



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONFERIDA POR LA
VACUNA TRIPLE AVIAR ANTE EL DESAFÍO DE LA
ENFERMEDAD DE NEWCASTLE**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

LUIS FERNANDO ORTIZ SEGURA

Asesores:

Dr. Néstor Ledesma Martínez
MVZ. EDV. MIC Liliana Manuela Valdés Vázquez



Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Abril 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

A mi padre: Salvador Segura

Gracias por todas las lecciones de vida que me enseñaste, espero que donde quiera que estés puedas sentirte orgulloso del hombre en que me convertiste.

Gracias por el infinito apoyo que siempre me diste y por creer en mí hasta el final.
Te mando un abrazo hasta las estrellas donde sé que me sigues cuidando
Te amo **Papá**.

A mi madre: Silvia Segura

Por ser más que una madre y una amiga para mí, por aconsejarme en todos los aspectos de mi vida y por siempre ser tan firme y amorosa al mismo tiempo.

Gracias por todos los sacrificios que hiciste para poder verme llegar hasta este punto de mi vida, espero que cada día que pase puedas seguir sintiéndote orgullosa de quien soy.

Sin importar lo lejos que estemos el uno del otro, deseo que siempre seas feliz.
Gracias por todo mamá, te amo.

Agradecimientos.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por brindarme los conocimientos que hoy me permiten estar un paso mas cerca de titularme, por darme la oportunidad de estudiar y practicar en sus instalaciones con el fin de darle el mejor trato a los animales que tanto he amado.

A mis padres Silvia y Salvador por el infinito amor que me han tenido y por apoyarme hasta el fin en cada momento en que quise darme por vencido.

A mi tío Juan Segura, por ser un segundo padre para mí, por apoyarme siempre en todos los sentidos y por todos sus consejos.

A Yoss el haberte conocido en este momento de mi vida ha sido una de las experiencias que espero recordar por siempre, cada aventura que hemos tenido es un recuerdo que llevare en mi memoria para siempre.

A mis amigas, Naomi y Yannyn han sido como unas hermanas para mí, gracias por su apoyo, sus consejos y por siempre permanecer a mi lado.

A todos aquellos animales que a lo largo de la carrera me permitieron hacer uso de su vida en beneficio de mi formación como MVZ. Pero en especial a aquellos animales que me brindaron su cariño y compañía por tantos años.

A la Dra. Zulema y la Dra. Magdalena del CENASA, gracias por su apoyo y sus enseñanzas, por brindarme parte de su tiempo y de su experiencia en el diagnóstico de aves.

Al Dr. Néstor Ledesma y la MVZ. EDV. MIC Liliana Valdés por creer en mi, por ser mis asesores y darme la confianza para realizar este trabajo de investigación sin duda para mi ustedes son ejemplo de lo que cualquier estudiante debe aspirar a ser como MVZ.

A los profesores, José Ángel Gutiérrez Pabello. Francisco Basurto, Gary García Espinosa, Gabriela Verduzco y Néstor Ledesma integrantes de mi jurado que con su profesionalismo y conocimiento aportaron observaciones que enriquecieron la presentación de esta tesis.

Agradezco al CENASA por brindarme la oportunidad de llevar acabo mi trabajo de tesis dentro de sus instalaciones, y brindarme el apoyo de su personal para el correcto desarrollo de mi trabajo

Contenido

Página

DEDICATORIAS	II
AGRADECIMIENTOS	III
CONTENIDO	IV
LISTA DE CUADROS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
JUSTIFICACIÓN	8
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
MATERIAL Y MÉTODOS	10
DISEÑO EXPERIMENTAL	11
RESULTADOS	14
DISCUSIÓN	15
CONCLUSIONES	18
REFERENCIAS	19
ANEXOS	
CUADROS	
FIGURAS	

Anexos.

Página

Anexo 1.- Descripción de los biológicos para la realización del experimento. **21**

Anexo 2.- Títulos IH del grupo testigo, grupo 1, grupo 2 y grupo 3 en la fase de pre-vacunación (Día 1). **21**

Anexo 3.- Títulos IH del grupo testigo, grupo 1, grupo 2 y grupo 3, en el día 17 posterior a la vacunación **22**

Anexo 4.- Títulos IH del grupo testigo, grupo 1, grupo 2 y grupo 3 en el día 38 posterior a la segunda vacunación. **22**

Anexo 5.- Títulos IH del grupo 1, grupo 2 y grupo 3, en el día 54 posterior al desafío. **23**

LISTA DE FIGURAS.

	Página
Figura 1 .- Gráfica de la inmunidad generada en los cuatro grupos durante el experimento	23
Figura 2. Mortalidad y Viabilidad de las aves, posterior al desafío.	24
Figura 3.- Alojamiento en batería para cada grupo de los pollitos en las instalaciones de CENASA en el día 1.	24
Figura 4.- Preparación de las unidades de aislamientos para llevar a cabo el desafío.	25
Figura 5.- Figura 3. Alojamiento de las aves en las cámaras de aislamiento.	26
Figura 6.- Vacunación intramuscular de los pollitos en el día 2	27
Figura 7.- Segunda vacunación de los pollitos 21 días después de la vacunación.	27
Figura 8.- Procesamiento de las muestras de sangre en tubos vacutainer amarillos con gel separador de suero.	28
Figura 9.- Separación de los sueros en tubos eppendorf estériles haciendo uso de una campana de bioseguridad.	28
Figura 10.- Pollita del grupo testigo con la presentación de signos clínicos de ENC 3 días posteriores al desafío.	29
Figura 11.- Toma de secreción y mucosa traqueal para el aislamiento del virus de ENC en ave del grupo testigo.	29
Figura 12.- Preparación de los embriones para la inoculación del virus extraído del grupo testigo.	30
Figura 13.- Viabilidad de los embriones inoculados.	30
Figura 14.- Recuperación del líquido alantoideo de los embriones inoculados para llevar a cabo una prueba de aglutinación en placa.	31

Figura 15.- Inhibición de la aglutinación tras confrontar el líquido alantóideo contra antisueros de diferentes agentes hemaglutinantes. **32**

Figura 16.- Preparación de los reactivos para la realización de la prueba IH. **33**

Figura 17.- Realización de la prueba de IH **33**

RESUMEN.

ORTIZ SEGURA LUIS FERNANDO. Evaluación de la protección conferida por la vacuna triple aviar ante el desafío de la enfermedad de Newcastle. Asesorado por el Dr. Nestor Ledesma Martínez y MVZ. EDV. MIC Liliana Manuela Valdés Vázquez

La enfermedad de Newcastle (ENC) está considerada como uno de los problemas que causan mayores pérdidas tanto en la avicultura industrializada como en la avicultura familiar y de ornato. Aunque actualmente México se considera como un país libre de Newcastle en su presentación velogenica, este estatus sólo está limitado a la avicultura industrial la cual cuenta con programas de vacunación muy eficaces. En el caso de avicultura industrial se suelen administrar vacunas de virus activo e inactivo, principalmente oleosas. Aunque existe una amplia gama de vacunas inactivadas contra ENC en hidróxido de aluminio, disponibles para avicultura familiar y gallinas de ornato, es común el envío casos de esta enfermedad al Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Enfermedades de las Aves del Departamento de Medicina y Zootecnia de aves en la FMVZ UNAM.

