

01685
1976

" EL HP-1, UN AGENTE HEMOAGLUTINANTE DE
PATOS, EN LA INMUNIZACION CONTRA EL
SINDROME DE LA BAJA DE POSTURA 1976 "

Tesis presentada ante la
División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del grado de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

PATOLOGIA ANIMAL

por

MARCIA RAMIREZ MARIN

ASESORES :

M.V.Z., M.Sc. Ph. D. Benjamín Lucio M.

M.V.Z., M.Sc. Ph. D. Armando Antillón R.

ING. AGR. M. C. José Luis Pablos H.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

RESUMEN

Marcia Ramírez Marín. "El HP-1, un agente hemoaglutinante de patos, en la inmunización contra el síndrome de la baja de -- postura 1976". (Bajo la dirección de Benjamín Lucio, Armando Antillón y José Luis Pablos).

En la República Mexicana en los últimos tres años, se realizó el aislamiento de dos agentes hemoaglutinantes relacionados serológicamente con el virus del síndrome de la -- baja de postura (VSBP), uno se obtuvo a partir de una parvada de patos comerciales de la estirpe Pekín blanco, el cual fue denominado "HP-1"; el otro se aisló a partir de gallinas ponedoras Babcock B-380 y se le llamó "MI-6". Este estudio fue realizado con el propósito de determinar la capacidad que el agente hemoaglutinante HP-1 tiene en inducir una respuesta -- inmune al ser empleado como virus muerto emulsionado y adsorbido en hidróxido de aluminio; el grado de transmisión e infectividad del agente MI-6; las lesiones producidas en el oviducto de gallinas por el aislamiento MI-6; las características físico-químicas de los agentes hemoaglutinantes HP-1 y -- MI-6; la protección conferida por el agente HP-1 contra el -- síndrome de la baja de postura, bajo condiciones de campo.

En el primer capítulo al emplear el agente hemoaglutinante HP-1 como virus muerto en emulsión simple, emulsión múltiple y emulsión múltiple con antígeno en la fase acuosa, -- en la inmunización de aves ponedoras de 26 semanas de edad; -- se encontró que dichas vacunas tienen la misma capacidad de -- inducir el desarrollo de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación que la vacuna comercial utilizada para el control del síndrome de la baja de postura, mientras que al utilizar el agente HP-1 adsorbido en hidróxido de aluminio, se obtuvieron niveles bajos de anticuerpos a través del período de estudio. A las 33 semanas postinmunización se realizó el desa-

fio a la parvada con el aislamiento MI-6, llevando un control periódico de los niveles de anticuerpos y de la producción de huevo en el período pre y posdesafío.

En cuanto a la producción del huevo, no se observaron cambios atribuibles al VSBP.

En el siguiente capítulo, al inocular un grupo de aves con $10^{5.7}$ dosis infectante embrión de pato 50 por ciento por ave (DIEPa₅₀ por ciento/ave) por vía ocular, se demostró que el agente hemoaglutinante MI-6 no produjo alteraciones -- en la calidad del huevo, al infectar gallinas ponedoras Babcock B-380 de 26 semanas de edad, ni se difundió horizontalmente a un grupo de aves susceptibles de la misma estirpe mantenidas en estrecho contacto.

En el tercer capítulo, se estudiaron las lesiones macro y microscópicas ocasionadas por el agente MI-6, al ser inoculado en aves susceptibles. Se encontró que dicho aislamiento no produjo ningún cambio macroscópico, y que los hallazgos histopatológicos más sobresalientes fueron la infiltración linfocitaria y la presencia de edema, principalmente en la región anatómica del oviducto correspondiente a infundíbulo y útero, presentes tanto en las aves inoculadas como en las aves control. Para ello se trabajó con un lote de 40 gallinas Babcock B-380 de 35 semanas de edad, 10 de las cuales permanecieron como testigos y el resto fueron inoculadas con $10^{5.7}$ DIEPa₅₀ por ciento/ave, vía ocular, sacrificando a las aves a los 6,10,14,20,24 y 28 días postinoculación.

En el siguiente capítulo se determinaron algunas de las características de los aislamientos hemoaglutinantes HP-1 y MI-6, comprobándose que ambos agentes son serológicamente similares al virus 127 del síndrome de la baja de postura; por otro lado, se encontró que dichos aislamientos se diferencian de los virus prototipos de la enfermedad, el BC-14 y el 127, por la dificultad que presentaron para crecer en células re--

nales de embrión de pollo, fibroblastos de embrión de pollo - y fibroblastos de embrión de pato.

En la prueba de campo se evaluaron dos vacunas a virus muerto emulsionado y adsorbido en gel de hidróxido de aluminio con el aislamiento HP-1. La respuesta inmune que se obtuvo fue similar a la del primer experimento bajo condiciones controladas, lográndose un coeficiente de correlación lineal positiva de 0.847 y 0.486, al asociarse los niveles de anticuerpos obtenidos en esta parte de la investigación con el primer experimento, para la vacuna emulsionada y para la adsorbida en gel y polvo de hidróxido de aluminio respectivamente. El estudio se llevó a cabo en Tehuacán, Puebla, ubicando a la parvada dentro de una misma caseta con capacidad para 5,400 aves. A las 19 semanas de edad se llevó a cabo la inmunización de las gallinas. Como testigos se trabajaron dos grupos de aves, uno vacunado con la vacuna comercial contra el SBP y el otro grupo se dejó sin inmunizar, llevando un control semanal de los niveles de anticuerpos y de la producción del huevo. A pesar de que no fue posible evaluar la protección conferida por las vacunas producidas con el HP-1, los niveles de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación logrados, similares a los inducidos por la vacuna comercial, indican que este agente es un buen inmunógeno cuando se le incorpora en vacunas emulsionadas.

DATOS BIBLIOGRAFICOS

El autor nació en San José de Costa Rica.

Realizó sus estudios primarios en la Escuela Republica del Perú, los secundarios y bachillerato en el Colegio María Auxiliadora (ambos centros educativos ubicados en la ciudad capital) de 1963 a 1973.

Cursó la carrera de Medicina Veterinaria en la Universidad Nacional Autónoma de Heredia, Costa Rica obteniendo el grado de Médico Veterinario en 1979.

De 1980 a la fecha, labora como profesor en la Cátedra de Patología Aviar de la Escuela de Medicina Veterinaria, en la Universidad Nacional Autónoma de Heredia.

En 1980 se inscribió como estudiante de posgrado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para obtener el grado de Doctor en Ciencias Veterinarias: Patología Animal.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	1
REVISION BIBLIOGRAFICA	4
CAPITULO 1. Inmunización contra el síndrome de la baja de postura	10
CAPITULO 2, Infectividad y transmisión del agente hemoaglutinante MI-6	48
CAPITULO 3. Lesiones del oviducto de gallinas inoculadas con el agente hemoaglutinante MI-6	58
CAPITULO 4. Algunas pruebas para la caracterización de los agentes hemoaglutinantes HP-1 y MI-6	66
CAPITULO 5, Evaluación en campo de la protección contra el síndrome de la baja de postura, conferida por el agente HP-1	77
CONSIDERACIONES GENERALES	94
LITERATURA CITADA	98
ANEXO	106

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro</u>	<u>Páginas</u>
1.1. Asignación de las vacunas en estudio	17
1.2. Dosis infectante embrión de pato 50 por ciento y unidades hemoaglutinantes, aplicadas por ave	18
1.3. Valor estimado para los parámetros B_1 y B_2 y coeficiente de determinación - R^2	32
1.4. Comparaciones de las vacunas en estu- dio. Técnica de variables binarias - de Gujarati	33
1.5. Valor estimado para los parámetros B_1 , B_2 , l^- , B_1 , B_2 y coeficiente de determinación	35
1.6. Eficiencia productiva en la etapa pre y posdesafío	46
2.1. Título de la inhibición de la hemoaglu- tinación, en gallinas ponedoras Babcock B-380, inoculadas con el aislamiento -- MI-6	53
2.2. Estudio de la producción del huevo. Lo- te 1 - control no inoculado	55
2.3. Estudio de la producción del huevo. Lo- te 2 - inoculado	56

LISTA DE CUADROS
(continuación)

<u>Cuadro</u>		<u>Página</u>
3.1.	Títulos de la inhibición de la hemoaglutinación, en gallinas ponedoras Babcock B-380, inoculadas con el aislamiento MI-6 ...	64
4.1.	Hemoaglutinación en placa, con glóbulos rojos de diferentes especies	72
5.1.	Tratamientos y repeticiones utilizados en el diseño completamente al azar en la prueba de campo, de las vacunas: - emulsión simple, emulsión comercial y adsorbida en gel de hidróxido de aluminio	81
5.2.	Valor estimado para los parámetros B_1 y B_2 y coeficientes de determinación. Modelo de regresión lineal múltiple - raz cuadrada	88

LISTA DE GRAFICAS

<u>Gráfica</u>	<u>Página</u>
1.1. Títulos de inhibición de la hemoaglutinación, en gallinas vacunadas contra el --- SBP'76 a las 26 semanas de edad	27
1.2. Títulos de inhibición de la hemoaglutinación, en gallinas vacunadas contra el --- SBP'76 a las 26 semanas de edad	28
1.3. Títulos de inhibición de la hemoaglutinación, en gallinas vacunadas contra el --- SBP'76 a las 26 semanas de edad	29
1.4. Títulos de inhibición de la hemoaglutinación, en gallinas vacunadas a las 26 semanas contra el SBP	38
1.5. Porcentaje de huevo con cascarón deforme en los grupos de gallinas vacunadas o no, contra el SBP, antes y después del desaffo ..	40
1.6. Porcentaje de huevo en fáfara, en los -- grupos de gallinas vacunadas o no, contra el SBP, antes y después del desaffo	42
1.7. Porcentaje de huevos con pérdida de color, en el cascarón, en los grupos de gallinas vacunadas o no, contra el SBP antes y después del desaffo	43

LISTA DE GRAFICAS

(continuación)

<u>Gráfica</u>	<u>Página</u>
1.8. Porcentaje de huevos con cascarón roto, en los grupos de gallinas vacunadas o no, contra el SBP antes y después del desafío	44
5.1. Títulos de inhibición de la hemoaglutinación en gallinas vacunadas contra el SBP	86
5.2. Producción de huevo/gallina-día	91
5.3. Producción de huevo/gallina-día	92
5.4. Producción de huevo/gallina-día	93

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

<u>Fotografía</u>	<u>Página</u>
4.1. Microscopía electrónica del aislamiento HP-1	75
4.2. Microscopía electrónica del aislamiento MI-6	76

INTRODUCCION

Siempre han existido casos de disminución en la producción de huevo entre las parvadas, mismas que han sido atribuidas a diversas causas tales como: fallas en el balance nutricional, prácticas de manejo, así como a factores infecciosos como son: enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa, encefalomielitis aviaria, micoplasmosis (6,46) y alguno de los 11 serotipos del grupo de los adenovirus aviáres, que se encuentran ampliamente distribuidos en la población avícola y que son capaces de ocasionar bajas de postura (10,11,21), entre otros.

El síndrome de la baja de postura (SBP) es ocasionado por un adenovirus (71), el cual posiblemente proviene de los patos (Anas boschas) (7,10,38), diferenciándose del grupo de los adenovirus aviáres, por su capacidad para hemoaglutinar glóbulos rojos de ave (6,11). Afecta a las gallinas de postura (4,6,8,11,46,78) produciendo alteraciones, tanto en la producción del huevo, como en la calidad interna y externa del mismo (4,7,8,11,46,62,74,78).

En la República Mexicana, especialmente en el Valle de México y en los Estados de Nuevo León y Puebla, se han venido presentando, durante los últimos años, disminuciones en la producción del huevo; así como alteraciones en la calidad y en la pigmentación del cascarrón, similares a los que se presentan en el SBP (5,54,56).

La sospecha de la presentación clínica de la enfermedad impulsó a Rosales (60) a realizar un estudio serológico sobre la presencia del SBP en México, en el que encontró anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra el virus del síndrome de la baja de postura (VSBP), en parvadas comerciales de gallinas semipeşadas productoras de huevo café y --

y reproductoras de raza pesada, localizadas en los Estados de Puebla y Nuevo León respectivamente.

