ±138	23 ±138	20 ±139	3880 ±3435	1280 ±2485	3378 ±8075

*Media geométrica del título de anticuerpos contra el VEN

**Desviación estándar

Cuadro 7. Valores de r1 y r2 obtenidos de las cepas del virus de la enfermedad de Newcastle confrontados con los antisueros generados, experimento 1.

Antígeno Grupo		35 días de edad (pre-desafío)			45 días de edad (post-desafío)		
		rP05	LS	P05	rP05	LS	P05
rP05 10 ^{7.5}		1.00	0.76	0.33	1	0.44	0.22
rP05 10 ^{6.8}		1.00	0.50	0.14	1	0.33	0.14
rP05 10 ^{5.8}		1.00	0.50	0.22	1	0.38	0.25
rP05 10 ^{4.8}		1.00	0.33	0.22	1	0.87	0.22
rP05 10 ^{3.8}		1.00	1.00	0.87	1	0.25	0.25
LS 10 ^{7.5}		1.15	1	0.50	1.74	1	1.15
LS 10 ^{6.8}		1.32	1	0.57	4.59	1	4.00
LS 10 ^{5.8}		1.15	1	0.76	2.30	1	1.15
LS 10 ^{4.8}		1.15	1	0.66	2.64	1	1.32
LS 10 ^{3.8}		1.00	1	0.87	3.03	1	2.64

Cuadro 8. Valores de relación antigénica entre las cepas rP05, LS y P05, experimento 1.

Antígeno Grupo		35 días de edad (pre-desafío)			45 días de edad (post-desafío)		
		rP05	LS	P05	rP05	LS	P05
rP05 10 ^{7.5}		1.00	0.93	0.62	1	0.87	0.62
rP05 10 ^{6.8}		1.00	0.81	0.44	1	1.23	0.81
rP05 10 ^{5.8}		1.00	0.76	0.50	1	0.93	0.76
rP05 10 ^{4.8}		1.00	0.62	0.50	1	1.52	0.76
rP05 10 ^{3.8}		1.00	1.00	0.93	1	0.87	0.87
LS 10 ^{7.5}			1	0.76		1	1.41
LS 10 ^{6.8}			1	0.87		1	4.29
LS 10 ^{5.8}			1	0.93		1	1.62
LS 10 ^{4.8}			1	0.87		1	1.87
LS 10 ^{3.8}			1	0.93		1	2.83

Cuadro 9. Media aritmética de los títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA IgY e IgA, experimento 1.

Grupo	35 días de edad (pre-desafío)		45 días de edad (post-desafío)	
	IgY*	IgA*	IgY*	IgA
rP05 10 ^{7.5}	139 ^b ±96 ^{***}	1060 ^{bc} ±1454	4118 ±2815	505 ±329
rP05 10 ^{6.8}	432 ^b ±530	2379 ^{**} ±2178	3004 ^b ±1759	173 ±246
rP05 10 ^{5.8}	211 ^b ±239	231 ^c ±298	8966 ±4925	73 ±64
rP05 10 ^{4.8}	86 ^b ±57	231 ^c ±160	2425 ^b ±2441	212 ±244
rP05 10 ^{3.8}	11 ^b ±11	64 ^c ±67	10201 ±281	491 ±34
LS 10 ^{7.5}	1092 ^b ±702	2988 ±1504	5623 ±5289	1491 ±1013
LS 10 ^{6.8}	5457 ^a ±4369	4924 ^a ±2612	12072 ^a ±4530	832 ±726
LS 10 ^{5.8}	4749 ^a ±2870	4316 ^{ab} ±3118	3872 ±3654	1318 ±1274
LS 10 ^{4.8}	1124 ^b ±1255	2028 ±2134	6735 ±3086	278 ±192
LS 10 ^{3.8}	135 ^b ±156	407 ^{bc} ±625	8331 ±5555	249 ±140
Testigo	28 ^b ±12	22 ^c ±0		

*Literal diferente indica diferencia estadística en la misma columna, P> 0.05.

**Los grupos que no tienen literal, no tuvieron ninguna diferencia estadística.

***Desviación estándar.

Cuadro 10. Virus sero-neutralización. Índices neutralizantes homólogos y heterólogos, experimento 1.