Como parte de esto, el presente trabajo pretende demostrar la inmunogenicidad de algunas de las principales vacunas inactivadas en su presentación de triple-aviar, contra la enfermedad de Newcastle presentes en el mercado.

En el presente trabajo, se evaluó la inmunogenicidad generada por las vacunas, a través de una prueba de potencia en tres vacunas comerciales de la variedad triple aviar que son las principales vacunas usadas tanto en avicultura familiar como de ornato, las cuales contienen el virus inactivado de la enfermedad de Newcastle en combinación con bacterinas. Se usaron 48 aves de 3 semanas de edad Rhode Island sin antecedentes de vacunación contra ENC. Estas aves se dividieron en cuatro grupos, tres de los cuales fueron vacunados acorde a las indicaciones del fabricante de cada vacuna y el cuarto grupo no recibió ninguna vacuna.

Se tomaron muestras de suero para estudio serológico por Inhibición de la Hemoaglutinación (HI) en cuatro diferentes tiempos acorde a la reglamentación de la Organización Mundial de Sanidad Animal OMSA para la constatación de vacunas de Newcastle con virus inactivo, se desafiaron los cuatro grupos de aves con la cepa Chimalhuacán del virus de ENC y se observaron las aves durante 14 días.

Los resultados de este estudio demostraron que las diferentes vacunas para uso de aves de ornato y de avicultura familiar confirieron una protección adecuada, generando títulos iguales o mayores a 1/32 ante el desafío contra una cepa velogenica por lo que se deben analizar las posibles causas de la frecuencia de esta enfermedad en México.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad de Newcastle, vacunas inactivadas, vacuna triple aviar.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle (ENC) fue descubierta en Indonesia en 1926. Como su nombre lo indica, fue reconocida y denominada precisamente por el pueblo de Newcastle, Inglaterra, en 1927. También se le conoció como enfermedad de Ranikhet, pseudopeste aviar o neumoencefalitis aviar.⁽¹⁾ El virus de esta enfermedad es uno de los patógenos de mayor importancia social y económica en la industria avícola debido a su elevada tasa de morbilidad y mortalidad. Este virus afecta entre 90 y 100% de aves no vacunadas y tiene un amplio rango de hospedadores ya que se ha reportado en más de 240 especies aviares.⁽²⁾

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) ha establecido que la ENC es uno de los mayores riesgos para el intercambio comercial internacional en la industria avícola, por lo que su notificación es obligatoria ante este organismo.⁽¹⁾

Enfermedad de Newcastle en México

El virus de la enfermedad de Newcastle (VEN) ha estado activo en las aves de corral de México desde los cincuenta en el siglo XX. Actualmente (2023), en México hay dos variedades velogénicas (las más virulentas): una relacionada con la cepa Chimalhuacán,⁽³⁾ y otra conocida como virus Torreón, descubierta desde 1996.⁽²⁾ Ahora bien, el 24 de junio del 2015, México se proclamó libre de la forma velogénica de esta enfermedad mediante la "emisión del "ACUERDO por el que se declara a los Estados Unidos Mexicanos, como zona libre de la enfermedad de Newcastle en su presentación velogénica" Así, para 2023 en México, la ENC se considera "Limitada a una o más zonas" según el estatus otorgado por la OMSA.⁽⁵⁾

Según datos recientes obtenidos a través de la vigilancia epidemiológica de SENASICA, del 01 de enero de 2019 al 31 de octubre de 2020 se registraron

224 606 aves expuestas, el 98.84% fueron aves de explotaciones comerciales correspondientes a tres investigaciones y el 1.16% fueron aves de traspatio en 15 investigaciones, en las cuales se afectaron aves de producción y de combate. Aunque México no ha registrado casos de esta enfermedad en la industria avícola, sí se han reportado en aves de traspatio y gallos de combate.⁽⁶⁾

Virus de la ENC.

El VEN pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Avulavirinae*. El Comité Internacional de Taxonomía de Virus lo clasifica como de tipo aviar, serotipo 1 *orthoavulavirus* (*Avian orthoavulavirus 1* [AOAV-1]), antes designado como *Avian avulavirus 1* (AAvV-1).⁽³⁾ Ahora bien, en función del tipo de ave y la vacunación, los signos de las aves infectadas varían desde una caída en la ingesta de alimento y agua, disminución en la producción de huevos entre gallinas ponedoras aparentemente sanas y bien vacunadas, hasta 100% de mortalidad entre pollos no vacunados. Las cepas del Paramixovirus aviar tipo 1 (AMPV-1) se agrupan en cinco patotipos (Doyle, beach, beaudette, hitcher y entérico subclínico) con base en los signos clínicos observados en los pollos infectados:

1. **Doyle:** esta cepa se considera velogénica viscerotrópica, es decir, una forma muy virulenta en la que se observan frecuentemente lesiones intestinales hemorrágicas con alta mortalidad en aves de cualquier edad.
2. **Beach:** es una cepa altamente mortal (velogénica) y neurotrópica, significa que afecta al sistema nervioso. Los animales infectados con este tipo de virus suelen experimentar signos respiratorios y nerviosos antes de morir.
3. **Beaudette:** es un virus mesogénico que causa signos respiratorios y, a veces, signos nerviosos, pero tiene una baja tasa de mortalidad.

4. **Hitchner**: es una cepa lentogénica y produce una infección respiratoria leve o subclínica.
5. **Entérico subclínico**: es apatógeno y por lo general causa una infección entérica subclínica.

De acuerdo con los criterios de la OMSA, el virus de la enfermedad de Newcastle se clasifica como una infección aviar provocada por el serotipo 1 del Paramixovirus aviar (APMV-1), el cual cumple con uno de los criterios de virulencia establecidos:

- Un índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) de 0.7 o más en pollitos de un día.
- Esto se mide a través de una prueba en pollitos que consiste en:
 - Diluir líquido alantoideo infectivo con un título IH (>1/16) en solución salina.
 - Se inyectan por vía intracerebral 0,05 ml del virus diluido en diez pollitos SPF.
 - Las aves se examinan cada 24 horas durante 8 días.
 - En cada observación, las aves se puntúan: 0 si es normal, 1 si está enferma y 2 si está muerta. Las aves que están vivas pero son incapaces de comer o beber deben sacrificarse por métodos humanitarios y ser contabilizadas como muertas en la observación posterior. (Los individuos muertos deben puntuarse como 2 en cada una de las observaciones diarias siguientes a la muerte).
- El índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) es la puntuación media por ave y por observación durante el periodo de 8 días. Los virus más virulentos presentarán índices que se aproximan a la puntuación máxima de 2,0, mientras que las cepas entéricas lentogénicas y asintomáticas presentarán valores próximos a 0,0. Por lo que toda puntuación $\geq 0,7$ se considera virulenta.

- Se han demostrado múltiples aminoácidos (arginina y lisina) en posiciones 113-116 en el extremo C-terminal- de la proteína F2 y fenilalanina en el residuo 117 de la proteína F1.

No hay signos clínicos ni lesiones macroscópicas patognomónicas en la ENC.

Por lo regular las cepas velogénicas sí generan infecciones como conjuntivitis, diarrea de color verde, cresta y barbillas cianóticas, tortícolis, parálisis en las alas o patas, y en la necropsia, se ven hemorragias en el proventrículo y en las tonsilas cecales.