En 1981 García (28), a partir de un muestreo realizado en parvadas de patos Pekín blanco en el Valle de México, llevó a cabo el aislamiento de un agente hemoaglutinante, al que denominó HP-1 y que está serológicamente relacionado con el virus K-11, aislado por Calnek * en los Estados Unidos y con los prototipos 127 y BC-14.

La suposición de que la enfermedad está presente en México, se ve reforzada por el aislamiento de otro agente hemoaglutinante, aislado en el Valle de México, en gallinas de 35 semanas de edad, que sufrían un brote que clínicamente hizo sospechar de SBP y al que se identificó como MI-6 **.

La única medida de control del SBP que se ha establecido hasta el momento, es la aplicación de una vacuna comercial emulsionada en aves de 16 a 18 semanas de edad (10,--83), cuyo agente inmunizante es el virus BC-14 inactivado en formaldehído y emulsionado en aceite, siendo el virus y el aceite materia prima de importación. Esto coloca al país bajo una dependencia tecnológica, que eleva el costo de producción de la vacuna, añadiendo \$6.00 al valor neto de cada ave ***. Cuando se ha tratado de reducir los costos eliminando el empleo de esta vacuna, se han observado bajas en la producción hasta de un 40 por ciento, si el problema se presenta en una parvada en su máximo nivel de postura ***.

* Calnek, B.W. Comunicación personal (1981).

** Ramírez M., M. y García Z., J.I. Datos no publicados (1981).

*** Galindo, F. Comunicación personal (1984).

Con base en lo expuesto, los objetivos de este trabajo fueron: demostrar si el aislamiento HP-1 es capaz de inducir una respuesta serológica al ser usado como vacuna; estudiar la infectividad y transmisión del aislamiento MI-6 en gallinas; determinar la patogenicidad del agente MI-6 en gallinas; caracterizar el aislamiento MI-6 y el HP-1, estudiando sus propiedades serológicas y físico-químicas y evaluar la respuesta serológica a vacunas preparadas con el HP-1, bajo condiciones de campo.

Con la finalidad de alcanzar cada uno de los objetivos propuestos en esta investigación, se planteó realizar en forma separada varias hipótesis:

- Inmunizar una parvada de gallinas susceptibles con el agente hemoaglutinante HP-1, estudiando la respuesta inmune a diversas presentaciones del mismo, utilizando un lote control inmunizado con la vacuna comercial contra el SBP. Después de un estudio de 29 semanas sobre la respuesta inmunológica hacia el agente HP-1 y la producción del huevo, desafiar a todas las aves con el aislamiento MI-6 para evaluar la efectividad de las vacunas en estudio, tomando en consideración los títulos de anticuerpos y la producción del huevo, así como las características externas e internas del mismo (Capítulo 1).
- Infectar un grupo de gallinas con el agente MI-6, para observar el efecto clínico así como la capacidad de difusión horizontal del MI-6, a un grupo de aves no infectadas pero mantenidas en estrecho contacto con las infectadas (Capítulo 2).
- Estudiar la patogenicidad del agente MI-6 a través de las lesiones macro y microscópicas al ser inoculado en aves susceptibles (Capítulo 3).
- Averiguar mediante pruebas serológicas y físico-químicas, si los aislamientos HP-1 y MI-6 realizados en la República Mexicana, son efectivamente similares al agente etiológico del síndrome de la baja de postura (Capítulo 4) y finalmente
- Evaluar la protección conferida por vacunas preparadas con el HP-1 contra el SBP en el campo (Capítulo 5).

REVISION BIBLIOGRAFICA

El síndrome de la baja de postura 1976 (SBP), es -- en la actualidad, una de las afecciones más importantes para la industria avícola en los continentes Europeo y Americano -- (6,7,10,11,44,45,62).

En el año de 1976, se determinó la etiología del -- SBP, tratándose de un agente que aglutina glóbulos rojos de -- gallina, pato y ganso, clasificado dentro del grupo de los -- adenovirus (71); sin embargo, el virus es diferente de los -- prototipos de adenovirus aviarios (Fowl Adenovirus), identifi-- cados por sus siglas en inglés: FAV, ya que estos no son ca-- pacese de hemoaglutinar glóbulos rojos. Además, mediante la -- prueba de difusión en gel, se demuestra que el virus no tiene la porción antigénica principal del grupo FAV (6,11). Por lo tanto, se ha considerado como un nuevo serotipo dentro del -- grupo de los adenovirus (10,11) que afecta aves de postura -- (4,8,11,46,78).

Como prototipos del virus del síndrome de la baja -- de postura (VSBP), se han propuesto los virus BC-14 y 127 --- descubiertos por Baxendale en 1977 (6,7,10) y, McFerran y co-- laboradores en 1977 (44,45), respectivamente.

El VSBP puede propagarse en diferentes tipos de cul-- tivos celulares de origen aviar: hepatocitos de embrión de po-- llo (HEPo), fibroblastos de embrión de pato (FEPa) y células renales de pollo (CREPo) de un día de edad, en los cuales el virus produce corpúsculos de inclusión intranucleares (6,11,- 83]. Macroscópicamente es posible observar la formación de -- placas en los cultivos de HEPo y FEPa, las cuales permiten -- cuantificar el virus e indirectamente los anticuerpos neutra-- lizantes, por medio de la prueba de reducción de placas (11).

Se ha postulado que este virus proviene de los patos ya que:

- se encuentra difundido en la población de patos y puede aislarse de ellos con facilidad, a partir de hisopos cloacales (7,11,18,36,65,73,79)
- tiene un buen crecimiento en tejidos celulares de patos (10,38,43)
- es posible que se hayan infectado las gallinas a través de una vacuna contra la enfermedad de Marek preparada en fibroblastos de patos contaminados, por lo que se considera que el SBP es "exótico" para las gallinas (22,38,73).

La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida, abarcando: Holanda, Inglaterra, Francia, España, Bélgica, Dinamarca, Irlanda del Norte, Italia y Alemania (4,6,8,11,47,--58).

En el Continente Americano, se ha informado la presencia de anticuerpos contra el virus del síndrome de la baja de postura, en la República Mexicana (5,28,60) y Brasil --(62), mientras que en los Estados Unidos se ha realizado el aislamiento a partir de patos, de un virus cuyas características morfológicas y serológicas son similares al prototipo 127, sin que se haya observado su presentación clínica, ni la presencia de anticuerpos en gallinas (74). Por otro lado, en --este mismo país, Schloer y colaboradores en 1978, informan el aislamiento de un agente hemoaglutinante a partir de gallinas sin que éstas presentaran evidencias clínicas del SBP (66).

El VSBP afecta primordialmente ponedoras comerciales y reproductoras pesadas (4,45,46,58), considerándose que las estirpes productoras de huevo café son más susceptibles --que las de huevo blanco (58,83).

Esta enfermedad se caracteriza por la imposibilidad de la parvada para alcanzar el máximo de producción, que--

dando en un 15 a 25 porciento inferior al nivel esperado; o bien, un súbito descenso el cual varía entre 30 a 50 porciento durante un período de dos a cuatro semanas, si la infección ocurre después de haberse alcanzado el óptimo de postura (3,4,7,8,11,17,43,44,45,46,58,62). Cuando el problema se inicia al estar las gallinas en el máximo de producción, se observan bajas de un 10 porciento durante tres semanas después de la infección (14).

Otro aspecto importante del SBP desde el punto de vista económico, es la presencia de cascarones débiles, hasta llegar a la ausencia completa del mismo y la pérdida de color en los huevos de cascarón café (3,4,6,7,8,11,17,41,42,44,46,47,62,69,74).

Van Eck y colaboradores, en 1977 describieron en Holanda un descenso de la viscosidad de la albúmina de los huevos infectados, así como alteraciones en la fertilidad e incubabilidad (25).

Clinicamente la parvada se observa sana; sin embargo, en algunos casos hay disminución en el consumo de agua y alimento (12,43,46). También se han llegado a presentar fuertes diarreas acuosas que humedecen la cama de los gallineros (11,12,62), lo que frecuentemente se traduce en la necesidad de sustituirla varias veces durante la vida útil del lote (62). Ahora bien, la presencia de diarrea no se asocia necesariamente con bajas en la producción (74).

En cuanto a los posibles hallazgos a la necropsia de las aves infectadas, la literatura no menciona alguna alteración macroscópica significativa, mientras que a nivel histológico se presenta una infiltración linfoide y edema en el útero (30,53,69). Taniguchi y colaboradores, en 1980 encontraron que la cepa JPA-1 produce además, atrofia de las glándulas uterinas, degeneración de las células de la mucosa epitelial con infiltración linfocitaria y una disminución en los gránulos de secreción (69).

Ocasionalmente se observan cuerpos de inclusión basófilos en el núcleo de algunas células epiteliales en degeneración (69).

En parvadas que sufren la enfermedad, el virus puede aislarse de la capa flogística aproximadamente entre los 15 a 30 días después de haberse observado los primeros signos. También puede aislarse a partir de oviducto y heces de gallinas, así como de hisopos cloacales (3,7,11,47), nasales y faríngeos en una parvada que presente baja en la producción --- (45).

El virus se transmite de patos a patos, de patos a pollos y de pollos a patos (73,78), mientras que la transmisión horizontal que se ha encontrado de pollos a pollos es -- relativamente baja (3,10,44,62,73,78) y casi nula de granja a granja (3,83). En las gallinas, la principal forma de difusión es la vertical, y por lo tanto, esta transmisión es uno de los factores que hace posible la persistencia del virus en la población avícola; aún más, si se considera que el problema generalmente ocurre cuando la parvada se encuentra en el - máximo de la producción (10,44,43,45). En el macho se acepta como posible la excreción a través del semen (44,45).

Aparentemente, el virus se mantiene en el organismo animal en forma latente, hasta que existe un aumento en los - niveles de hormonas sexuales o bien, por el estado de tensión al iniciarse la postura (10,45).

Se ha encontrado que la transmisión vertical de la enfermedad, no se presenta después de una muda forzada a las 60 semanas, en aves infectadas durante su primer ciclo de postura (62).

Para confirmar el diagnóstico de la enfermedad, el aislamiento e identificación viral es el método más eficaz, - seguido de la prueba serológica de la inhibición de la hemoaglutinación (IH) (11,45,74). Las parvadas infectadas con el

VSBP, pueden presentar inhibición de la hemoaglutinación, después de las 10 semanas de edad y en algunos lotes hasta alcanzar el máximo de postura. Las pollitas reproductoras provenientes de madres infectadas que nacen con anticuerpos maternos, pueden ser negativas a la prueba serológica durante el crecimiento, volviendo a presentar anticuerpos después de la baja de postura, o de dos a cuatro semanas más tarde (62).

Es frecuente que las aves que muestran anticuerpos a las 20 semanas no logren alcanzar los niveles de producción establecidos, y no presenten cambios en la calidad del huevo. Las aves que no muestran anticuerpos a las 20 semanas, presentan una marcada caída en la producción con alteraciones del cascarrón, después de alcanzar el máximo de producción (3).

Aún cuando no se conocen todos los detalles de su epidemiología se ha encontrado que una vacuna de virus inactivado y emulsionado en aceite protege a las gallinas contra la baja de postura, y podría ser de utilidad en la erradicación de la enfermedad (7,11,12,58,74).

A nivel de investigación en el laboratorio, se ha estudiado el comportamiento de la vacuna a virus vivo, encontrándose que ésta brinda una protección tan buena como las emulsionadas; sin embargo, se considera que éstas últimas son la mejor opción para emplearse a nivel de campo, ya que eliminan los riesgos de la difusión del virus por medio de la vacunación (8,11).

Con el fin de reducir el manejo de la parvada, también se ha experimentado con una vacuna bivalente, preparada con cualquiera de los dos virus mencionados y el virus de la enfermedad de Newcastle. En este caso los títulos empleados para el adenovirus no fueron menores de 2^{14} unidades hemoaglutinantes (UHA) y de $10^{8.5}$ dosis infectante para cultivo de tejidos 50 por ciento por ml (DICT₅₀ por ciento/ml). Los títulos de los fluidos con el virus de Newcastle fueron de 2^{10} UHA y $10^{9.5}$ dosis infectante embrión de pollo 50 por ciento por ml (DIEPo₅₀ por ciento/ml). Los resultados fueron excelentes para ambas enfermedades; además, la progenie presentó al-

tos títulos de anticuerpos maternos (83).