Grupo	Antígeno (35 días de edad) Pre-desafío			Antígeno (35 días de edad) Post-desafío		
	LS	P05	rP05	LS	P05	rP05
rP05 10 ^{7.5}	1.4*	0	1.2	5.6	5.8	5.6
rP05 10 ^{6.8}	1.2	0	2.7	5.6	5.8	5.6
rP05 10 ^{5.8}	1.4	0	2	5.6	5.8	5.6
rP05 10 ^{4.8}	2.1	0	0.5	5.6	5.8	5.6
rP05 10 ^{3.8}	1.1	0	0.9	5.6	5.8	5.6
LS 10 ^{7.5}	1.2	0	1.5	5.6	5.8	5.6
LS 10 ^{6.8}	3.2	0.3	3.7	5.6	5.8	5.6
LS 10 ^{5.8}	3.3	0.3	3.2	5.6	5.8	5.6
LS 10 ^{4.8}	5.8	1.1	5.7	5.6	5.8	5.6
LS 10 ^{3.8}	2	0	1.9	5.6	5.8	5.6
Testigo	0.4	0	0.5			

* Índice neutralizante, 1 pool por grupo.

Cuadro 11. Peso final y conversión alimenticia a los 45 días de edad, experimento 1.

Grupo	Parámetro productivo*	
	**Conversión alimenticia	**Peso final (gr)
rP05 10 ^{7.5}	1.69 ^b ±.27	2520 ^{***} ±379
rP05 10 ^{6.8}	1.81 ^b ±.28	2159 ^b ±326
rP05 10 ^{5.8}	1.66 ^b ±.12	2629 ^a ±176
rP05 10 ^{4.8}	1.70 ^b ±.27	2447 ±359
rP05 10 ^{3.8}	2.73 ^a ±.01	2030 ^b ±71
LS 10 ^{7.5}	1.73 ^b ±.15	2439 ±211
LS 10 ^{6.8}	1.68 ^b ±.46	2464 ±493
LS 10 ^{5.8}	1.72 ^b ±.20	2418 ±288
LS 10 ^{4.8}	1.75 ^b ±.24	2276 ±317
LS 10 ^{3.8}	1.90 ^b ±.13	2265 ±149

*Media y desviación estandar.

**Diferente literal indica diferencia estadística en la misma columna, P> 0.05.

***Los grupos que no tienen literal, no tuvieron ninguna diferencia estadística.

Cuadro 12. Excreción del virus de la enfermedad de Newcastle P05 2, 4 y 7 días post-desafío, experimento 1.

Grupo	*DÍA 2 PD	*DÍA 4 PD	*DÍA 7 PD
rP05 10 ^{7.5}	2/2 ^b	1/2	1/2
rP05 10 ^{6.8}	0/2 ^a	0/2 ^a	0/2 ^a
rP05 10 ^{5.8}	0/2 ^a	2/2 ^b	2/2 ^b
rP05 10 ^{4.8}	0/2 ^a	0/2 ^a	0/2 ^a
rP05 10 ^{3.8}	2/2 ^b	2/2 ^b	2/2 ^b
LS 10 ^{7.5}	0/2 ^a	2/2 ^b	0/2 ^a
LS 10 ^{6.8}	1/2 ^{**}	0/2 ^a	0/2 ^a
LS 10 ^{5.8}	0/2 ^a	1/2	0/2 ^a
LS 10 ^{4.8}	1/2	0/2 ^a	0/2 ^a
LS 10 ^{3.8}	2/2 ^b	2/2 ^b	1/2
Testigo	2/2 ^b	2/2 ^b	

*Literal diferente indica diferencia estadística en la misma columna, P> 0.05

**los grupos que no tienen literal, no tuvieron ninguna diferencia estadística.

Cuadro 13. Reacción post-vacunal a diferentes dosis de las cepas vacunales LS y rP05, experimento 2.

Grupo	Reacción post-vacunal		
	Sano	Estornudos	Enfermedad respiratoria
rP05 10 ^{6.6}	7/10	3/10	0/10
rP05 10 ^{6.1}	8/10	2/10	0/10
rP05 10 ^{5.1}	8/10	2/10	0/10
LS 10 ^{6.9}	6/10	4/10	0/10
LS 10 ^{6.4}	8/10	2/10	0/10
LS 10 ^{5.4}	8/10	2/10	0/10
Testigo	9/10	1/10	0/10

Cuadro 14. Signos de enfermedad después del desafío con la cepa virulenta P05 del virus de la enfermedad de Newcastle, experimento 2.

Grupo	Signos post-desafío				
	Sano	Enfermo (leve)	Enfermo (moderado)	Enfermo (severo)	Muerto
rP05 10 ^{6.6}	9/9	0/9	0/9	0/9	0/9
rP05 10 ^{6.1}	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10
rP05 10 ^{5.1}	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10
LS 10 ^{6.9}	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10
LS 10 ^{6.4}	7/8	1/8	0/8	0/8	0/8
LS 10 ^{5.4}	8/10	2/10	0/10	0/10	0/10
Testigo	0/9	0/9	0/9	0/9	9/9

Cuadro 15. Títulos de anticuerpos de la inhibición de la hemoaglutinación pre y post-desafío, experimento 2.