Las cepas mesogénicas, en general, son de baja o nula mortalidad en pollos de cuatro semanas de edad, y se expresan signos neurológicos como temblores de cabeza, tortícolis y parálisis. ⁽⁷⁾

Evaluación de la respuesta inmune

El VEN puede emplearse como antígeno en una amplia gama de pruebas serológicas. Esto permite la evaluación del nivel de anticuerpos en las aves mediante neutralización, enzimoimmunoanálisis (ELISA) e inhibición de la hemaglutinación (HI). En la actualidad, la prueba HI es la más utilizada para detectar anticuerpos contra el virus APMV-1. En cuanto al valor de la serología, en el diagnóstico, se relaciona claramente con el estado inmunitario esperado de las aves afectadas. Los títulos de HI se consideran positivos si hay inhibición a una dilución del suero de 1/8 (2^3 o $\log_2(3)$ cuando se expresa como el recíproco) o superior contra ocho unidades hemoagluinantes (UHA) de antígeno. ⁽⁸⁾

El ensayo para determinar el título de inhibición de la hemaglutinación es simple en su principio: el virus se une a los glóbulos rojos mediante receptores en

su superficie (residuos de ácido sialico), los anticuerpos antivirales se unen a estos receptores y bloquean la hemaglutinación. En los pozos de la placa de microtitulación, se hacen diluciones dobles seriadas del suero , y se añade una cantidad constante de virus, con cuatro u ocho UHA. El título de inhibición de la hemaglutinación del suero se representa por la mayor dilución del suero que inhibe la aglutinación de los glóbulos rojos por la cantidad estandarizada de virus. Tras la vacunación se espera que el nivel de anticuerpos en el suero de las aves alcance un título mínimo de $4-6 \log_2$ lo que es igual a una dilución 1/32.. Este valor indica la eficacia de la vacunación en términos de respuesta inmunitaria. ⁽⁸⁾

Vacunas y vacunación

A pesar de que las vacunas contra la ENC no brindan una protección completa contra las cepas velogénicas del virus, su papel en el control de la enfermedad es fundamental para prevenir pérdidas por morbilidad y mortalidad en las aves. Asimismo, la vacunación puede aumentar la resistencia a la infección y reducir la cantidad de infecciones. Es crucial señalar que la vacunación se debe utilizar de manera adecuada junto con buenas prácticas de manejo y bioseguridad en la producción avícola. En la actualidad (2023), hay vacunas inactivadas y activas formuladas con cepas de baja virulencia, como B1 y La Sota las cuales provienen de patotipos lentogénicos , y las más recientes, Ulster y VG/GA ,provenientes de patotipos entéricos sub-clínicos, son ampliamente utilizadas en la industria avícola para prevenir la propagación de Newcastle.⁽⁹⁾

Las vacunas contra la ECN se producen en huevos embrionarios de gallina y en el caso de las vacunas de virus activos deben producirse en huevos embrionados libres de patógenos específicos (SPF, por sus siglas en inglés) para evitar la contaminación. El proceso de producción se realiza de forma aséptica y

a gran escala en condiciones de esterilidad. Para ello, se diluye el inóculo de trabajo en solución salina tamponada con fosfato esteril (PBS por sus siglas en inglés) y se inoculan aproximadamente de 10^3 a 10^6 (DIEP50) en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de 9 o 10 días. Luego, se incuban a 37°C. En las primeras 24 horas, se deben eliminar los huevos que contienen embriones muertos.⁽⁸⁾

Según la cepa viral es el tiempo de incubación, que se ajusta con el fin de maximizar la producción y minimizar la mortalidad embrionaria. Una vez que los embriones están infectados, se refrigeran a 4°C antes de recolectar el líquido alantoideo. Se quita la parte superior del cascaron y se aspira el líquido alantoideo después de apartar el embrión hacia abajo. Se evita la inclusión de resto alguno de yema o albúmina y se comprueba si los líquidos muestran contaminación bacteriana antes de preparar grandes cantidades para la liofilización o inactivación. En la producción de vacunas inactivadas, el líquido alantoideo recolectado se trata con formaldehído (una concentración final normal es 1/1000), o bien, con beta-propiolactona (una concentración final normal es $\frac{1}{2}$ (1 000–1/4 000 para inactivar el virus. El tiempo requerido debe ser suficiente para asegurar que esté libre de virus activos. La mayoría de las vacunas inactivadas no se concentran y se emulsionan con aceite mineral, aceite vegetal o hidróxido de aluminio.⁽⁸⁾

Así, las vacunas inactivadas son más caras que las de virus activos y su empleo implica la manipulación e inyección intramuscular o subcutánea por ave, de modo que, cada ave recibe una dosis estándar. Sin embargo, las vacunas inactivadas no provocan la propagación subsiguiente del virus ni reacciones respiratorias adversas. Después de la administración de la vacuna inactivada,

como no hay multiplicación vírica, se necesita más antígeno para lograr una inmunización efectiva en comparación con la vacunación con virus activos.

Eficacia de las vacunas

Se han propuesto distintos métodos para analizar la eficacia de las vacunas contra el VEN. Uno de los métodos más empleado es la prueba de potencia con una cepa de desafío.⁽⁹⁾ En Europa y Estados Unidos de América, las cepas de desafío más utilizadas son la Herts 33 y la GB Texas, esta última es altamente patógena. En México, la cepa de desafío utilizada, tanto para las vacunas del virus activo como para las del inactivo, es la cepa Chimalhuacán.⁽¹⁰⁾

Ahora bien, para llevar a cabo la prueba de potencia se requieren, al menos diez pollos SPF de dos a seis semanas de edad, los cuales se vacunan con la dosis mínima recomendada de cada biológico. El 9 Code of Federal Regulations CFR establece que, a los 14 días post-vacunación, las aves vacunadas y al menos diez aves control no vacunadas se expongan a la cepa de desafío, para este virus, y posterior a esto, durante 14 días, se observe a las aves vacunadas. La prueba se considera satisfactoria si durante el periodo de observación, al menos el 90% de las aves control desarrolla signos clínicos de esta enfermedad y al menos el 90% de las aves vacunadas no presenta signos clínicos.⁽¹⁰⁾

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que México se declaró zona libre de la ENC velogénica desde el 24 de junio de 2015, los informes de la enfermedad a través de la vigilancia epidemiológica arrojan que aún hay brotes, principalmente en sistemas de avicultura de traspatio, así como en sistemas de crianza de aves de combate.⁽⁵⁻⁶⁾

Uno de los métodos más eficaces para prevenir los brotes en esta clase de

unidades productivas es mediante la aplicación de la vacuna triple aviar; no obstante, se siguen reportando casos.

A raíz del análisis retrospectivo de los casos de aves remitidas al laboratorio de diagnóstico e investigación en enfermedades de las aves del Departamento de medicina y zootecnia de aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, entre 2000 y 2011, se encontró que al menos el 50% de los casos positivos a ENC se les había vacunado previamente con la triple aviar, en estos casos no se contaba con otro tipo de vacunación, como el uso de vacunas vivas que son comúnmente empleadas en planes de vacunación simultánea con el fin de proveer de una mayor inmunidad a las aves..⁽⁷⁾ Con este antecedente, se consideró necesario evaluar la eficacia de las vacunas utilizadas para determinar si generaban la respuesta inmune adecuada, la que en realidad proteja contra la alta mortalidad provocada por las cepas velogénicas de la enfermedad de Newcastle.