La mejor edad para realizar la inmunización, es entre las 16 a 20 semanas de edad, aplicando la vacuna por vía intramuscular o subcutánea para obtener niveles de anticuerpos que persisten hasta las 39 semanas de edad (11,46).

Se puede pensar en la erradicación de la enfermedad por medio de una selección de las reproductoras antes de que entren en el período de postura y eliminar todas aquellas aves que presenten anticuerpos; sin embargo, esto es difícil (9).

La vacunación tiene la ventaja de reducir la incidencia en la transmisión horizontal del virus, no solamente dentro de la misma granja, sino que también de granja a granja en áreas densamente pobladas (10,46,83).

Por lo expuesto, se evidencia que la mejor forma de llevar a cabo el control del síndrome de la baja de postura como para otras enfermedades aviares, es la inducción de una inmunidad específica por medio de la vacunación (7,9,12,67,74,82).

Capítulo 1.

Inmunización contra el síndrome de la baja de postura.

La efectividad de las vacunas depende de muchas variables, entre ellas la naturaleza y cantidad del antígeno -- administrado, así como la presencia de adyuvantes que aumenten su inmunogenicidad (39,49,61,67,70). Los adyuvantes inmunológicos pueden ser definidos como agentes no específicos que aumentan la respuesta inmune a un antígeno específico --- (49).

Los adyuvantes pueden actuar de diferentes maneras; una de las cuales consiste en modificar el antígeno, de tal forma que sea presentado más eficazmente a las células sensibles. Esto puede conseguirse mediante el empleo de una sustancia insoluble que frene el catabolismo del antígeno y sirva como depósito del mismo, permitiendo así la liberación lenta del mismo (49). Las sustancias más comúnmente empleadas para este fin son: el alumbre, el hidróxido de aluminio, el fosfato de aluminio, el caolín, la tapioca, la lanolina, las saponinas, los alginatos y el aceite mineral, entre otras --- (70).

En la actualidad lo más usado para formar estos depósitos de antígenos son las emulsiones, las cuales consisten en un sistema de dos fases, formadas por una fina dispersión de un líquido no miscible en otro (13,70).

Algunos adyuvantes aumentan la respuesta inmune mediante otros mecanismos produciendo efectos superiores. Este es el caso del adyuvante completo de Freund, el cual consiste en una emulsión de agua en aceite, a la que se ha añadido el Mycobacterium tuberculosis (34,70).

En forma comercial y con el fin de seguir aprovechando el magnífico efecto de la emulsión y no tener los efectos indeseables, se ha eliminado la adición de micobacterias,

usando comúnmente el aceite mineral Drakeol 6 VR y Arlacel A como emulsificador (13).

Existen hoy en día diferentes tipos de emulsiones elaboradas con dos líquidos inmiscibles: agua y aceite mineral o vegetal, pudiendo ser cualquiera de los dos la fase dispersa. Así pues, y dependiendo de que líquido sea la fase dispersa, las emulsiones resultantes tendrán diferentes características físicas (50).

Entre los tipos de emulsión se pueden citar:

- aceite en agua, donde la fase externa es agua (50)
- agua en aceite, siendo su porción externa el aceite, llamado también adyuvante de Freund (13,50)
- agua en aceite en agua, llamadas también emulsiones múltiples (33).

La presencia del aceite desencadena una inflamación crónica local, lo que atrae macrófagos hacia el foco de la infección, mientras que el antígeno se va liberando lentamente. El resultado es que el antígeno cuya vida media en el organismo podría ser inferior a un día, persiste por varias semanas, lo que induce a una respuesta inmune de larga duración (27, 34,39,49,61,70). Además, el adyuvante actúa como vehículo y el antígeno es transportado por el sistema linfático hasta lugares distantes, estimulándose así la proliferación de células capaces de elaborar anticuerpos; por lo tanto, el antígeno es aprovechado por mayor número de células (34,70).

Las vacunas emulsionadas de agua en aceite muestran una marcada superioridad, que está dada por las propiedades físicas, y dentro de éstas, la más importante es la formación de multitud de gotas de agua, que contienen el antígeno, rodeadas de aceite, quedando el antígeno completamente protegido contra el ataque de anticuerpos y sustancias inespecíficas, lográndose una permanencia prolongada en el organismo (50). En cambio, las vacunas emulsionadas de aceite en agua,

el antígeno se encuentra en la fase externa de agua, que es soluble en los líquidos orgánicos, quedando el agente inmunógeno expuesto a la acción específica e inespecífica del sistema de defensa. De esta manera, la adsorción es sumamente rápida presentando poca permanencia en el organismo.

La inmunidad que confieren es baja y extremadamente corta, requiriéndose de más vacunaciones para obtener una respuesta inmune aceptable (50).

En otros estudios se ha encontrado que las vacunas emulsionadas múltiples (agua-aceite-agua), son más efectivas para provocar una respuesta inmune que las emulsionadas simples y son más fáciles de inyectar por su baja viscosidad --- (33). Tanto las emulsiones simples como las emulsiones múltiples, tienen la desventaja de inducir una respuesta lenta dada la protección conferida al antígeno por el aceite.

Por otro lado, las vacunas adsorbidas en hidróxido de aluminio, aunque no desencadenan reacciones inmunológicas tan marcadas, ya que el antígeno es fácilmente eliminado por el sistema inmune, provocan una respuesta adecuada, son más baratas y han sido usadas satisfactoriamente para el control de algunas enfermedades (15,51), por lo que pueden ser una alternativa menos costosa para la inmunización, además de no requerir de equipo especial para la formación de emulsiones.

Hasta la fecha el síndrome de la baja de postura -- (SBP), ha sido prevenido con emulsiones simples de virus inactivado (7,11,12,58,74), por lo que el principal objetivo de esta investigación, fue el determinar si el agente hemoaglutinante HP-1 aislado en México a partir de patos, es capaz de inducir el desarrollo de anticuerpos contra el virus del SBP, al ser aplicado como vacuna inactivada en gallinas ponedoras de 26 semanas de edad.

La otra finalidad, fue comparar la respuesta inmune originada por la vacuna emulsionada simple y la emulsionada múltiple, así como el determinar si la presencia de antígeno en la fase externa de la emulsión múltiple tiene un efecto -- benéfico sobre la vacunación, primordialmente en la respuesta temprana, al quedar disponible el antígeno en forma inmediata.

Por otro lado, y dado el bajo precio que representa la elaboración de una vacuna inactivada y adsorbida en hidróxido de aluminio, determinar si esta vacuna produce resultados similares a las vacunas emulsionadas.

Materiales y Métodos

Aislamiento HP-1

El aislamiento HP-1 fue proporcionado gentilmente por el M.V.Z. J.I.García, quien aisló éste agente hemoaglutinante en parvadas de patos de engorda Pekín blanco, de dos a ocho semanas de edad. Dicho aislamiento fue identificado a través de pruebas serológicas, encontrándose que es similar a los virus prototipos del SBP: 127 y BC-14 (28).

Réplica del HP-1

Se inocularon 0.2 ml del agente HP-1 en la cavidad alantoidea de pato de la estirpe Pekín blanco, de 11 días de edad, obtenidos de una granja comercial de la que se sabía -- estaba infectada con el mismo virus (28).

Después de seis días de incubación a 37⁰C, se procedió a cosechar el líquido amnioalantoideo (LAA), con el que se realizó la prueba de hemoaglutinación (HA) para la titulación del virus, después de haberse llevado a cabo tres pases ciegos con el fin de aumentar el título viral.

Como testigo, se inocularon tres embriones de pato con caldo nutritivo, usando el LAA para dar tres pases ciegos.

Prueba de hemoaglutinación

El sistema empleado para determinar el contenido de hemoaglutinina, fue el micrométodo con diluciones de: 1:5, -- 1:10, 1:20, etc y utilizando como testigo el virus K-11 * --- (35,75).

* El virus K-11 fue proporcionado por el Dr. B.W.Calnek. Departamento de Medicina de las Aves y Animales Acuáticos de la Universidad de Cornell, U.S.A.

Antígeno vacunal

Para la elaboración de las vacunas, el LAA conte---
niendo $10^{5.9}$ dosis infectante embrión de pato 50 por ciento --
por ml (DIEPa₅₀ por ciento/ml), fue inactivado con 0.1 por cien
to de formaldehído *, durante 12 horas a 37⁰C.

Vacuna emulsionada

La elaboración de la vacuna emulsionada se llevó a
cabo por la adición de volúmenes iguales de LAA al adyuvante
incompleto de Freund **, mezclándolos en un homogenizador de
tejidos, a alta velocidad por un lapso de 10 minutos (37).

Vacuna emulsionada múltiple

Para obtener la emulsión múltiple, se preparó pre--
viamente una emulsión simple y ésta se adicionó gota a gota
a un volumen igual de solución salina fosfatada (SSF) con ---
Tween 80 al dos por ciento (33), mientras se homogenizaba a al
ta velocidad durante 10 minutos.

Vacuna emulsionada múltiple + antígeno en la fase acuosa

La vacuna emulsionada múltiple + antígeno en su fa--
se acuosa, se elaboró igual que la vacuna anterior, con la --
particularidad de que ésta vacuna se le adicionó antígeno a -
la fase acuosa externa.

* J.T.Baker S.A. Xalostoc, México.

** Difco Laboratories. Detroit 1, Michigan, U.S.A.

Vacuna adsorbida en hidróxido de aluminio

La elaboración de la vacuna adsorbida en hidróxido de aluminio, se realizó por la adición gota a gota de una parte de LAA en una parte de hidróxido de aluminio (80 por ciento de solución salina fosfatada y 20 por ciento de hidróxido de aluminio *) (2,51).

El material se homogenizó a alta velocidad por 10 minutos.

Aves experimentales

Para el estudio de la capacidad inmunizante del aislamiento HP-1, las vacunas ya mencionadas fueron aplicadas en una parvada de 180 gallinas de la estirpe Babcock B-380, de 26 semanas de edad, libres de anticuerpos contra el SBP, e inmunizadas contra la enfermedad de Newcastle, encefalomielitosis aviaria, enfermedad de Marek, laringotraqueitis infecciosa y viruela aviaria.

El lote de 180 gallinas, fue dividido en seis grupos compactos de 30 aves cada uno, colocando tres aves por jaula en un cuarto de ventilación positiva.

Las vacunas fueron asignadas al azar, tal como se ilustra en el Cuadro 1.1.

La unidad de observación fue una jaula con 10 repeticiones y la unidad de análisis fue el promedio de los títulos de inhibición de la hemoaglutinación (IH), obtenidos de cada tres gallinas, alojadas en una jaula.

En el Cuadro 1.2 se indica las dosis infectantes en un brote de pato 50 por ciento por ave (DIEPa₅₀ por ciento/ave) y

* J.T. Baker S.A. Xalostoc, México.

Cuadro 1.1 Asignación de las vacunas en estudio.

Grupo.	Vacuna
1	Testigo no vacunado.
2	Emulsión simple.
3	Emulsión múltiple.
4	Emulsión múltiple + antígeno.
5	Adsorbida en hidróxido de aluminio.
6	Emulsión comercial.

Cuadro 1.2 Dosis infectantes embrión de pato 50 por ciento y unidades hemoaglutinantes, aplicadas por ave .

Grupo .	DIEP a 50 por ciento/ave .	UHA /ave .
1	---	---
2	$10^{5.9}$	12600
3	$10^{5.9}$	12600
4	$10^{6.1}$	19200
5	$10^{5.9}$	12600
6	desconocida .	desconocida .

las unidades hemoaglutinantes (UHA) que fueron aplicadas por ave. La inmunización se realizó por vía subcutánea en la base del cuello.

Prácticas de manejo

El alimento suministrado fue para ponedoras, elaborado en el Centro de Enseñanza Investigación y Extensión Avícola Cunicola y Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, a razón de 115 gramos por ave.