Antígeno Grupo	35 días de edad (pre-desafío)			45 días de edad (post-desafío)		
	rP05	LS	P05	rP05	LS	P05
rP05 10 ^{6.6}	70* ±126**	20 ±29	40 ±61	139 ±36	61 ±22	92 ±54
rP05 10 ^{6.1}	184 ±107	46 ±27	70 ±50	139 ±98	40 ±30	80 ±61
rP05 10 ^{5.1}	106 ±57	13 ±13	61 ±27	106 ±44	106 ±57	121 ±104
LS 10 ^{6.9}	485 ±429	422 ±447	735 ±930	160 ±247	92 ±260	80 ±118
LS 10 ^{6.4}	139 ±248	184 ±510	243 ±493	243 ±500	368 ±472	243 ±209
LS 10 ^{5.4}	557 ±526	640 ±480	320 ±498	184 ±303	320 ±488	160 ±244

*Media geométrica del título de anticuerpos contra el VEN

**Desviación estándar.

Cuadro 16. Valores de r1 y r2 obtenidos de las cepas del virus de la enfermedad de Newcastle confrontados con los antisueros generados, experimento 2.

Antígeno Grupo	35 días de edad (pre-desafío)			45 días de edad (post-desafío)		
	rP05	LS	P05	rP05	LS	P05
rP05 10 ^{6.6}	1	0.29	0.57	1	0.44	0.66
rP05 10 ^{6.1}	1	0.25	0.38	1	0.29	0.57
rP05 10 ^{5.1}	1	0.13	0.57	1	1.00	1.15
LS 10 ^{6.9}	1.15	1	1.74	1.74	1	0.87
LS 10 ^{6.4}	0.76	1	1.32	0.66	1	0.66
LS 10 ^{5.4}	0.87	1	0.50	0.57	1	0.50

Cuadro 17. Valores de relación antigénica entre las cepas rP05, LS y P05, experimento 2.

Antígeno Grupo	35 días de edad (pre-desafío)			45 días de edad (post-desafío)		
	rP05	LS	P05	rP05	LS	P05
rP05 10 ^{6.6}	1	0.57	0.81	1	0.87	1.07
rP05 10 ^{6.1}	1	0.44	0.54	1	0.44	0.62
rP05 10 ^{5.1}	1	0.33	0.71	1	0.76	0.81
LS 10 ^{6.9}		1	1.41		1	1.23
LS 10 ^{6.4}		1	1.00		1	0.66
LS 10 ^{5.4}		1	0.66		1	0.54

Cuadro 18. Media aritmética de los títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA IgY e IgA, experimento 2.

Grupo	35 días de edad (pre-desafío)		45 días de edad (post-desafío)	
	IgY*	IgA*	IgY*	IgA
rP05 10 ^{6.6}	429 ^b ±591 ^{***}	882 ^c ±1262	2639 ^b ±529	3777 ±4463
rP05 10 ^{6.1}	423 ^b ±364	823 ^c ±571	1908 ^b ±916	1429 ±1014
rP05 10 ^{5.1}	213 ^b ±99	912 ^{bc} ±1089	2003 ^b ±1917	1945 ±2651
LS 10 ^{6.9}	3015 ^{**} ±2535	3576 ^a ±1475	6464 ±2224	3266 ±2348
LS 10 ^{6.4}	3521 ±2866	2869 ^{ab} ±936	4772 ±3735	3872 ±2418
LS 10 ^{5.4}	5242 ^a ±3231	2918 ^a ±485	8578 ^a ±3751	1379 ±808
Testigo	40 ^b ±17	67 ^c ±101		

*Literal diferente indica diferencia estadística en la misma columna, P> 0.05.

**Los grupos que no tienen literal, no tuvieron ninguna diferencia estadística.

*** Desviación estándar.

Cuadro 19. Virus sero-neutralización. Índices neutralizantes homólogos y heterólogos, experimento 2.

Grupo	Antígeno (35 días de edad) Pre-desafío			Antígeno (45 días de edad) Post-desafío		
	LS	P05	rP05	LS	P05	rP05
rP05 10^{6.6}	2.4*	3	2	6.5	6.2	6
rP05 10^{6.1}	2.3	1.2	5	6.5	5.2	6
rP05 10^{5.1}	3	2.4	5	4.3	1.8	6
LS 10^{6.9}	5	2.8	5	6.5	4.6	6
LS 10^{6.4}	5.5	2.7	5	6.5	3.5	6
LS 10^{5.4}	5.5	5	5	6.5	4.2	6
Testigo	.3	.4	0			

* Índice neutralizante, 1 pool por grupo.