HIPÓTESIS

- La inmunidad conferida por la vacuna triple aviar protege ante la mortalidad generada por el desafío de una cepa velogénica de la enfermedad de Newcastle.

OBJETIVO

General

- Determinar la protección conferida por la vacuna triple aviar ante el desafío contra la enfermedad de Newcastle, mediante el uso de 3 diferentes vacunas disponibles en el mercado, con el fin de determinar los factores intervinen en la generación de la respuesta inmune.

Específicos

- Llevar a cabo la inmunización de las aves con la vacuna triple aviar haciendo uso de las principales marcas de vacunas disponibles en el mercado.
- Determinar la respuesta inmune humoral generada por las vacunas mediante la prueba de IH y comparar los resultados con los requerimientos mínimos estipulados por la OMSA para vacunas de virus inactivos.
- Evaluar la protección ante el desafío contra la cepa Chimalhuacán (cepa velogénica viscerotrópica).

Material y métodos

- Virus de la ENC cepa Chimalhuacán proporcionado por el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA, Km 37.5 Carretera Federal Pachuca, México, CP. 55740)
- Se utilizaron 46 aves Rhode Island de cuatro semanas de edad provenientes de una granja comercial sin antecedentes de vacunación contra ENC
- Fueron utilizadas 3 vacunas comerciales triple aviar con las siguientes formulaciones: (Cuadro 1)

Vacuna Triple aviar 1

Avibacterium paragallinarum 4.5×10^8 UFC
Newcastle cepa LaSota $10^{8.3}$ DIEP 50%
Pasteurella multocida A aviar 4.9×10^8 UFC
Pasteurella multocida x73 4.2×10^8 UFC
Adsorbidos en hidróxido de aluminio 0.2%

Vía de Administración: intramuscular.
Dosis 0.5 ml.

Vacuna Triple aviar 2

Avibacterium paragallinarum 4.5×10^8 UFC
Newcastle cepa LaSota $10^{8.3}$ DIEP 50%
Pasteurella multocida A aviar 4.9×10^8 UFC
Pasteurella multocida x73 4.2×10^8 UFC
Adsorbidos en hidróxido de aluminio 0.25%

Vía de administración: Intramuscular.
Dosis 0.5 ml.

Vacuna Triple aviar 3

Newcastle cepa LaSota $10^{8.3}$ DIEP 50%
Pasteurella multocida A aviar 4.9×10^8 UFC
Pasteurella multocida x73 4.2×10^8 UFC
Adsorbidos en hidróxido de aluminio 0.25%

Vía de administración: Intramuscular.
Dosis 0.5 ml.

Diseño experimental

La prueba se llevó a cabo en el área de constatación del CENASA.

El nivel de bioseguridad dentro de estas instalaciones, está considerado como nivel 3. Las aves fueron separadas en tres grupos de 12 aves cada uno y un grupo de 10 como testigo. Se pesó a cada una y según su peso fueron distribuidas en cuatro grupos uniformes identificados con cintillos de plástico, separar las aves en grupos uniformes permite mantener grupos homogéneos para disminuir la competencia por alimento, así como el picaje de aves más grandes, los cuales son factores de estrés que pueden afectar el correcto desarrollo de la respuesta inmune en los individuos. Primero se les colocó en jaulas de batería (Figura 1). A cada grupo se le suministró agua y alimento a libre

acceso, y el área de alojamiento estaba condicionada a presión negativa. Del día 36 y hasta el final de experimento, las aves se pasaron a unidades de aislamiento con sistema de filtración de aire con presión negativa, cada una de estas cámaras fue previamente desinfectada y preparada.(Figura 2 y 3) Cada unidad de aislamiento conto con las siguientes especificaciones:

- Tamaño externo: 2 200 × 850 × 1 800 mm
- Área interna: 1 600 × 750 × 820 mm
- Sistema de filtro interno de algodón
- Sistema de filtrado HEPA
- **Vacunación**
- El día 2 se vacunó a las aves siguiendo las especificaciones de cada uno de los fabricantes.(Figura 4) Cada vacuna se conservó en hieleras con gel refrigerante. Se utilizó una aguja por cada ave con el fin de evitar la contaminación del biológico. Cada una de las vacunas se aplicó vía IM a 0.5 mL por ave, y se desecharon los sobrantes de las vacunas mediante incineración interna. El día 21 se les vacunó por segunda ocasión esto acorde a las especificaciones de las tres vacunas, las cuales indicaban que se requería una segunda vacunación en las aves,(Figura 5) se aplicó un mililitro del biológico vía IM y se respetaron las mismas reglas de higiene y bioseguridad que en la primera vacunación.

Análisis serológico

Acorde a lo estipulado por el **Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2022** el analisis serológico de las aves, se realizo mediante la prueba de IH, esto a traves de la toma de sangre en cada

una de las aves, de los grupos de trabajo y la posterior obtención de suero, para llevar a cabo la prueba de IH en cada suero, los resultados de las pruebas se correlacionaron con lo estipulado por la OMSA, tomando como parámetros títulos de HI considerados positivos cuando hay inhibición a una dilución del suero de 1/8 (2^3 o $\log_2 3$ cuando se expresa como el recíproco) o superior contra 8 UHA de antígeno.

El suero de todas las aves para la prueba de inhibición de la hemaglutinación se obtuvo los días 1, 17, 36 y 52. (Figura 6), (Figura 7) CICUA- Protocolo: 0693

Desafío

Todas las aves fueron desafiadas dos semanas después de la segunda vacunación con la cepa Chimalhuacán con 0.2 mL de suspensión viral a $10^{6.5}$ DIEP 50%/mL vía IM. Después del desafío, se observaron los signos clínicos de los cuatro grupos de aves. Se les monitoreó 14 días, durante los cuales se evaluaron sus signos, mortalidad y lesiones. Se consideró como prueba satisfactoria que las aves vacunadas no manifestaran signos clínicos, ni mortalidad al menos en 11 de 12 aves, y que en el grupo no vacunado, muriera el 90%. Al término de la observación, se practicó la eutanasia y se dispuso a las aves de acuerdo con el reglamento del CENASA. Finalmente, se compararon los resultados serológicos con los signos clínicos.