La recolección del huevo se hizo dos veces al día, con la finalidad de poder realizar un control diario y semanal de la postura, para cada uno de los seis grupos.

Debe aclararse que en el transcurso de esta investigación, hubo fallas en el suministro del alimento y del agua a la parvada. Durante las primeras cinco semanas de estudio, las aves tuvieron una parasitosis externa la cual fue tratada con Malatión al uno por ciento.

Estudio de la respuesta inmune

Con el propósito de evaluar la capacidad del agente hemoaglutinante HP-1 para inducir una respuesta inmune, se realizó el estudio de los niveles de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (IH), por medio de una serie de muestreos, en cada uno de los grupos citados, sangrando a las gallinas a las 0,1,2,3,4,6,10,16,20,26 y 29 semanas postinmunización.

Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH)

Las pruebas de IH, se hicieron utilizando el procedimiento beta, con 4 UHA del antígeno K-11, en el sistema de microtitulación (35,75). Los títulos de anticuerpos inhibi--

dores de la hemoaglutinación, se expresan como el recíproco de la dilución más alta capaz de inhibir 4 UHA.

Simultáneamente se hicieron controles de: antígeno; para la comprobación de las 4 UHA y de un suero positivo y -- otro negativo al síndrome de la baja de postura.

Prueba de desafío

Con el fin de comprobar a nivel de laboratorio la efectividad de las vacunas en estudio, se procedió a realizar un desafío a las 33 semanas postinmunización. Para ello se utilizó el aislamiento hemoaglutinante MI-6, el cual fue aplicado vía ocular a razón de 10^6 DIEPa₅₀ por ciento/gallina.

A las cuatro semanas posdesafío, se realizó un sangrado en la parvada con el fin de estudiar el comportamiento de los niveles de anticuerpos.

Estudio de la producción del huevo

En el estudio de la producción del huevo se consideraron diversos parámetros (ver Cuadros 1 y 2 del Anexo).

Las características externas del huevo, tales como: cascarón roto, en fáfara, pérdida de color y cascarón deforme, fueron evaluadas diariamente durante el tiempo de duración del estudio.

La calidad interna se determinó por el método de -- Unidades Haugh (UH), basado en la relación existente entre el peso en gramos de 12 huevos y la albúmina, expresada en milímetros (19,57); mientras que la calidad externa se estudió a través de la prueba de Gravedad Específica (GE) (57).

Estos dos últimos parámetros citados, fueron analizados semanalmente desde cinco semanas antes de realizar el -- desafío a la parvada y seis semanas después del mismo.

Análisis estadístico

Niveles de anticuerpos

Para evaluar el comportamiento de los niveles de anticuerpos de cada una de las vacunas, se ajustaron dos modelos de regresión lineal múltiple sin intercepto, el denominado raíz cuadrada y el cuadrático (24), representados en las ecuaciones 1 y 2 respectivamente:

$$Y_{it} = B_1 X_{it} + B_2 X_{it}^{1/2} + E_{it} \quad (1)$$

$$Y_{it} = B_1 X_{it} + B_3 X_{it}^2 + E_{it} \quad (2)$$

donde; para simplificar la notación,

$t = 0, 1, 2, 3, 4, 6, 10, 16, 20, 26$ y 29 semanas y

Y_{it} es el nivel promedio de anticuerpos presentado en la i -ésima repetición, $1 \leq i \leq 10$, de la semana t ,

X_{it} es el valor de la semana t ,

X_{it}^2 y $X_{it}^{1/2}$ son el cuadrado y raíz cuadrada respectivamente de la semana t ,

B_1 , B_2 y B_3 son parámetros a estimar y

E_{it} es una variable aleatoria tal que $E_{it} \sim N(0, \sigma^2)$, $1 \leq i \leq 10$, e independiente.

El criterio de selección de los modelos de las ecuaciones 1 y 2, se basó en el máximo coeficiente de determinación, R^2 , y el mínimo cuadrado medio del error.

El modelo raíz cuadrada de cada una de las vacunas, fue comparado con respecto a la emulsión simple, bajo el criterio de ser la vacuna utilizada a nivel mundial en el control del SBP. Para este caso, se utilizó la técnica de variables binarias de Gujarati (31,32).

El modelo conjunto fue:

$$\begin{aligned}
 Y_{it} = & \beta_1 X_{it} + \beta_2 (D_1 X_{it}) + \beta_3 (D_2 X_{it}) + \beta_4 (D_3 X_{it}) + \\
 & \beta_5 (D_4 X_{it}) + \delta_1 X_{it}^{1/2} + \delta_2 (D_1 X_{it}^{1/2}) + \delta_3 (D_2 X_{it}^{1/2}) + \\
 & \delta_4 (D_3 X_{it}^{1/2}) + \delta_5 (D_4 X_{it}^{1/2}) + \epsilon_{it}.
 \end{aligned} \quad (3)$$

donde;

Y_{it} = es el nivel promedio de anticuerpos presentado en la --
i-ésima repetición, $1 \leq i \leq 10$, de la semana t ,

X_{it} = es el valor de la semana t ,

β 's y δ son parámetros a estimar,

$X_{it}^{1/2}$ = es la raíz cuadrada de la semana t ,

D_1 = 1 si la observación es la vacuna 2
0 de otro modo.

D_2 = 1 si la observación es la vacuna 3
0 de otro modo.

D_3 = 1 si la observación es la vacuna 4
0 de otro modo.

D_4 = 1 si la observación es la vacuna 5
0 de otro modo.

ϵ_{it} = es una variable aleatoria tal que $\epsilon_{it} \sim N(0, \sigma^2)$, $0 \leq i \leq 10$,
e independiente.

Con el fin de evaluar si los niveles de anticuerpos inducidos por las diferentes presentaciones del agente hemoaglutinante HP-1 y por la vacuna comercial, fueron los niveles óptimos en relación a los esperados en teoría, se decidió evaluar la capacidad de ajuste de éstos anticuerpos durante las 29 semanas de estudio. Para ello se planteó la hipótesis de Nerlove; citado en Goldberger (29), la cual es ampliamente -- utilizada en econometría, y establece

$$Y_t - Y_{t-1} = \delta (Y_t^* - Y_{t-1}) , \quad 2 \leq t \leq 29 \quad (4)$$

en donde:

Y_t, Y_{t-1} son los niveles de anticuerpos observados en la semana t y $t-1$,

Y_t^* es el nivel de anticuerpos esperado, o el nivel de anticuerpos que en teoría debería presentar cada vacuna respectivamente, y

δ es el denominado coeficiente de ajuste, tal que $0 < \delta \leq 1$. Por consiguiente, si δ es igual a uno, significa que el actual nivel de anticuerpos es igual al esperado en el tiempo t , es decir

$$Y_t - Y_{t-1} = Y_t^* - Y_{t-1} \quad \text{y por lo tanto;} \\ Y_t = Y_t^*$$

Si δ es igual a cero, significa que nada cambia;-- el actual nivel de anticuerpos, al tiempo t , es el mismo al observado en el período de tiempo anterior

$$Y_t - Y_{t-1} = 0(Y_t^* - Y_{t-1}) = 0 \quad \text{y por lo tanto} \\ Y_t = Y_{t-1}$$

La hipótesis de Nerlove planteada en la ecuación 4 se puede considerar bajo dos perspectivas, las que son complementarias

i) Considerando la variable Y_t^* , es decir, la que proporciona

el valor de β y para tal objetivo, se plantea el modelo de Nerlove

$$Y_t = \beta B_1 X_t + \beta B_2 X_t^{1/2} + (1-\beta)Y_{t-1} + E_t; \quad 2 \leq t \leq 29 \quad (5)$$

ii) Considerando la variable Y_t , es decir, los niveles de anticuerpos observados en la semana t , $2 \leq t \leq 29$.

De la ecuación 4 se tiene

$$Y_t = \beta Y_t^* + (1-\beta)Y_{t-1}, \quad (6)$$

lo que indica que los niveles de anticuerpos observados son un promedio ponderado de los niveles de anticuerpos teóricos y los niveles de anticuerpos observados en la semana anterior al tiempo t . De acuerdo al valor de β , el cual es obtenido del correspondiente modelo ajustado de la ecuación 5, se puede establecer la dependencia de Y_t sobre Y_t^* o Y_{t-1} . Esto quiere decir, que si β es cercano a uno, Y_t se aproxima a Y_t^* y en poco depende de Y_{t-1} . Si β es cercano a cero, Y_t depende de Y_{t-1} y poco de Y_t^* .

La aplicación del modelo de Nerlove, planteaba dificultades teóricas para el caso concreto de esta investigación, por lo que fue necesario efectuar ciertas correcciones a la información obtenida originalmente, con el fin de satisfacer la suposición de homogeneidad de varianzas o homoscedasticidad de los errores, Draper y Smith (24). En el Anexo 3 se ilustran los desarrollos estadísticos realizados en el caso particular.

Para corroborar el coeficiente $(1-\beta)$ que aparece como coeficiente de regresión de Y_{t-1} en la ecuación 5, se obtuvo la autocorrelación de primer orden, es decir, se autocorrelacionaron los niveles de anticuerpos observados con desfase de una semana (16).

Estudio de la producción del huevo

En el estudio de la producción del huevo, se utilizó un análisis descriptivo considerando las características - externas del huevo, tales como: cascarón roto, en fáfara, -- pérdida de color y cascarón deforme.

Resultados y Discusión

Réplica del HP-1

El LAA de los embriones testigo después de haberle dado tres pases ciegos, fue negativo a la prueba de hemoaglutinación viral, por lo que se puede pensar que la transmisión del virus a través del huevo (10,44,45,73,78), si la hubo, -- era muy baja, lo que nos da cierta seguridad de que el HP-1 -- no se contaminó al inocularlo en embriones de pato de una parvada positiva al adenovirus (28).

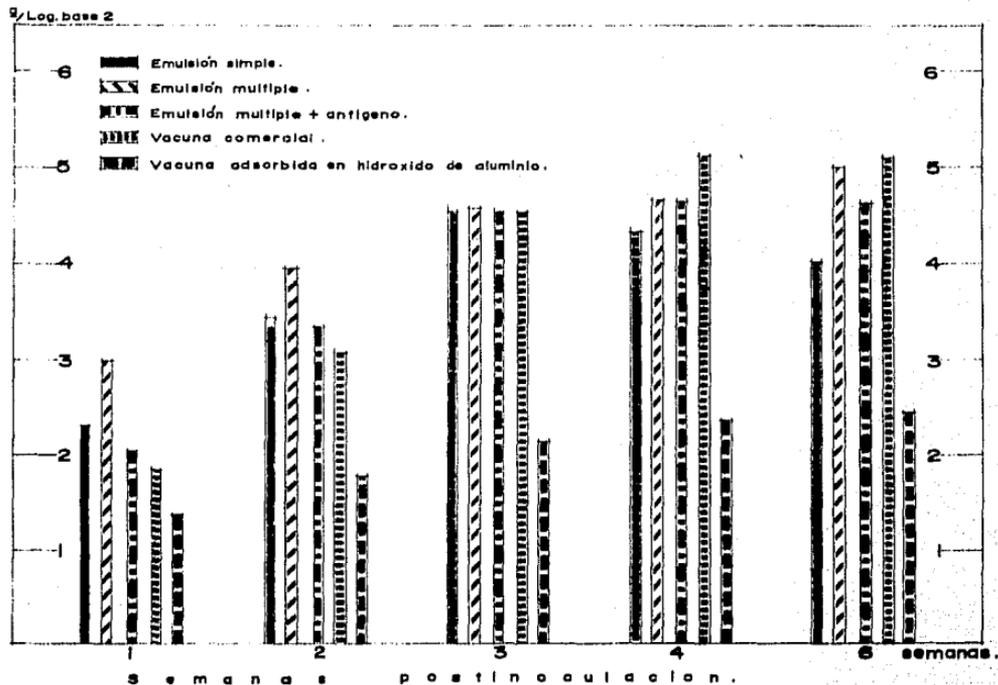
Estudio de la respuesta inmune

En las Gráficas 1.1 y 1.2, están representados en forma conjunta para los seis grupos en estudio, los títulos de inhibición de la hemoaglutinación en las gallinas vacunadas contra el SBP a las 26 semanas de edad, mientras que en la Gráfica 1.3, se presentan los niveles de anticuerpos inducidos por las diferentes presentaciones del HP-1, para cada uno de los grupos correspondientes.