Cuadro 20. Peso final y conversión alimenticia a los 45 días de edad, experimento 2.

Grupo	Parámetro productivo*	
	Conversión alimenticia	Peso final (gr)
rP05 10^{6.6}	2.04 ±.19	2403 ±206
rP05 10^{6.1}	2.03 ±.14	2404 ±162
rP05 10^{5.1}	1.93 ±.21	2485 ±258
LS 10^{6.9}	2.08 ±.23	2370 ±255
LS 10^{6.4}	1.94 ±.15	2495 ±188
LS 10^{5.4}	2.03 ±.21	2441 ±234

* Media y desviación estándar.

Cuadro 21. Excreción del virus de la enfermedad de Newcastle P05 2, 4 y 7 días post-desafío, experimento 2.

Grupo	Día 2 PD	*Día 4 PD	Día 7 PD
rP05 10^{6.6}	0/4	1/4**	2/4
rP05 10^{6.1}	0/4	0/4 ^a	0/4
rP05 10^{5.1}	0/4	0/4 ^a	2/4
LS 10^{6.9}	0/4	0/4 ^a	1/4
LS 10^{6.4}	0/4	0/4 ^a	0/4
LS 10^{5.4}	1/4	1/4	0/4
Testigo	3/4	4/4 ^b	

*Literal diferente indica diferencia estadística en la misma columna, $P > 0.05$.

**los grupos que no tienen literal, no tuvieron ninguna diferencia estadística.

FIGURAS

Figura 1. Análisis de conglomerados de la reacción post-vacunación, experimento 1.

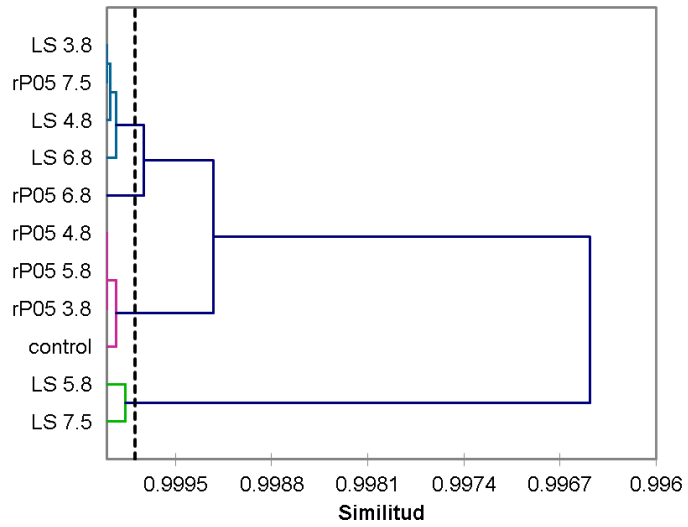


Figura 2. Análisis de conglomerados del grado de enfermedad post-desafío, experimento 1.

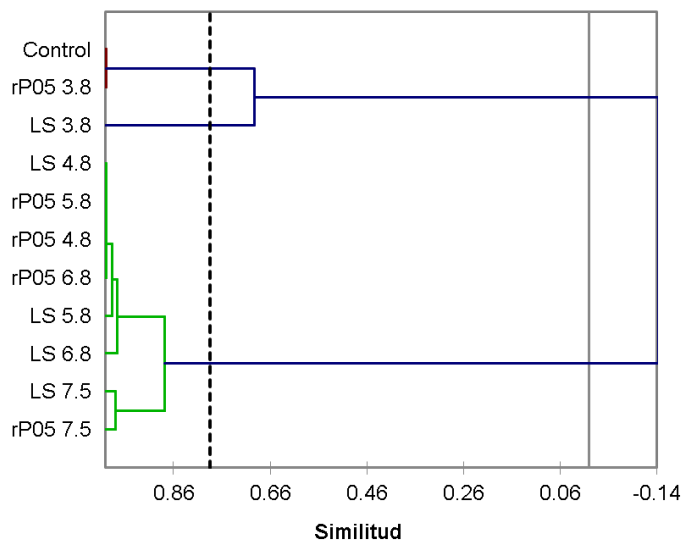


Figura 3. Porcentaje de supervivencia post-desafío. Diferente literal indica diferencia estadística, $P > 0.05$.