RESULTADOS

Después llevar a cabo la prueba de desafío con las tres vacunas, se obtuvieron resultados satisfactorios para todas ellas. Las tres vacunas protegieron al 100%, acorde a lo estipulado por la OMSA, tras el final del desafío los grupos mantuvieron títulos de IH iguales o superiores a 1/64, de igual forma, en los grupos vacunados, no se observó mortalidad, mientras que el grupo testigo tuvo una mortalidad del 100% (Figura 1 y 2). En el grupo 1, solo una de las aves presentó signos neurológicos ocho días después del desafío, el resto de las aves permanecieron sin signos clínicos. El día 3 del desafío, todas las aves del grupo testigo, manifestaron signos clínicos de ENC (decaimiento, conjuntivitis, plumaje erizado, diarrea de color verde)(Figura 8) y, el día 5, todas las aves de este grupo murieron. Se tomaron muestras de cloaca y tráquea de las aves vivas con hisopos (Figura 9) para hacerles un aislamiento viral en embrión de pollo.(Figura 10,11 y 12) Se obtuvo un agente hemoaglutinante que fue identificado como VEN mediante HI utilizando antisueros específicos contra influenza aviar (IA) IA H5, IA H7 y ENC. (Figura 13)

Después de la vacunación, se evaluaron los títulos de anticuerpos contra ENC.(Figura 14 y 15) Los resultados de HI arrojaron títulos negativos en las muestras tomadas antes de la vacunación, lo que indica que las aves no tenían anticuerpos contra esta enfermedad. Los títulos de anticuerpos de las aves se encuentran en el (Anexo 2), con una media geométrica de 2.0 en cada grupo. A los 15 días de la primera vacunación, se verificaron los resultados para los grupos 1, 2, 3 y el grupo control (Anexo 3), de los que su media geométrica de anticuerpos fue de 4, 6.17, 3.27 y 2.4 respectivamente. Mientras, para los grupos 1-3 y el testigo, a 15 días de la segunda vacunación, los títulos se indican en los

(Anexo 4) , de los que su media geométrica fue de 10.67, 55.33, 34.4 y 2 para cada grupo. Finalmente, después del desafío, los anticuerpos de los grupos 1 a 3 se señalan en los (Anexo 5), donde su media geométrica fue de 61.3, 597.3 y 524.8 respectivamente.

Discusión

Las tres vacunas triple aviar inactivadas se evaluaron de conformidad con los reglamentos de la OMSA y el Code of Federal Regulations, Título 9 (CFR-9), y se determinó que ofrecen una protección superior al 90% en los grupos de aves desafiados por una cepa velogénica como la Chimalhuacán. En consecuencia, se estima que estas vacunas son adecuadas para su uso en aves de corral. ^(9, 10) Téngase en cuenta que en los lineamientos para realizar una prueba de potencia para vacunas con virus inactivados, no se especifica si debe llevarse a cabo una segunda vacunación. Esto brinda la posibilidad de estudiar si una sola vacunación proporciona una protección superior al 90% en una parvada. Esta investigación podría establecer nuevos protocolos de vacunación para la población objetivo, tanto aves de corral de ornato como de avicultura familiar.⁽¹⁰⁾

De los tres grupos vacunados por primera vez, ninguno de ellos superó un título de 1/8. Esto se contrastó con el reglamento de la OMSA, donde se considera que un título protege cuando es igual o superior a 1/64, así como con estudios comparativos que demuestran que una vacuna inactivada llega a brindar una protección del 100% si genera títulos iguales o mayores a 1/32. Lo que indicaría ineficacia de estas vacunas ante una cepa virulenta. En ambos estudios los parametros de resultados son para vacunas inactivadas con un solo antígeno. ⁽⁸⁻

11)

Ahora bien, después de vacunar por segunda vez a los tres grupos, todas las aves del grupo 1 obtuvieron títulos menores a 1/32. Se considera que esta proporción no protege ante ENC. Sin embargo, los títulos del 83.3% de las aves del grupo 2 fueron iguales o superiores a 1/32, y los anticuerpos del 70% de las aves del grupo 3 también fueron mayores o iguales a 1/32. Estos resultados se explican debido a las propiedades de la vacuna triple aviar, pues sus componentes tienen un papel fundamental en el desarrollo de una rápida respuesta inmunitaria.

El hidróxido de aluminio como adyuvante promueve una respuesta prolongada por la lenta liberación del antígeno. De la misma manera, la adición de bacterias gramnegativas que está demostrado poseen porinas las cuales tienen una alta inmunogenicidad, que en combinación con la vacuna supone un papel clave en una respuesta inmunológica más elevada. Aunque las bacterias gram negativas poseen otros PAMPS tales como lípidos glicosilados, lipofosfoglicanos, oligonucleótidos, lipoglicanos, proteínas y péptidos, las porinas han tenido un mayor estudio por sus propiedades inmunogénicas. ⁽¹²⁻¹⁵⁾

El hidróxido de aluminio es uno de los compuestos más usados en la elaboración de productos biológicos, como son las vacunas inactivadas, por su facilidad de manejo; además, es más económico fabricar vacunas con este hidróxido que producirlas con compuestos oleosos. Se ha comprobado que las vacunas que utilizan hidróxido de aluminio suelen generar una respuesta inmune mayor en la cuarta semana posterior a la vacunación, donde los títulos disminuyen gradualmente con el tiempo. De hecho, para la semana 12, los títulos suelen ser mínimos. Por otro lado, las vacunas oleosas generan una respuesta inmune 15 días después de la vacunación, la cual suele ser mayor en un tiempo más corto,

que las vacunas con hidróxido de aluminio, aunque los títulos también pueden disminuir en un periodo similar. ⁽¹³⁻¹⁴⁾

Aunque la concentración del adyuvante es fundamental para generar una respuesta inmune adecuada, la variación de anticuerpos con el hidróxido de aluminio se ha reportado poco significativa. Sin embargo en este trabajo se demuestra que las vacunas 2 y 3, formuladas con hidróxido de aluminio a una concentración de 0.25% aumentaron los títulos de forma superior a la de la vacuna del grupo 1, que contenía solo 0.20% de hidróxido de aluminio. Puesto que la media de títulos en las pruebas IH de este grupo fue el mínimo necesario para considerar una vacuna como satisfactoria ante la OMSA ⁽¹³⁻¹⁴⁾

Ahora bien, las bacterias gramnegativas en la vacuna triple aviar indican la presencia de porinas. Estas porinas desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de una respuesta inmune de larga duración y se atribuyen como propiedades inmunogénicas de la vacuna. Ya que se ha demostrado que la porina tiene un papel fundamental en la producción de inmunoglobulina G desde el cuarto día de inoculación, y alcanza su máximo en un periodo de 30 a 90 días después de la revacunación. ⁽¹²⁻¹³⁾

Aunque los principales estudios se centran en las porinas pertenecientes al género *Salmonella typhimurium*, estudios recientes en aves vacunadas con virus inactivos y luego desafiadas con ENC han mostrado un leve incremento de su respuesta inmune cuando se les han adicionado porinas de *E. coli*. esto abre la puerta a nuevas investigaciones para determinar las propiedades inmunogénicas de las porinas de *Pasteurella* y *Avibacterium*, así como otros PAMPS presentes en estas bacterias, esto con el fin de determinar si suponen un punto clave para que la vacuna genere la inmunidad aviar deseada. ⁽¹²⁻¹³⁾

Conclusiones

La vacuna triple aviar utilizada en el presente análisis brinda una protección de más del 90% ante la cepa velogénica Chimalhuacán. Aunque la literatura indica que se requieren títulos mayores, las pruebas serológicas revelaron que los títulos conferidos por las vacunas fueron suficientes para proteger al 100%. En la avicultura mexicana de aves de traspatio, de libre pastoreo y aves deportivas, la principal forma de inmunización contra la enfermedad de Newcastle es la vacuna triple aviar; sin embargo, los resultados de este estudio sugieren un uso inadecuado del biológico por falta de un programa de vacunación y al asesoramiento veterinario adecuado.