En el primer muestreo que se realizó, no incluido en las gráficas y considerado como el sangrado testigo de la parvada, no se detectaron anticuerpos contra el SBP, en ninguno de los grupos, lo que indica que las aves estaban libres del VSBP al iniciarse el trabajo.

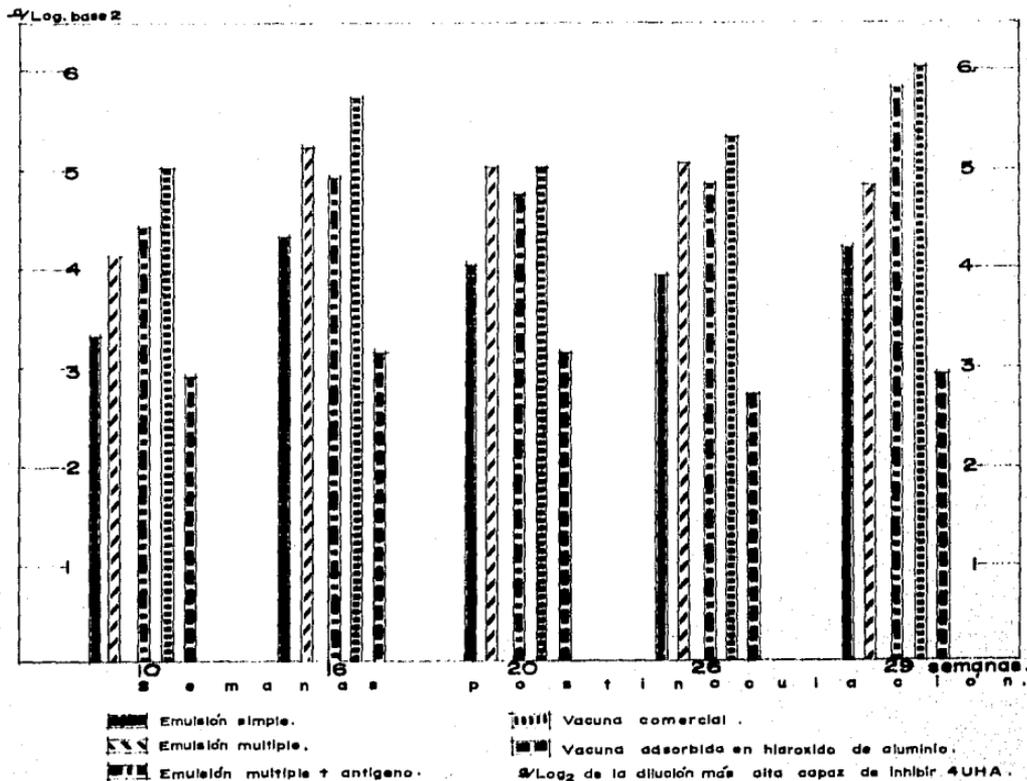
Los niveles de anticuerpos inducidos al utilizar el HP-1 inactivado en emulsión simple, fueron relativamente bajos para las dos primeras semanas postinmunización, presentando un incremento a partir de la tercera semana, manteniéndose constantes durante el periodo de estudio. Al comparar estas observaciones con los niveles de anticuerpos inducidos por la emulsión comercial, se puede apreciar un comportamiento similar, lo que viene a confirmar los resultados obtenidos por -- otros investigadores para las vacunas emulsionadas agua en --

Gráfica 1.1 Titulos de inhibición de la hemoaglutinación, en gallinas vacunadas contra el SBP'76 a las 26 semanas de edad.

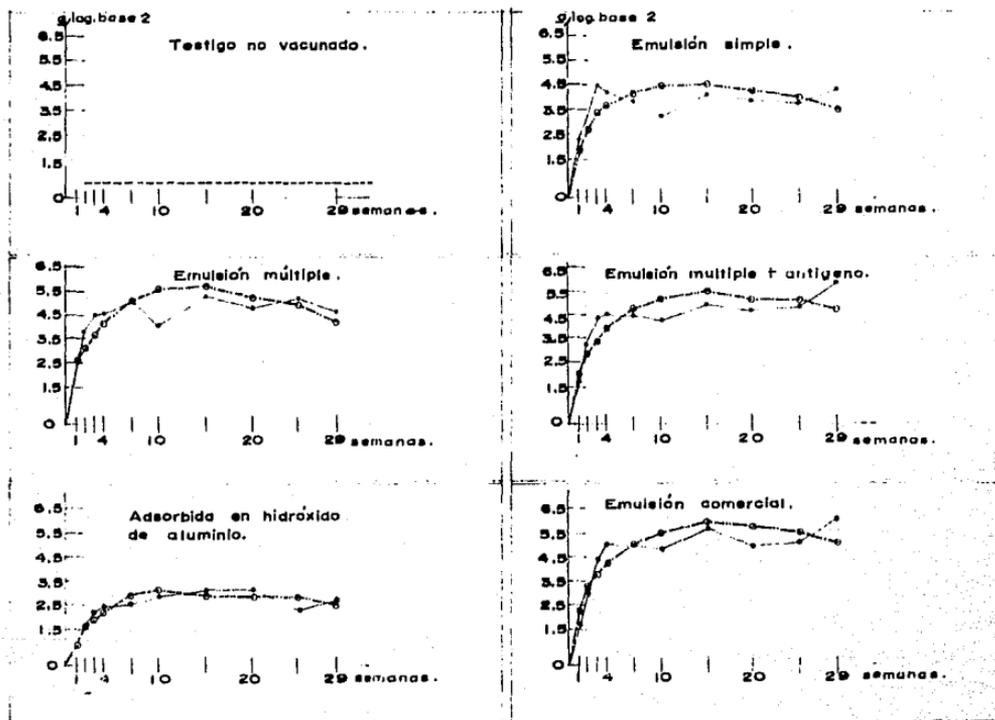


5/Log₂ de la dilución más alta capaz de inhibir 4UHA.

Gráfica 1.2 Títulos de inhibición de la hemoaglutinación en gallinas vacunadas contra el SBP'76 a las 26 semanas de edad.



Gráfica 1.3 Titulos de inhibición de la hemoaglutinación, en gallinas vacunadas contra el SBP'76 a las 26 semanas de edad.



$2/\log_2$ de la dilución más alta capaz de inhibir 4 UHA.

-----○----- Valores Observados.

-----●----- Modelo raíz cuadrada.

aceite (67,27,34). Si se compara los títulos de anticuerpos inducidos por la vacuna emulsionada múltiple y la múltiple + antígeno en su fase acuosa, se puede apreciar que ambas vacunas tuvieron un comportamiento semejante, a pesar de que se esperaba una respuesta inmune más alta en las primeras semanas postinmunización para la emulsión múltiple + antígeno, por la presencia del HP-1 en la fase externa de la emulsión, lo que puede sugerir por un lado que la cantidad de antígeno utilizada, no fue suficiente para inducir una buena respuesta inmune temprana; o sea, el antígeno fue catabolizado rápidamente; o bien, y de acuerdo con las observaciones realizadas por Stone y colaboradores (67), el utilizar un antígeno libre de adyuvante induce a una respuesta similar durante la primera semana postinmunización, que un antígeno emulsionado.

Además, si se comparan los títulos de anticuerpos inducidos por las vacunas emulsionadas (simple y comercial) con los títulos de las emulsiones múltiples, no se puede apreciar ninguna diferencia durante las semanas posteriores a la inmunización. Estos resultados difieren con la observación realizada por Herbert (33) al utilizar la ovoalbúmina en emulsión múltiple y en emulsión simple.

La vacuna adsorbida en hidróxido de aluminio, mostró desde el primer sangrado niveles bajos de anticuerpos, -- los cuales oscilaron entre 1.3 y 3.1, éste último se detectó en las semanas 16 y 20 después de la vacunación. En las siguientes semanas 26 y 29, se observó un ligero descenso hasta llegar a un título de 2.9. A pesar de que los niveles fueron bajos, éstos se mantuvieron en el transcurso de las 29 semanas, lo cual no coincide con otras investigaciones donde los niveles de anticuerpos descendieron antes de las 13 semanas postvacunación (27,68).

En el grupo control nunca se detectaron anticuerpos, lo que indica que las gallinas no entraron en contacto con un virus vivo durante el período experimental.

Por lo expuesto, se puede considerar que los niveles de anticuerpos más altos en esta etapa de la investigación, fueron detectados entre las 16 y 20 semanas postinmunización y que la inoculación del antígeno en emulsión, estimula altos y persistentes títulos de anticuerpos.

El análisis estadístico para los niveles de anticuerpos obtenidos en cada uno de los grupos sometidos al estudio, mostró que el modelo de regresión lineal raíz cuadrada fue el más adecuado ya que éste presentó un coeficiente de determinación superior al 90 por ciento en todos los casos, mientras que el modelo cuadrático mostró valores de R^2 entre 0.787 y 0.881, por lo que se seleccionó el modelo raíz cuadrada.

El valor estimado para los parámetros B_1 y B_2 , así como el coeficiente de determinación R^2 para cada una de las vacunas en estudio, se presenta en el Cuadro 1.3. Debe recordarse que el porcentaje de variación explicado, R^2 , cuyos valores están comprendidos entre $0 \leq R^2 \leq 1$; indica qué porción de la variación total en "Y" de la muestra, es explicada por la regresión de Y sobre "X" (24).

Nótese que el valor de R^2 más pequeño que se obtuvo con este modelo, fue de 0.931, el que corresponde a la vacuna emulsionada simple y el de mayor magnitud fue de 0.967, el que corresponde a la vacuna emulsionada doble. Por consiguiente, todas las observaciones están próximas a la curva de regresión, o sea, aproximadamente el 90 por ciento de la variación total de los Y_i es explicada por la regresión.

En el Cuadro 1.4, se ilustran las comparaciones entre las vacunas en estudio, a través de la técnica de variables binarias de Gujarati (31,32). En este modelo se utilizó la vacuna emulsión simple como referencia, es decir, cada una del resto de las vacunas se comparó contra ella.

Se puede apreciar que únicamente la vacuna adsorbida en hidróxido de aluminio, muestra diferencia significativa

Cuadro 1.3 Valor estimado para los parametros B_1 y B_2 y coeficiente de determinación R^2 .

	Modelos ajustados .	Coefficiente de determinación R^2 .
Grupo 2	Emulsión simple $\hat{Y}_i = -0.3605 X_i + 2.5777 X_i^{1/2}$ (0.0275) (0.1218)	0.931
Grupo 3	Emulsión doble $\hat{Y}_i = -0.3964 X_i + 2.9371 X_i^{1/2}$ (0.0219) (0.0971)	0.967
Grupo 4	Emulsión doble + antígeno en fase acuosa. $\hat{Y}_i = -0.3179 X_i + 2.6056 X_i^{1/2}$ (0.0223) (0.0988)	0.985
Grupo 5	Adsorbida en hidróxido de aluminio. $\hat{Y}_i = -0.1711 X_i + 1.4464 X_i^{1/2}$ (0.0162) (0.0720)	0.944
Grupo 6	Vacuna comercial . $\hat{Y}_i = -0.3390 X_i + 2.7961 X_i^{1/2}$ (0.0258) (0.1142)	0.960

Nota : Todos los coeficientes de regresión son altamente significativos, $P < 0.01$.

**Cuadro 1.4 Comparaciones de las vacunas en estudio.
Técnica de variables binarias de gujarati**

	Emulsion simple.	Emulsion múltiple.	Emulsion múltiple +antígeno.	Adsorbida en hidróxido de aluminio.	Emulsion comercial.
B ₁	-0.0815 (0.0033)	-0.0051 (0.0046)	0.0060 (0.0046)	0.0270 [⊕] (0.0046)	0.0030 (0.0046)
B ₂	0.974 (0.0386)	0.1358 [⊕] (0.0546)	0.0105 (0.0546)	-0.4276 [⊕] (0.0546)	0.0821 (0.0546)

Nota: ⊕ Significativo, P < 0.01

⊕⊕ Altamente significativo, P < 0.0001

tanto en el efecto de pendiente como en el de raíz cuadrada, $P < 0.0001$, mientras que la vacuna emulsionada múltiple, solo mostró una significancia, $P < 0.01$, en el efecto raíz cuadrada.