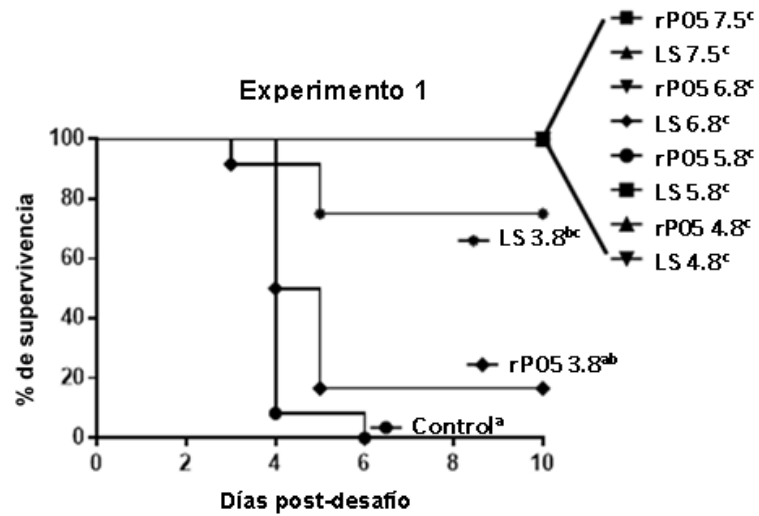


Figura 4. Análisis de conglomerados de la reacción post-vacunación, experimento 2.

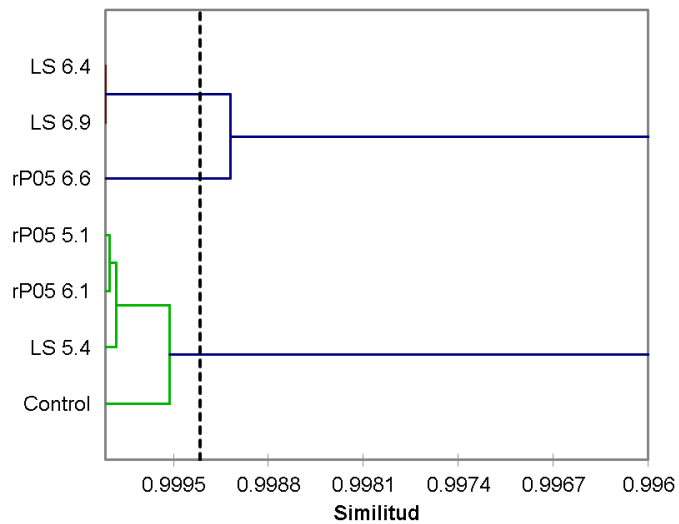


Figura 5. Análisis de conglomerados del grado de enfermedad post-desafío, experimento 2.

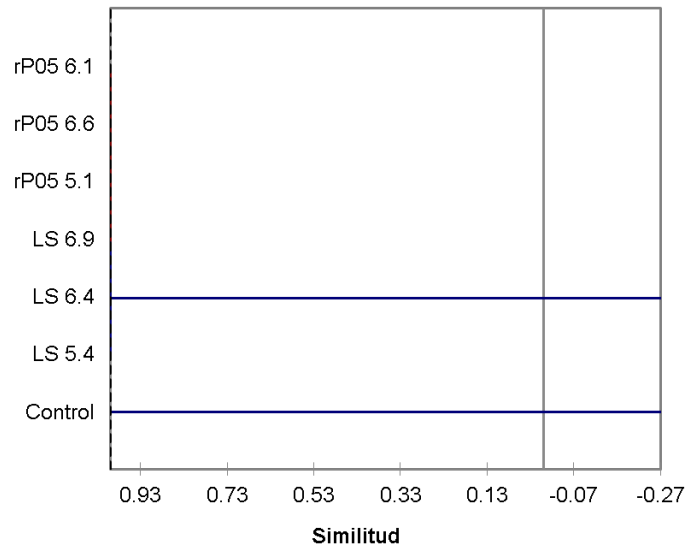
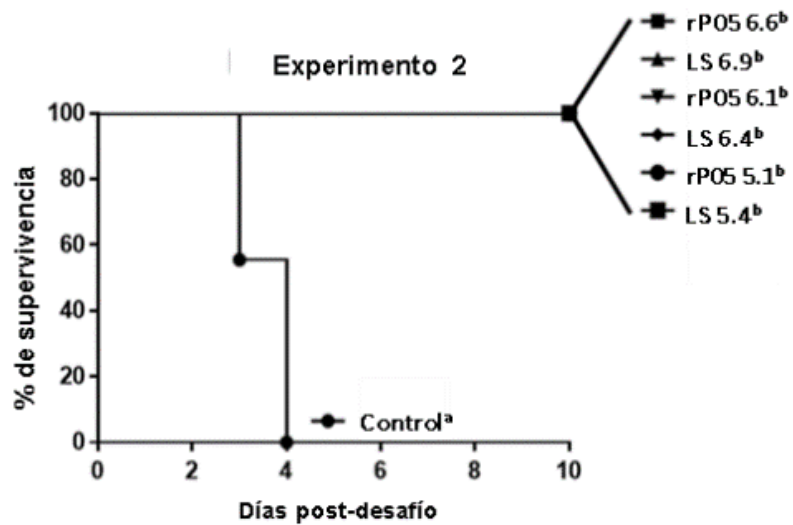


Figura 6. Porcentaje de supervivencia. Diferente literal indica diferencia estadística, $P > 0.05$.