La amplia gama de productos para la prevención de la ENC permite elaborar planes adecuados de vacunación para las pequeñas producciones. El fin no solo es mejorar la salud de las aves, sino también el estatus zoonosario de México respecto a este virus. El uso apropiado de la triple aviar proporciona una alta protección ante esta enfermedad, no obstante, se debe concientizar a los pequeños productores sobre las buenas prácticas de manejo de productos biológicos, además de incentivar el mejoramiento de los programas de vacunación.

Referencias.

1. OMSA. Newcastle Disease [Internet]. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022. 2021 [citado el 14 de enero de 2023]. Disponible en: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf
2. W. Katrin Ventocilla, D'A Eliana Icochea, V. Rosa Gonzales, Z. Armando González, editor. Presence of Newcastle Disease Virus in wild birds of a coastal wetland nearby Lima [Internet]. Vol. 22. Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru; 2011. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v22n1/a07v22n1.pdf>
3. Perozo F, Merino R, Afonso CL, Villegas P, Calderon N. Biological and phylogenetic characterization of virulent Newcastle disease virus circulating in Mexico. Avian Dis [Internet]. 2008;52(3):472–9. Disponible en: <http://www.jstor.org/stable/27565775>
4. Merino R, Villegas H, Quintana JA, Calderon N. Characterization of Newcastle disease viruses isolated from chicken, gamefowl, pigeon and quail in Mexico. Vet Res Commun [Internet]. 2009;33(8):1023–30. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11259-009-9321-5>
5. Diario Oficial de la Federación publicado el 24 de junio de 2015. En línea: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5397875&fecha=24/06/2015
6. Análisis Estratégico de Riesgos Sanitarios. https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2020/diciembre/ACT1PAIEnfermedaddeNewcastle10-11-20_4a5c06e6-3b30-4819-858f-d0194e357159.pdf
7. Barri Colín Adriana. Caracterización histopatológica en encéfalos de pollos libres de patógenos específicos experimentalmente infectados con virus de la enfermedad de Newcastle Cepa Chimalhuacán. Tesis de licenciatura 2001. Universidad Nacional Autónoma de México

8. Swayne DE. Diseases of poultry: 2 Volume set. 14a ed. Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL, et al., editores. Hoboken, NJ, Estados Unidos de América: Wiley-Blackwell; 2020.
9. ECFR :: 9 CFR 113.205 -- Newcastle disease vaccine, killed virus [Internet]. Ecf.gov. [citado el 13 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.ecfr.gov/current/title-9/chapter-I/subchapter-E/part-113/subject-group-ECFRaef2d34ace59d5d/section-113.205>
10. Liljebjelke KA, King DJ, Kapczynski DR. Determination of minimum hemagglutinin units in an inactivated Newcastle disease virus vaccine for clinical protection of chickens from exotic Newcastle disease virus challenge. Avian Dis [Internet]. 2008;52(2):260–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1637/8154-101907-Reg.1>
11. Bustos M., F. (s. f.). *Las porinas como adyuvante de una vacuna inactivada contra Newcastle en pollos de engorde*. Ciencia Unisalle. <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv/vol1/iss9/3/>
12. Marisol Pérez-Toledo, Paola A Martínez-Amador, Rodolfo Pastelin-Palacios, Armando Isibasi, Adam F Cunningham, Constantino López-Macías, editor. Purification of Salmonella Typhimurium OmpD porin induces long-term high levels of antibodies: implications on the development of vaccines against non-typhoid salmonella [Internet]. Vol. 152. Gaceta Medica de Mexico; 2016. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2016/gms162a.pdf>
13. Jafari M, Moghaddam Pour M, Taghizadeh M, Masoudi S, Bayat Z. Comparative assessment of humoral immune responses of aluminum hydroxide and oil-emulsion adjuvants in Influenza (H9N2) and Newcastle inactive vaccines to chickens. Artif Cells Nanomed Biotechnol [Internet]. 2017;45(1):84–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3109/21691401.2015.1129626>
14. Tizard, I. R. (2018). *Veterinary Immunology*. Elsevier Gezondheidszorg.

Anexos.

Anexo 1.- Descripción de los biológicos para la realización del experimento.

Vacuna	Formulación	Dosis	Vía
Vacuna/ Grupo 1	<i>Avibacterium paragallinarum</i> 4.5 x 10 ⁸ UFC Newcastle cepa LaSota 10 ^{8.3} DIEP 50% <i>Pasteurella multocida</i> A aviar 4.9 10 ⁸ UFC <i>Pasteurella multocida</i> x73 4.2 x 10 ⁸ UFC Adsorbidos en hidróxido de aluminio 0.2%	Aves de hasta 30 días : .5ml Aves de mas de 30 días : 1ml Refuerzo a los 21 días.	Intramuscular
Vacuna / Grupo 2	<i>Avibacterium paragallinarum</i> 4.5 x 10 ⁸ UFC Newcastle cepa LaSota 10 ^{8.3} DIEP 50% <i>Pasteurella multocida</i> A aviar 4.9 10 ⁸ UFC <i>Pasteurella multocida</i> x73 4.2 x 10 ⁸ UFC Adsorbidos en hidróxido de aluminio 0.25%	Aves de hasta 30 días : .5ml Aves de mas de 30 días : 1ml Refuerzo a los 21 días.	Intramuscular
Vacuna / Grupo 3	Newcastle cepa LaSota 10 ^{8.3} DIEP 50% <i>Pasteurella multocida</i> A aviar 4.9 10 ⁸ UFC <i>Pasteurella multocida</i> x73 4.2 x 10 ⁸ UFC Adsorbidos en hidróxido de aluminio 0.25%	Aves de hasta 30 días : .5ml Aves de mas de 30 días : 1ml Refuerzo a los 21 días.	Intramuscular

Anexo 2.- Títulos IH del grupo testigo, grupo 1, grupo 2 y grupo 3 en la fase de pre-vacunación (Día 1).

NUMERO DE AVE	GRUPO TESTIGO		GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3	
1	1	1/2	1	1/2	1	1/2	1	1/2
2	2	1/2	2	1/2	2	1/2	2	1/2
3	3	1/2	3	1/2	3	1/2	3	1/2
4	4	1/2	4	1/2	4	1/2	4	1/2
5	5	1/2	5	1/2	5	1/2	5	1/2
6	6	1/2	6	1/2	6	1/2	6	1/2
7	7	1/2	7	1/2	7	1/2	7	1/2
8	8	1/2	8	1/2	8	1/2	8	1/2
9	9	1/2	9	1/2	9	1/2	9	1/2
10	10	1/2	10	1/2	10	1/2	10	1/2
11			11	1/2	11	1/2	11	1/2
12			12	1/2	12	1/2	12	1/2

Anexo 3.- Títulos IH del grupo testigo, grupo 1, grupo 2 y grupo 3, en el día 17 posterior a la vacunación

NUMERO DE AVE	GRUPO TESTIGO		GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3	
1	1	1/2	1	1/4	1	1/8	1	1/4
2	2	1/4	2	1/2	2	1/4	2	1/4
3	3	1/2	3	1/4	3	1/2	3	1/4
4	4	1/2	4	1/4	4	1/2	4	1/2
5	5	1/4	5	1/4	5	1/4	5	1/2
6	6	1/2	6	1/4	6	1/2	6	1/4
7	7	1/2	7	1/2	7	1/2	7	1/2
8	8	1/2	8	1/4	8	1/4	8	1/4
9	9	1/2	9	1/4	9	1/8	9	1/4
10	10	1/2	10	1/8	10	1/32	10	1/2
11			11	1/4	11	1/2		
12			12	1/4	12	1/4		

Anexo 4.- Títulos IH del grupo testigo, grupo 1, grupo 2 y grupo 3 en el día 38 posterior a la segunda vacunación.