Como se puede observar, el comportamiento del resto de las vacunas fue similar; indicando que no existió diferencia entre la vacuna emulsión simple y una emulsión múltiple.

En lo que respecta a la comparación de las vacunas: emulsión simple y la emulsión múltiple + antígeno, se puede pensar que la adición de inmunógeno a la fase acuosa de la vacuna, no ejerció ningún efecto positivo en la respuesta temprana. Por consiguiente, se puede considerar que el comportamiento que se tuvo para cada una de las vacunas en relación a la emulsión simple fue similar a excepción de la vacuna adsorbida en hidróxido de aluminio, que indujo niveles de anticuerpos más bajos.

Los resultados obtenidos en el ajuste de los niveles de anticuerpos, utilizando el modelo de Nerlove, se presentan en el Cuadro 1.5.

En el citado cuadro se puede apreciar que el modelo propuesto presenta valores en su coeficiente de determinación, R^2 , altos, para cada una de las vacunas; el mínimo fue de 0.978, el que corresponde a la vacuna emulsión simple y el máximo fue de 0.998, el que correspondió a la vacuna adsorbida en hidróxido de aluminio. Estos valores de R^2 son más altos que los correspondientes obtenidos a los del modelo de raíz cuadrada (Capítulo 1, Cuadro 1.3), debido a la inclusión como variable independiente del valor anterior de niveles de anticuerpos, es decir, el nivel de anticuerpos en una ave es una función del tiempo y del valor de anticuerpos anterior. Esto indica que el nivel de anticuerpos en el organismo es un proceso dinámico. Este proceso se describe mejor a través de los valores del coeficiente de ajuste parcial, β , los cuales, son superiores a 0.9 ($P < 0.01$) para cada vacuna, así como para la emulsión comercial. Fue la vacuna emulsión simple la -

Cuadro 1.5 Valor estimado para los parámetros $\delta\beta_1, \delta\beta_2, 1-\delta, \delta, \beta_1, \beta_2$ y coeficiente de determinación.

	$\delta\beta_1$	$\delta\beta_2$	$1-\delta$	δ	β_1	β_2	R^2
Emulsión simple.	-0.3543 (0.0270)	2.5169 (0.1350)	0.0450 (0.0340)	0.955	-0.371 (0.0282)	2.635 (0.1392)	0.978
Emulsión múltiple.	-0.3943 (0.0219)	2.9063 (0.1074)	0.0228 (0.0255)	0.9772	-0.4034 (0.0224)	2.9741 (0.1099)	0.989
Emulsión múltiple +antígeno.	-0.3270 (0.0258)	2.6252 (0.1160)	0.0250 (0.0261)	0.975	-0.335 (0.0244)	2.6925 (0.1183)	0.986
Adeorbida en hidróxido de aluminio.	-0.1773 (0.0044)	1.4673 (0.0215)	0.0011 (0.0086)	0.998	-0.1778 (0.0044)	1.4702 (0.0215)	0.998
Emulsión comercial.	-0.3540 (0.0211)	2.8517 (0.1021)	0.0147 (0.0213)	0.985	-0.3593 (0.0214)	2.8951 (0.1056)	0.991

Nota: Todos los valores obtenidos para δ así como los coeficientes de regresión, son altamente significativos, $P < 0.01$.

que presentó el menor valor de ψ , 0.955 y la adsorbida en hidróxido de aluminio la que presentó el valor más alto, 0.998. Considerando que el coeficiente de ajuste parcial, ψ , puede presentar los valores en el intervalo $(0,1]$ y que un ψ igual a uno indica que el nivel de anticuerpos esperado (el cual no es observable), en cada período de tiempo; los resultados del modelo utilizado, sugieren que los niveles de anticuerpos inducidos por las diferentes presentaciones del agente hemaglutinante HP-1 y la vacuna comercial, fueron aproximadamente -- iguales a los niveles esperados, durante las 29 semanas de estudio.

Objetivamente, si se analizan los resultados obtenidos en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación expresados en las Gráficas 1.1, 1.2 y 1.3 del presente capítulo, que representan el promedio aritmético de los niveles de anticuerpos de 10 jaulas, se puede apreciar en alguna de las semanas, un comportamiento descendente en el título de anticuerpos, -- que al compararlo con los valores de ψ obtenidos en este modelo de Nerlove, se infiere que existe una alta capacidad de ajuste por el organismo animal, en un determinado período de tiempo; o sea, y tomando en consideración que

$$Y_t = \psi Y_t^* + (1 - \psi) Y_{t-1},$$

el nivel de anticuerpos observado en cada uno de los muestreos fue similar al nivel de anticuerpos esperado, no observados, en ese preciso momento por lo que Y_t se aproxima a Y_t^* y están poco relacionados con los niveles de anticuerpos observados -- en la semana anterior.

Para corroborar este resultado, se obtuvo la autocorrelación de primer orden r_1 , cuyo valor mínimo fue de 0.557 para la emulsión múltiple + antígeno, seguida por la emulsión múltiple cuyo valor fue de 0.569, mientras que para la emulsión comercial se obtuvo el valor de r_1 más alto de 0.627, seguido por la vacuna adsorbida en hidróxido de aluminio con --

0.615 y finalmente la emulsión simple con 0.579, lo cual está indicando que la autocorrelación entre los niveles de anticuerpos de una serie de observaciones ordenadas en el tiempo, es relativamente pequeña si se considera que $-1 \leq r \leq 1$.

Por consiguiente, el mencionado coeficiente confirma el efecto (1-3) que existe entre los niveles de anticuerpos obtenidos en la semana t-1, con los niveles observados en la semana t.

Estudio de los niveles de anticuerpos en el posdesafío

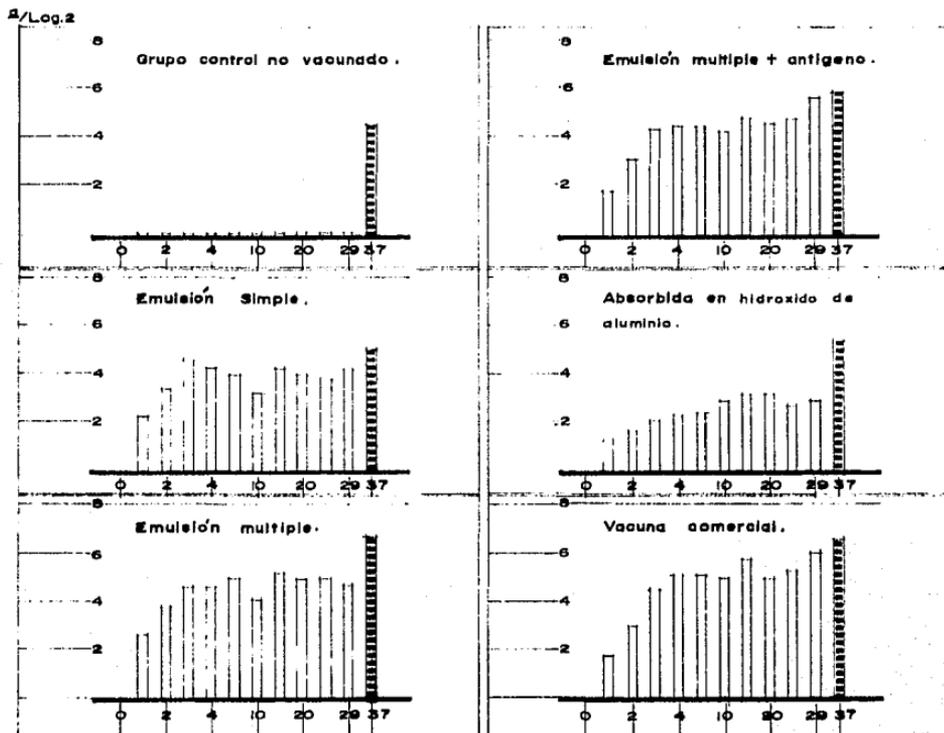
A las cuatro semanas de haber realizado el desafío a la parvada con el aislamiento hemoaglutinante MI-6, se realizó el último sangrado a las aves. Los resultados se encuentran expresados en la Gráfica 1.4.

Nótese que después de haberse realizado el desafío, existió un ligero aumento en los niveles de anticuerpos, si se compara con los resultados que se habían obtenido hasta las 29 semanas postinmunización.

El grupo testigo que no había mostrado anticuerpos en ninguno de los muestreos, alcanzó un título de 4.7; la emulsión simple presentó un aumento en los niveles de anticuerpos de un logaritmo, con respecto al último sangrado antes del desafío. La emulsión múltiple tuvo un incremento de dos logaritmos, mientras que la emulsión múltiple + antígeno, fue la vacuna que, junto con la emulsión comercial, permaneció prácticamente sin mostrar un alza significativa en los títulos de anticuerpos posdesafío.

Por otro lado, se puede observar que la vacuna adsorbida en hidróxido de aluminio, fue la que sufrió el mayor incremento en los títulos, debido probablemente al rápido catabolismo del antígeno si se compara con las vacunas emulsionadas que inducen a niveles de anticuerpos más altos y persistentes (27,67,68).

Gráfica 1.4 Títulos de inhibición de la hemoaglutinación ,
 en gallinas vacunadas a las 26 semanas contra el SBP.



2/Log. de la dilución más alta capaz de inhibir 4UHA.

Estos resultados, que se obtuvieron como consecuencia de haber realizado un desafío a las 33 semanas de estudio, pueden sugerir por un lado, que las vacunas elaboradas en esta investigación, no brindan una protección adecuada contra la infección y que el utilizar el hidróxido de aluminio como adyuvante en la respuesta inmune, no induce una protección -- tan sólida como las emulsiones, razón por la cual, el grupo -- cinco inmunizado con el citado adyuvante presentó un fuerte -- incremento en el título de anticuerpos después del desafío. -- Sin embargo es evidente que la respuesta anamnésica es adecuada, ya que se obtuvo una alza en los niveles de anticuerpos -- ante un segundo estímulo antigénico.

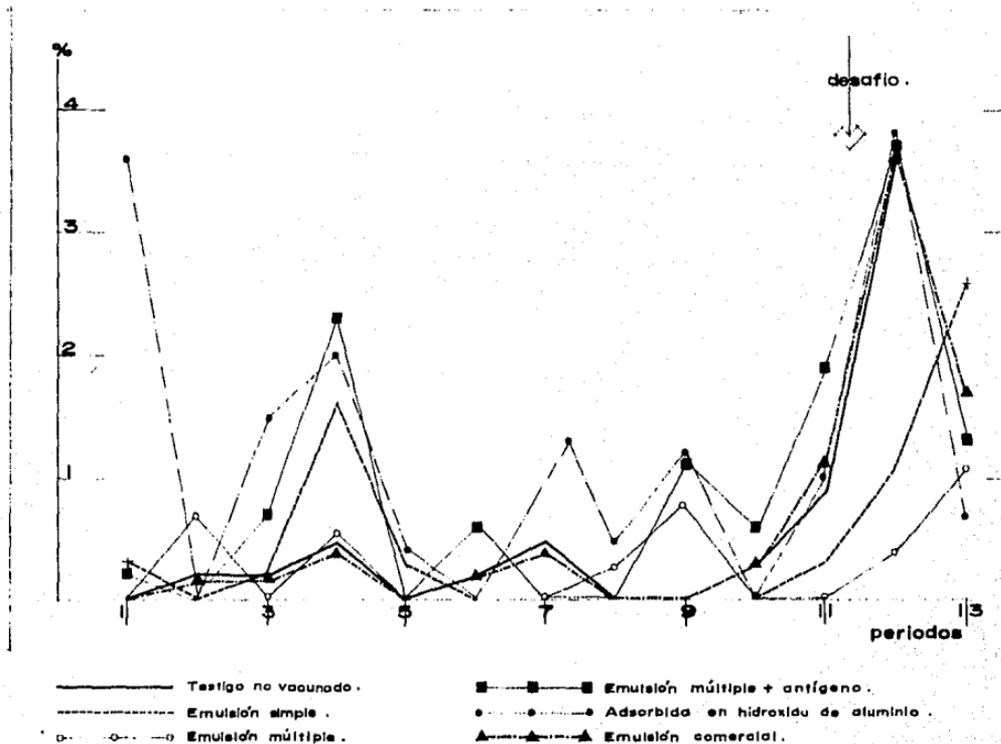
Estudio de la producción del huevo

El estudio de la producción del huevo, tuvo una duración total de 38 semanas; incluyendo las seis semanas de estudio posdesafío. Los resultados que se obtuvieron de las características externas del huevo, tales como: cascarrón roto, en fáfara, pérdida de color y cascarrón deforme, se encuentran expresadas en porcentajes semanales para cada grupo (Anexo 4, 5, 6, 7, 8 y 9).