REFERENCIAS

Abdul A. Post-vaccinal reaction for some vaccines used against Newcastle disease in Sulaimaniyah province, AL-Qadisiya. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 2012, 11(1): 133-143.

Absalón A, Matías A, Vásquez V, Garzón A, Espinosa D, Ortega R, Lucio L. Complete genome sequence of a velogenic Newcastle disease virus isolated in Mexico. *Virus Genes*, 2012, 45(30): 4–310

Al-Garib S, Gielkens A, Gruys E, Koch G. Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination. *World's Poultry Science Journal*, 2003, 59(02): 185-200.

Al-Zubeedy A, Immune response in day old broiler chicks vaccinated against Newcastle disease virus. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 2009, 23: 143-146.

Alexander D, Mackenzie J. and Russell P. Two types of Newcastle disease viruses isolated from feral birds in western Australia detected by monoclonal antibodies. *Australian Veterinary Journal*, 1986, 63:365–367.

Alexander D, Manvell R, Lowings J, Frost K, Collins M, Russell P, and Smith J. Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 1997. 26:399–418.

Alexander D, Senne D. Newcastle disease virus and other paramyxoviruses. In: Dufour-Zavala L, Swayne DE, Glisson JR, Pearson JE, Reed WM, Jackwood MW, *et al.*, editors. *A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens*. Fifth edition. The American Association of Avian Pathologists, Athens, GA, USA, 30602-4875. 2008: 135-141.

Aldous E, Mynn, J, Banks J, Alexander D. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic

analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol*, 2003, 32: 239–256.

Allan W, Borland L. The stress index: A method for indicating the pathogenicity of vaccinal Newcastle disease virus when administered by aerosol, *Avian Pathology*, 1979, 8(4): 401-409.

Archetti I, Horsfall F. Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J. of Exp. Med.* 1950, 92: 441-462.

Bawala D. Challenge studies in chickens to evaluate the efficacy of commercial Newcastle disease vaccines against the strains of Newcastle disease virus prevalent in South Africa since 2002 (thesis master of science) Pretoria, South Africa: University of Pretoria, 2009.

Briand F, Massin P, Jestin V. Characterisation of a type 1 avian paramyxovirus belonging to a divergent group. *Veterinary Microbiology* 2014, 168: 25–33

Corbanie E. Development of a dry powder vaccine for mass vaccination of poultry (thesis Doctor) Gent, Bélgica, Ghent University, 2007.

Cardenas G, Diel G, Susta L, Lucio D, Yu Q, Brown C, Miller J, Afonso L, Development of an improved vaccine evaluation protocol to compare the efficacy of Newcastle disease vaccines. *Biologicals* 2015, 43: 136-145.

Cornax I, Miller P, and Afonso C. A Characterization of live LaSota vaccine strain–induced protection in chickens upon early challenge with a virulent Newcastle disease virus of heterologous genotype. *Avian disease* 2012, 56: 464–470.

Cho S, Kwon H, Kim T, Kim J, Yoo H, Kim S. Variation of a Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase linear epitope. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(4): 1541–1544

Diel D, Silva L, Liu L, Wang Z, Miller P, Afonso C. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: Proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 2012, 12: 1770–1779

DOF. (2013, Marzo 7). *Diario oficial de la federación*. Retrieved Junio 1, 2013, from http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5290727&fecha=07/03/2013

Dortmans J, Koch G, Rottier P and Peeters P. Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? *Veterinary Research* 2011, 42:122

Doyle T. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. *Journal Comparative Pathology Therapy*, 1927, 40:144–169.

Gaffar M, Khalafalla A, Ahmed S. Observations on the use of Komarov strain of Newcastle disease vaccine in the Sudan. *Tropical Animal Health and Production*, 1993 Aug, 25(3):151-154.

Garzón J. Lucio E. Cortes D. Absalón A. Inventors: Investigacion Aplicada S.A de C.V. Newcastle Disease virus and the use there of as a vaccine. US patent 2013/0315956 A1, 2013 nov. 28.

Gharaibeh S, Mahmoud K. Decay of maternal antibodies in broiler chickens. *Poultry Science*, 2013, Sep, 92(9):2333-2336.