NUMERO DE AVE	GRUPO TESTIGO		GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3	
1	1	1/2	1	1/8	1	1/128	1	1/32
2	2	1/2	2	1/8	2	1/32	2	1/32
3	3	1/2	3	1/8	3	1/128	3	1/8
4	4	1/2	4	1/8	4	1/32	4	1/16
5	5	1/2	5	1/8	5	1/32	5	1/8
6	6	1/2	6	1/8	6	1/32	6	1/16
7	7	1/2	7	1/16	7	1/32	7	1/8
8	8	1/2	8	1/8	8	1/32	8	1/128
9	9	1/2	9	1/8	9	1/64	9	1/64
10	10	1/2	10	1/16	10	1/8	10	1/32
11			11	1/16	11	1/16		
12			12	1/16	12	1/128		

Anexo 5.- Títulos IH del grupo 1, grupo 2 y grupo 3, en el día 54 posterior al desafío.

NUMERO DE AVE	GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3	
1	1	1/128	1	1/512	1	1/256
2	2	1/64	2	1/512	2	1/265
3	3	1/64	3	1/512	3	1/256
4	4	1/32	4	1/512	4	1/1024
5	5	1/64	5	>1/4096	5	1/1024
6	6	1/64	6	1/2048	6	1/256
7	7	1/64	7	>1/4096	7	1/128
8	8	1/64	8	>1/4096	8	1/512
9	9	1/64	9	>1/512	9	1/1024
10	10	1/32	10	1/256	10	1/512
11	11	1/64	11	1/256		
12	12	1/32	12	1/256		

Titulos de anticuerpos.

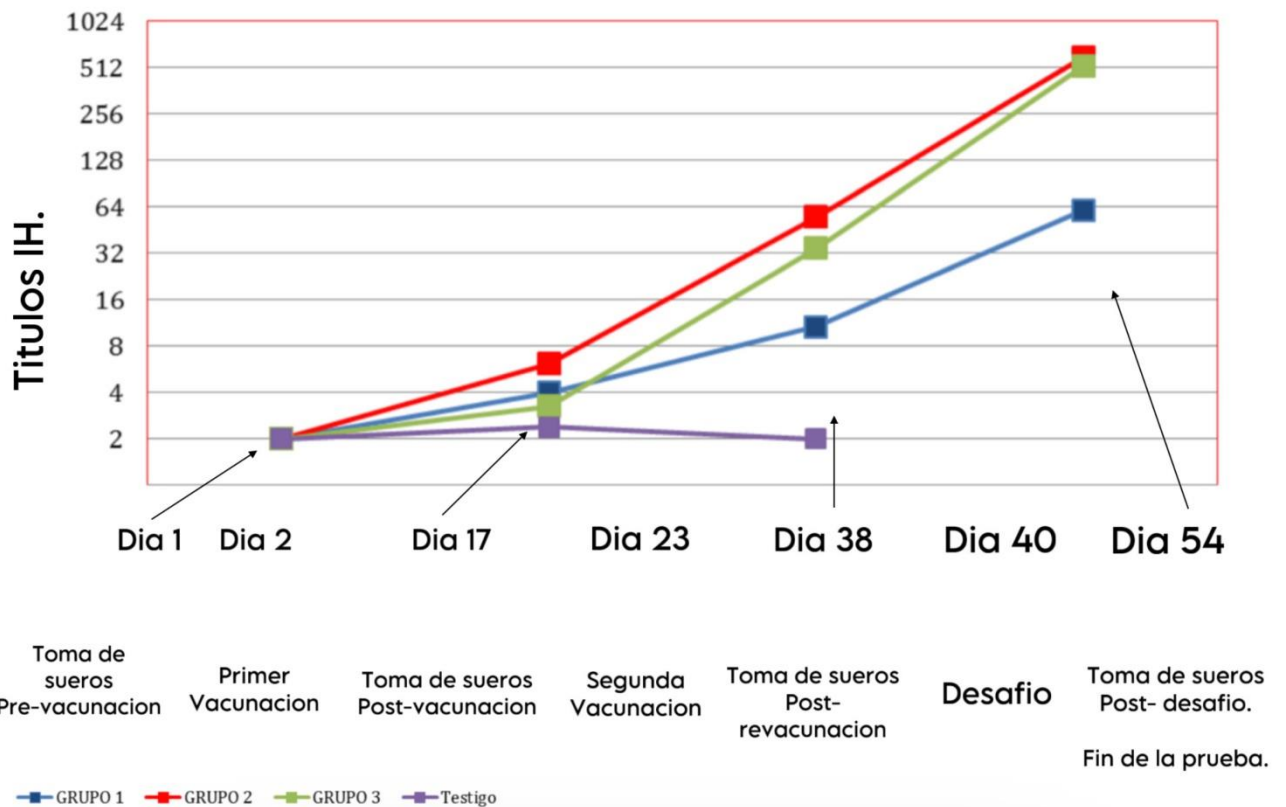


Figura 1. Inmunidad generada en los cuatro grupos durante el experimento

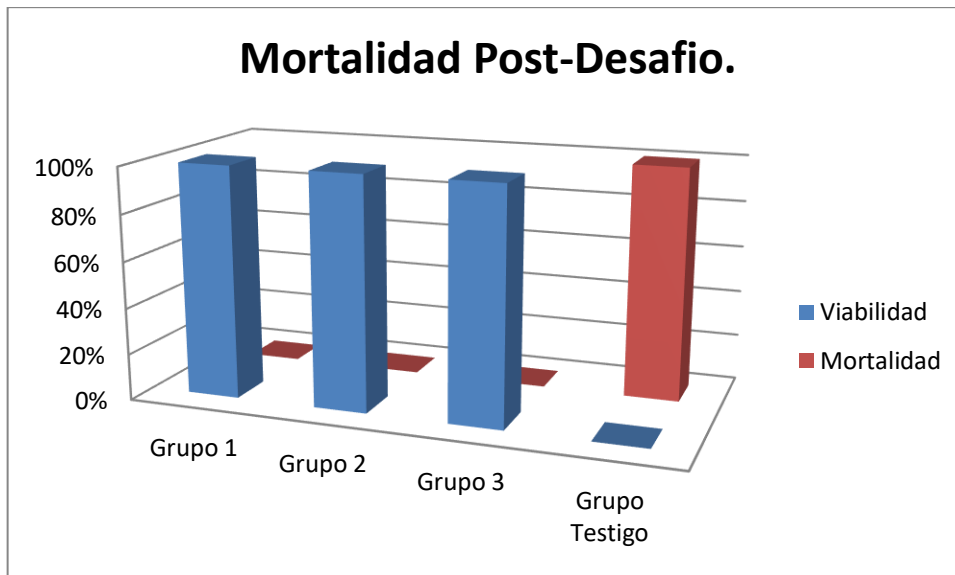


Figura 2. Mortalidad y Viabilidad de las aves posterior al desafío.