Con la finalidad de simplificar el análisis de los resultados, las 38 semanas fueron divididas en 13 períodos de tres semanas cada uno. Por consiguiente, estos resultados representan la media general de cada tres semanas para el parámetro a discutir en las gráficas presentadas.

En la Gráfica 1.5, se expresan los resultados de -- cascarrón deforme, en la cual es posible observar que en el -- transcurso de las 33 semanas antes del desafío, no hubo cambios significativos. Sin embargo, se presentó una elevación en el número de cascarrones deformes en todos los grupos, después de haberse realizado el desafío con el aislamiento MI-6. El porcentaje alcanzado por el grupo vacunado con la emulsión múltiple + antígeno, fue de 3.76 siendo el valor más alto.

Gráfica 1.5 Porcentaje de huevo con cascarón deforme en los grupos de gallinas vacunadas o no, contra el SBP, antes y después del desafío.



Estos datos pueden indicar una falta de protección de las vacunas, debido al tiempo transcurrido entre la vacunación y el desafío. Por otro lado, es difícil asegurarlo pues durante el estudio hubo altibajos en el porcentaje de huevo con cascarón deforme. El grupo testigo no inmunizado, solo presentó un incremento de 2.63 por ciento.

En la Gráfica 1.6, donde se encuentran expresados los valores para la ausencia de cascarón (huevo en fáfara), podemos ver que ningún grupo tuvo un valor superior al dos por ciento, inclusive después del desafío.

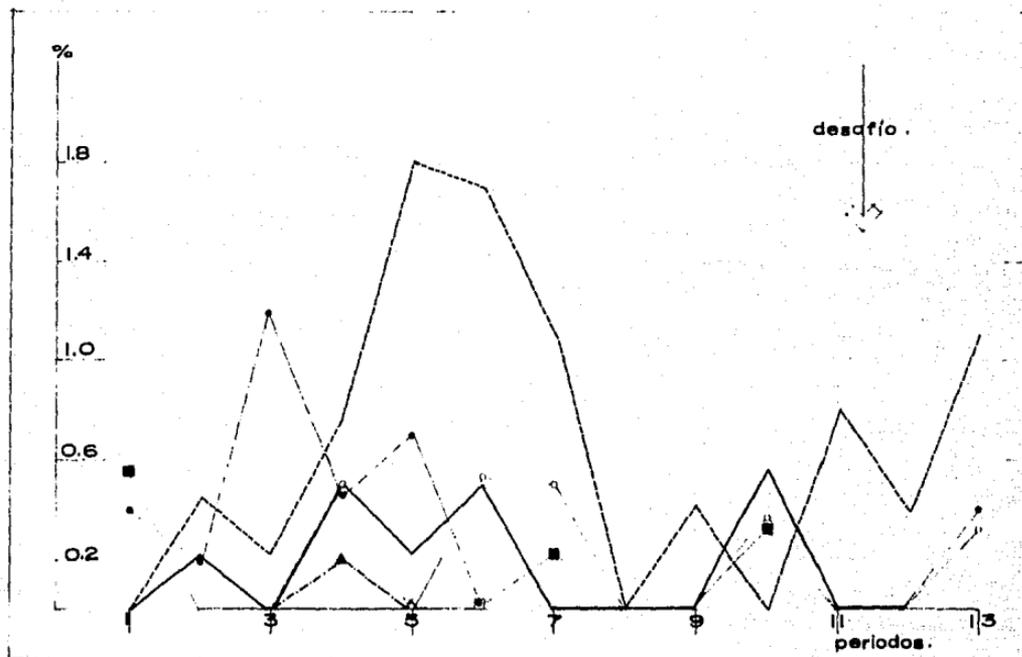
En la Gráfica 1.7, donde se representa la pérdida de color del cascarón, se puede observar que en el primer período de estudio (semanas cero, uno y dos) para los seis grupos, no hubo alteración en la pigmentación del cascarón, no así en el segundo período (semanas tres, cuatro y cinco) donde se presenta una elevación general en todos los grupos.

En los siguientes períodos, se presentan resultados homogéneos para los seis grupos, notándose una elevación en la etapa correspondiente al posdesafío, siendo el grupo testigo no vacunado, el más afectado.

En la Gráfica 1.8, donde se presentan los porcentajes de huevo roto, hubo una ligera elevación en la etapa posdesafío: primero en el grupo control y después en el grupo cuatro; sin embargo, los resultados que se obtuvieron no superaron el comportamiento observado en el predesafío.

Si se consideran los resultados obtenidos para las características externas del huevo, durante las primeras 33 semanas de estudio y especialmente la pérdida de color y la presencia de huevos rotos, podría pensarse que la parvada sufrió un brote de síndrome de la baja de postura; sin embargo, deben de considerarse algunos factores importantes como es el

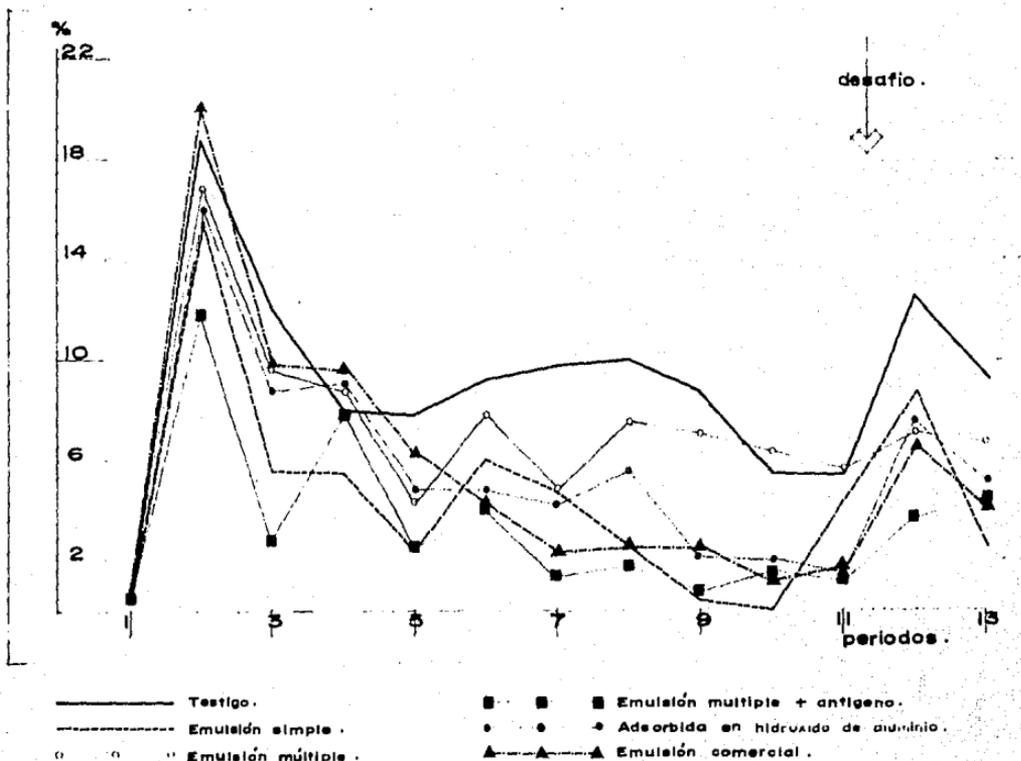
Gráfica 1.6 Porcentaje de huevo en fárfa, en los grupos de gallinas vacunadas o no, contra el SBP, antes y después del desafío.



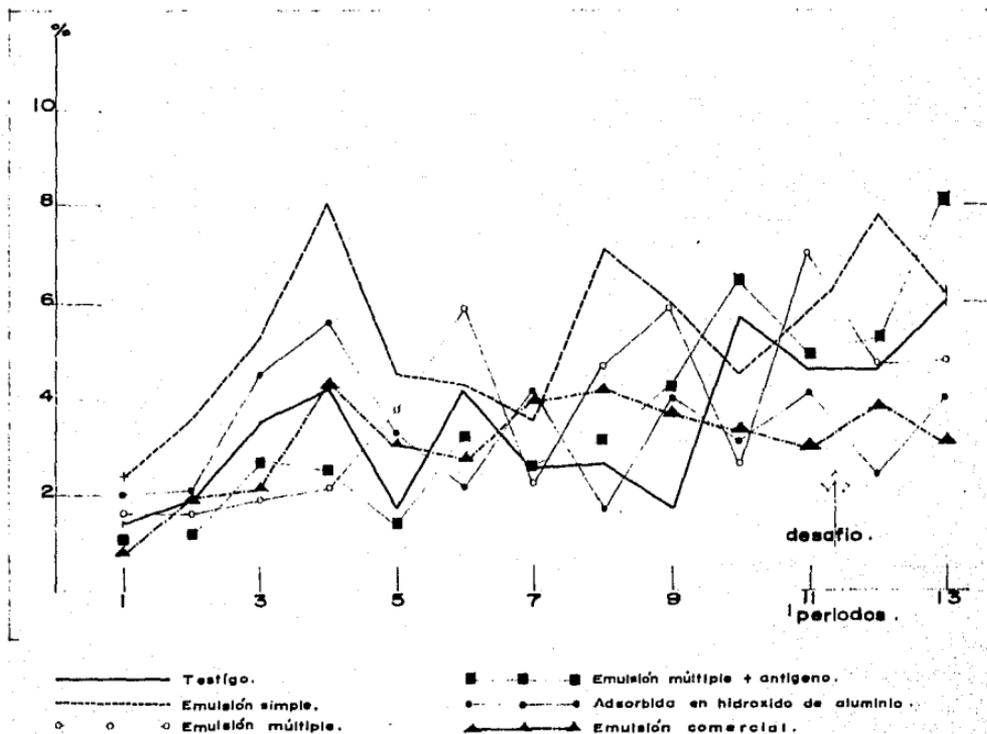
— Testigo.
 - - - Emulsión simple.
 . . . Emulsión múltiple.

■ ■ ■ Emulsión múltiple + antígeno.
 ● ● ● Adsorbida en hidróxido de aluminio.
 ▲ ▲ ▲ Emulsión comercial.

Gráfica 1.7 Porcentaje de huevos con pérdida de color en el cascarón, en los grupos de gallina vacunadas o no, contra el SBP, antes y después del desafío.



Gráfica 1.8 Porcentaje de huevos con cascarrón roto, en los grupos de gallinas vacunadas o no, contra el SBP, antes y después del desafío.



hecho de no haber detectado niveles de anticuerpos a través de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación en el grupo testigo, antes de realizarse el desafío, como ya se había indicado en el estudio de la respuesta inmune de este capítulo.

Otro factor que debe de considerarse, es el hecho de que existieron problemas con el suministro de alimento debido a que el experimento se realizó utilizando varias partidas de alimento, y no con una sola, coincidiendo los cambios de alimentación con las alzas en el porcentaje del huevo roto y la pérdida de color.

Es sabido que cualquier estado de tensión en una parvada, determina la producción de huevos con cascarón rugoso y delgado (48,57,59,64), lo que debe de tenerse presente, ya que en el transcurso de esta etapa de la investigación las aves estuvieron sometidas a un fuerte manejo, debido principalmente a los diversos sangrados que se realizaron y en menor grado, por fallas en el suministro de agua y la parasitosis externa que sufrieron durante las primeras cinco semanas de estudio, siendo estos factores los que en la práctica de campo, ocasionan bajas en la producción del huevo *.