Gong Y and Cui Z, Epitope variation in the Newcastle disease virus *HN* gene under antibody immune selective pressure in cell culture. *Science China Life Sciences*, 2011, 54(5): 474–479.

Gu M, Liu W, Xu L, Cao Y, Yao C, Hu S, Liu X. Positive selection in the hemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus and its effect on vaccine efficacy. *Virol J*. 2011, 31(8):150.

Hassanzadeh M, Feizi A, Khakpour M. Comparative Efficacy of Newcastle disease's live vaccines (Biovac, Clone and LS) in broilers using hemagglutination

inhibition (HI) test. Middle-East Journal of Scientific Research, 2013, 13(4): 472-476.

Hines N and Miller C. Avian Paramyxovirus Serotype-1: A Review of Disease Distribution, Clinical Symptoms, and Laboratory Diagnostics. Veterinary Medicine International, 2012 708216: 1-17.

Hu S, Wang T, Liu Y, Meng C, Wang X, Wu Y, Liu X. Identification of a variable epitope on the Newcastle disease virus hemagglutinin–neuraminidase Protein. Veterinary Microbiology 2010, 140: 92–97.

Huang Z, Panda A, Elankumaran S, Govindarajan D, Rockemann D, Samal D. The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. Journal of Virology, 2004, 78(8) 4176–4184.

Ibu J, Okoye J, Eze D, Fasina F, Aba-Adulugba E, Abechi A, Woma Y. Antigenic relatedness among Newcastle disease virus isolates from Nigerian feral birds and the la sota strain. Archives of Veterinary Science, 2008, 13(2): 79-84.

Iorio R, and Bratt M, Monoclonal antibodies to Newcastle disease virus: delineation of four Epitopes on the HN glycoprotein. Journal of virology, 1983, 48(2): 440-450.

Iorio R, Borgman J, Glickman R and Bratt M. Genetic variation within a neutralizing domain on the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. Journal general virology 1986, 67, 1393-1403.

Kapczynski D, Afonso C, Miller P. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. Developmental and Comparative Immunology 2013, 41: 447-453.

Kumar S, Nayak B, Collins P, Samal S. 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, 2011, 85(13) 6521–6534.

Leon P. Vacunación con virus vivo y muerto emulsionado contra la enfermedad de Newcastle en pollos de engorda al día de edad: efecto de la cantidad de antígeno en la emulsión. (Tesis de licenciatura). Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1993.

Liu K, Ma Y, Wang J, Mu H, Gao C, Yang C, *et al.* Complete genome sequencing and analysis of an anti-tumor Newcastle disease virus strain. *Gene* 2013, 11(4):1-11

Luo C, Qu H, Ma J, Wang J, Li C, Yang C, *et al.* Genome-wide association study of antibody response to Newcastle disease virus in chicken. *BMC Genetics* 2013, 14(42): 1-9

Maminiana O, Gil P, Briand X, Albina E, Keita D, Andriamanivo H, *et al.* Newcastle disease virus in Madagascar: Identification of an original genotype possibly deriving from a died out ancestor of genotype IV. *PLoS ONE* 2010, 5(11): 1-12.

Márquez M (1978). Historia de la enfermedad de Newcastle en México. Memorias de la III Convención Nacional ANECA. Mazatlán, Sinaloa, México. Abril 5–8, pp 1–18.

Markham F, Hanson R, Grumbles L, Jungherr E. Newcastle disease. In: National Research Council (U.S.) Poultry Disease Subcommittee. *Methods for the Examination of Poultry Biologics*. Washington, National Academy of Sciences, National Research Council, 1959: 37-56.

Merino G, Villegas H, Quintana JA, and Calderon N. Characterization of Newcastle disease viruses isolated from chicken, gamefowl, pigeon and quail in Mexico. *Vet Res Commun* 2009, 33: 1023–1030.

Merino G. Caracterización molecular y estudio de la patogénesis del daño endotelial, mieloide y linfocitario, de aislamientos mexicanos del virus de la enfermedad de Newcastle inoculados en pollo de engorda comercial (Tesis de

doctorado). Distrito Federal, México: universidad Nacional Autónoma de México, 2010.

Merino G, Noguez S, Ortiz O, Garcia G. Evaluación experimental de una prueba para detección rápida de antígeno del virus de la enfermedad de Newcastle. Memorias del XXXVII Convención Nacional ANECA; 2012, mayo 2-6; Puerto Vallarta (Jalisco) México; Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, AC

Miller P, Decanini E, Afonso C. Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infection, Genetics and Evolution* 2010, 10: 26-35

Miller P, King D, Afonso C, Suarez D. Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge, *Vaccine*, 2007, 25: 7238–7246.