Figura 3. Alojamiento en batería para cada grupo de los pollitos en las instalaciones de CENASA en el día 1.



Figura 4. Preparación de las unidades de aislamientos para llevar a cabo el desafío.



Figura 5. Alojamiento de las aves en las cámaras de aislamiento.



Figura 6.- Vacunación intramuscular de los pollitos en el día 2



Figura 7. Segunda vacunación de los pollitos 21 días después de la vacunación.



Figura 8. Procesamiento de las muestras de sangre en tubos vacutainer amarillos con gel separador de suero.



Figura 9. Separación de los sueros en tubos eppendorf estériles haciendo uso de una campana de bioseguridad.



Figura 10. Pollita del grupo testigo con la presentación de signos clínicos de ENC 3 días posteriores al desafío.



Figura 11. Toma de hisopado traqueal para el aislamiento del virus de ENC en ave del grupo testigo.



Figura 12. Preparación de los embriones para la inoculación del virus extraído del grupo testigo.



Figura 13. Viabilidad de los embriones inoculados.



Figura 14. Recuperación del líquido alantoideo de los embriones inoculados para llevar a cabo una prueba de aglutinación en placa.

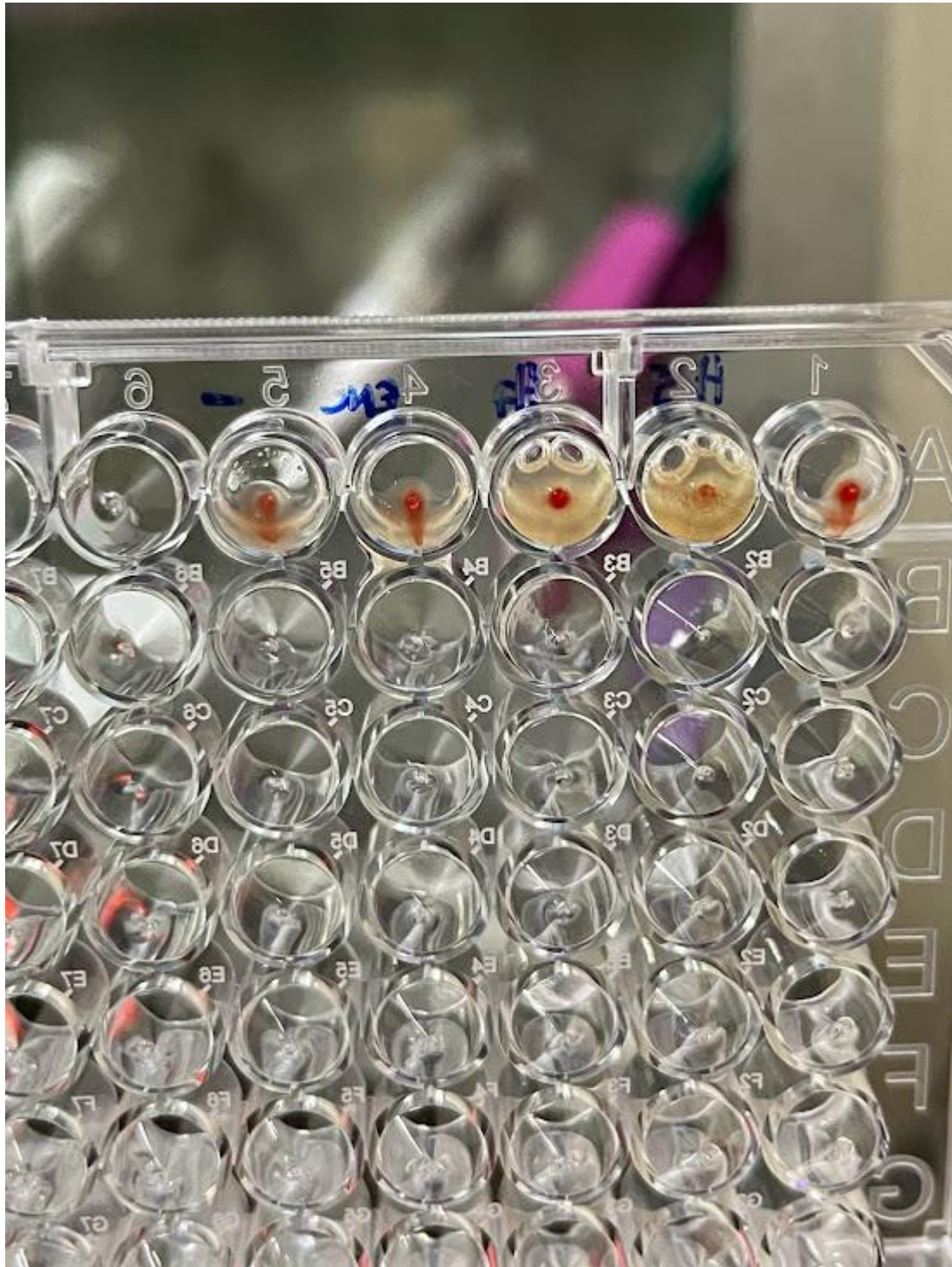


Figura 15. Inhibición de la aglutinación tras confrontar el líquido alantoideo contra antisueros de diferentes agentes hemaglutinantes.

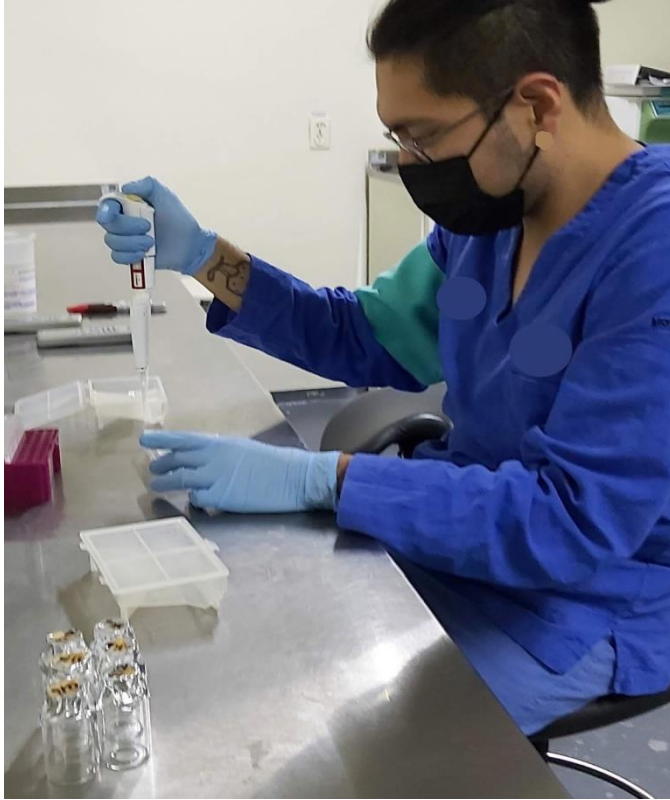


Figura 16. Preparación de los reactivos para la realización de la prueba IH.



Figura 17. Realización de la prueba de IH.