Miller P, Koch G, Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and Avian Metapneumovirus Infections. In: Swayne D, editor. *Diseases of Poultry*. 13th Edition. Blackwell Wiley, 2013, 89-138.

Miller P, Estevez C, Yu Q, Suarez D, and King D. Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. *Avian Diseases*, 2009, 53: 39–49.

Miller P, Afonso C, Attrache J, Dorsey K, Courtney S, Guo Z, *et al*. Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses. *Developmental and Comparative Immunology* 2013, 41: 505–513

Mohan M, Dey S, Gaikwad S, Kataria J, Vakhariac V. Complete genome sequence of Newcastle disease Virus mesogenic vaccine strain R2B from India. *Journal of Virology*, 2012, 86(24): 13814–13815.

Morales J, Merino E, García D, Ortega R, Christy N, Marrufo D, Cascante R, Lucio E, Cruz M, Absalón A, Cortés D, Mariano A, Vazques A. Development of a recombinant vaccine and its efficacy in a trial with broilers. Memorias del XXII Latin American Poultry Congress; 2011 septiembre 6-9; Buenos aires, Argentina.

Munir M, Cortey M, Abbas M, Qureshi Z, Afzal F, Shabbir M, Khan M, Ahmed S, Ahmad S, Baule C. Biological characterization and phylogenetic analysis of a novel genetic group of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in commercial poultry and from backyard poultry flocks in Pakistan. *Infection, Genetics and Evolution* 2012 Jul; 12(5):1010-9.

Neyt C, Geliebter J, Slaoui M, Morales D, Meulemans G, and Burny A. Mutations located on both fl and f2 subunits of the Newcastle disease virus fusion protein confer resistance to neutralization with monoclonal antibodies. *Journal of virology* 1989, 63(2): 952-954

Norma Oficial Mexicana NOM-013-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Enfermedad De Newcastle Presentación Velogénica. México (DOF): 7 de febrero de 1995.

OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. Enfermedad de Newcastle. Organización Mundial de Sanidad Animal [serial on line] mayo, 2012 [citado 22 de enero de 2015]; [20 páginas]. Disponible en: URL http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.03.14_Enfermedad_Newcastle.pdf

Paniago M, Vaccination against Newcastle disease in the hatcheries. *Hatchery expertise online*. 2007; 10

Perozo F, Nava J, Rivera S, Mavarez Y, Aguillon V, Pino V. Evaluación de dos planes de vacunación contra la enfermedad de Newcastle en pollos de engorde de la línea Ross criados bajo condiciones de campo en el estado Zulia, Venezuela. 1. Parámetros productivos y reacción postvacunal. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2004, 24(4): 331-337.

Schijns V., Van de Zande S., Lupiani B. and Reddy S. Practical aspects of poultry vaccination, in: Avian Immunology. Schat K., Kaspers B. and Kaiser P. editors, 2nd Edition, Academic Press 2013, 345-362

Snoeck C, Ducatez M, Owoade A, Faleke O, Alkali B, Tahita M, Tarnagda Z, Ouedraogo J, Maikano I, Mbah P, Kremer J, Muller C. Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms. Archives of Virology, 2009, 154(1): 47-54.

Toyoda T, Gotoh B, Sakaguchi T, Kida H and Nagai Y. Identification of amino acids relevant to three antigenic determinants on the fusion protein of Newcastle disease virus that are involved in fusion inhibition and neutralization. Journal of virology 1988, 62(11): 4427-4430

Turblin V, The benefits of Newcastle killed vaccines in broilers. Hatchery expertise online. 2009; 24

Van Eck J, Goren E. An Ulster 2C strain-derived Newcastle disease vaccine: vaccinal reaction in comparison with other lentogenic Newcastle disease vaccines. Avian Pathol. 1991, 20(3): 497-507.

Vargas C. Análisis de conglomerados (tesis de licenciatura). Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1998.

Wise M, Suarez D, Seal B, Pedersen J, Senne D, King D, Kapczynski D, Spackman E. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of newcastle disease virus RNA in clinical samples. J Clin Microbiol. 2004, 42 (1): 329-38.

Xiao S, Nayak B, Samuel A, Paldurai A, Kanabagattebasavarajappa M, Prajitno T, *et al.* Generation by reverse genetics of an effective, stable, live-attenuated Newcastle disease virus vaccine based on a currently circulating, highly virulent Indonesian strain. Plos one 2012, 7: 1-15.

Yusoff K, Nesbit M, McCartney H, Meulemans G, Alexander D, Collins M, Emmerson P and Samson A. Location of neutralizing epitopes on the fusion protein of Newcastle disease virus strain Beaudette C. *Journal general of Virology* 1989, 70: 3105-3109