En la etapa posdesafío, la elevación que se presentó principalmente en los porcentajes de cascarón deforme y pérdida de color, pueden indicar junto con la elevación obtenida en el título de los niveles de anticuerpos en todos los grupos, una cierta susceptibilidad en la parvada por el virus del síndrome de la baja de postura.

Para resumir esta información, el Cuadro 1.6 presenta la eficiencia productiva en la etapa pre y posdesafío, para cada uno de los grupos en estudio. Nótese que los valores obtenidos para la diferencia en porcentajes entre el huevo sa

*Romano, J.J. Comunicación personal (1984).

Cuadro 1.6 Eficiencia productiva en la etapa pre. y posdesafío.

Grupo.	P r e d e s a f i o .					P o s d e s a f i o .				
	Aves	Huevo total	Huevo sano	Dif.	Dif.	Huevo total	Huevo sano.	Dif.	Dif.	Aves.
	encasetadas	/ave	/ave	absoluta.	porcentaje.	/ave	/ave	absoluta.	porcentaje.	encasetadas
	encasetada	encasetada	encasetada			encasetada	encasetada.			
Testigo no inmunizado.	31	129.6	113.5	16.1	12.4	19.2	15.7	3.5	18.2	27
Emulsión simple.	31	121.3	108.5	12.8	10.5	16.9	14.5	2.4	14.2	24
Emulsión múltiple.	30	144.6	128.4	16.2	11.2	23.9	21.0	2.9	12.1	26
Emulsión múltiple + antígeno.	31	146.9	135.6	11.3	7.6	20.7	17.9	2.8	13.5	30
Adsorbida en hidróxido de aluminio.	30	141.3	127.4	13.9	9.8	20.5	18.0	2.5	12.1	27
Emulsión comercial.	32	148.6	136.1	13.5	9.0	20.6	18.2	2.4	11.6	29

no y el huevo total por ave encasetada, es similar en los seis grupos antes del desafío. Después de realizar el desafío, puede notarse que los grupos inmunizados con la vacuna emulsionada simple, múltiple, adsorbida en hidróxido de aluminio y emulsionada comercial, siguen presentando resultados homogéneos; sin embargo, el Grupo 1 no vacunado y el Grupo 4 (emulsión múltiple + antígeno), mostraron un incremento considerable en el porcentaje de huevos alterados hasta de un 5.8 por ciento.

Otro valor utilizado para determinar la calidad del cascarón, fue la prueba de Gravedad Específica (GE), basada en el concepto de que a mayor grosor tenga el cascarón, mayor densidad tiene el huevo (57).

Los valores de GE que se obtuvieron durante el estudio de la calidad externa del huevo, tanto en la etapa pre-desafío como en la de posdesafío para los seis grupos, osciló entre 1.096 y 1.100, lo que equivale a una puntuación de 7 y 8 respectivamente dentro de una escala del cero al ocho, en el método descrito por Marble, citado por Quintana (57).

Por lo tanto, y con base en los resultados que se lograron; se puede considerar que no hubo un cambio en la calidad externa del huevo para ningún grupo, aún después del desafío.

Calidad interna del huevo

La calidad interna del huevo, fue estudiada por el método de Unidades Haugh, el cual relaciona el peso en gramos de doce huevos y la altura de la albúmina, expresada en milímetros (19,57).

Los resultados obtenidos tanto en las semanas antes de realizar el desafío como en las de posdesafío, estuvieron entre 56 y 82 UH, lo que sugiere que la calidad interna del huevo, no se vio afectada, ya que se considera que los valores superiores a 55 UH, indican huevos de buena calidad.

Capítulo 2.

Infectividad y transmisión del agente hemoaglutinante MI-6

Entre las características económicas más importantes del síndrome de la baja de postura (SBP), se encuentran las alteraciones externas e internas que éste ocasiona en la producción del huevo (4,7,8,11,46,62,74,78). De ellas se pueden citar: presencia de cascarones débiles hasta llegar a la ausencia completa del mismo y la pérdida de color (3,4,6,7,8,11,46,47,62,69,74), así como un descenso en la viscosidad de la albúmina acompañado de alteraciones en la fertilidad e incubabilidad (25).

En cuanto a la transmisión del virus del síndrome de la baja de postura (VSBP), se ha encontrado que la principal forma de difundirse de una parvada a otra, es a través de la vía vertical, haciendo posible la persistencia del virus dentro de la población avícola (10,45).

Por otro lado, se reporta que la transmisión horizontal entre las gallinas es mínima o casi nula (3,10,62,73,78), siendo más difícil esta transmisión de una granja a otra (3,83).

En México, hay quienes han observado clínicamente que parvadas hermanas alojadas en diferentes lugares, se comportan en forma distinta, presentando algunas el SBP y otras no, lo cual nos hace pensar que puede haber una forma de transmisión diferente en estos casos o que el virus presente en México, tiene mayor facilidad de transmisión horizontal *.

* Pineda, P., L. Comunicación personal (1983).

El objetivo de este experimento fue el de determinar la capacidad que el agente hemoaglutinante MI-6 tiene para difundirse horizontalmente en un grupo de aves ponedoras - de la estirpe Babcock B-380. Así como también, reevaluar el efecto que tiene sobre la producción del huevo, estimando de esta manera su patogenicidad.

Materiales y Métodos

Aves experimentales

Se trabajó con 40 gallinas ponedoras, Babcock B-380, de 26 semanas de edad. Las aves estaban inmunizadas contra la enfermedad de Marek, laringotraqueitis infecciosa, viruela aviaria, enfermedad de Newcastle y encefalomielititis aviar, pero libres de anticuerpos contra el VSBP.

Prácticas de manejo

La parvada fue dividida al azar en dos grupos de -- 20 gallinas cada uno. El primer grupo de gallinas se inoculó con $10^{5.7}$ dosis infectante embrión de pato 50 por ciento por ave (DIEPa₅₀ por ciento/ave), mientras que el segundo lote se conservó como testigo no inoculado.

Las gallinas se alojaron a razón de tres aves por -- jaula, colocando los dos grupos en el mismo cuarto de aislam-- miento y estuvieron separadas únicamente por la malla de alam-- bre de las jaulas.

Se suministró alimento para ponedoras, elaborado en el Centro de Enseñanza Investigación y Extensión Avícola y -- Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia -- de la Universidad Nacional Autónoma de México. El alimento -- fue servido diariamente calculándose 115 gramos por ave.

La recolección del huevo se hizo diariamente, eva-- luándose la calidad interna y externa del mismo a través de -- las pruebas de Unidades Haugh (UH) y Gravedad Específica (GE) respectivamente, según se señaló en el Capítulo 1 (página 20).

Multiplicación del aislamiento hemoaglutinante MI-6

Se llevó a cabo según se describió en el Capítulo 1 (página 14).

Determinación de anticuerpos contra el VSBP

La parvada fue sangrada antes de realizarse la inoculación y a la 1,2,3,4,7 y 10^a semana postinoculación, usando el suero obtenido para la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH).

Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH)

Se realizó siguiendo la metodología que se describió en el Capítulo 1 (página 19).

Resultados y Discusión

Multiplicación del agente hemoaglutinante MI-6

De manera similar que en el capítulo anterior, el líquido amniótico (LAA) de los embriones de pato que fueron utilizados como testigo, no presentó hemoaglutinación, después de haberle realizado tres pases ciegos en embriones, lo que indica que, si hubo virus presente en los embriones antes de la inoculación, era en pocos embriones.

Prueba de inhibición de la hemoaglutinación

Los títulos de anticuerpos obtenidos en este estudio, se encuentran expresados en el Cuadro 2.1.

Nótese que el resultado del sangrado control antes de realizarse la inoculación, fue negativo para ambos lotes. A la semana postinoculación, únicamente el grupo 1 tuvo un título de 2.3. El lote testigo no desarrolló anticuerpos y permaneció negativo durante el estudio. En el transcurso de las semanas, en el lote inoculado los niveles de anticuerpos continuaron elevándose alcanzando el título más alto de 5.2, en la semana siete postinoculación.

Por consiguiente, al no detectarse anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación, dentro del grupo de aves no inoculadas con el agente MI-6, se infiere que el mencionado agente no se difunde en forma horizontal dentro de una parvada de aves de postura.

Los resultados en este estudio, son semejantes a las observaciones que sobre la epidemiología de la enfermedad, han realizado algunos investigadores (20). Sin embargo, existen autores que han encontrado una difusión lenta de jaula a jaula dentro de una misma caseta, cuando hay aves en la etapa inicial de la enfermedad; o bien, una transmisión horizontal

Cuadro 2.1 Título de la inhibición de la hemoaglutinación, en gallinas ponedoras Babcock B-380, inoculadas con el aislamiento MI-6.

Nivel de anticuerpos A/Log ₂ .			
Sangrado	Semanas Postinoculación	Lote 1	Lote 2
Control.	0	0 ²	0 ²
1	1	2.3	0
2	2	3.4	0
3	3	4.0	0
4	4	5.1	0
5	7	5.2	0
6	10	5.2	0

A/Log₂ de la dilución más alta capaz de inhibir 4 unidades hemoaglutinantes.
 g promedio de 20 gallinas.

muy rápida cuando la parvada se encuentra en el máximo de su postura (22).

En general, se ha considerado que la difusión lateral del virus puede ocurrir, aunque en forma muy limitada --- (11,12,46,83).

Estudio de la producción del huevo

En los Cuadros 2.2 y 2.3, se expresan los resultados obtenidos en el estudio de la producción del huevo, tanto para el lote control no inoculado, como para el grupo de aves inoculadas con el agente hemoaglutinante MI-6.

En lo que respecta al porcentaje de producción gallina-día; ambos grupos presentaron un comportamiento similar durante las 10 semanas de estudio. Se observó un ligero descenso en la producción durante la cuarta, quinta y sexta semana postinoculación, sin que dicha baja coincidiera con una disminución en la calidad externa e interna del huevo.

En el análisis de las características externas del huevo, tales como: huevo roto, deforme, en fáfara y pérdida de color, se puede apreciar que la presencia de huevo deforme y en fáfara fue prácticamente nula para ambos lotes.

En relación a la pérdida de color que se obtuvo en el lote inoculado, el porcentaje que se presentó fue muy bajo, inclusive durante cuatro semanas no se detectó ninguna alteración en el color del cascarón. Sin embargo, en el lote testigo si se presentaron porcentajes relativamente altos, lo que no puede interpretarse como consecuencia de una infección por el VSBP, ya que durante las 10 semanas que se realizó el experimento, no se detectaron anticuerpos para el lote testigo no inoculado.

La presencia de huevo roto fue la más evidente en este estudio, sin que pueda atribuirse a la enfermedad, ya que fue similar en ambos grupos.

Cuadro 2.2 Estudio de la producción del huevo.

Lote 1 - control no inoculado.

Producción gallina-día. (porcentaje).	Semanas postinoculación.										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	56.6	57.9	65.9	51.6	44.1	43.6	61.1	64.3	62.0	61.9	
Características externas del huevo. (porcentaje).											
	roto	9.3	13.0	9.6	12.3	16.3	6.4	3.9	7.4	6.3	10.2
	deforme	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	2.6
	en fátana	0.0	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	perdida de color.	4.6	9.1	9.6	10.2	7.0	6.4	6.5	13.6	6.3	14.1

Cuadro 2.3 Estudio de la producción del huevo.

Lote 2 - inoculado.

		Semanas postinoculación.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Producción	gallina-día.										
	(porcentaje).	58.7	60.0	54.3	36.4	31.4	32.9	49.3	55.7	54.3	52.8
Características externas del huevo. (porcentaje).											
	roto	8.5	16.7	11.8	13.7	4.5	6.5	7.2	19.2	14.5	10.6
	deforme	0.0	0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	1.3	1.3
	en farfana	4.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	perdida de color	4.2	0.0	0.0	0.0	0.0	2.2	1.4	6.4	5.3	5.4

Estos resultados en las características externas -- del huevo, se pueden atribuir a fallas en el manejo de la parvada tales como: poca ventilación dentro del cuarto de aislamiento, irregularidades en el suministro de agua y alimento - y, sobre todo, a la tensión sufrida por la parvada debido a - la obtención de muestras sanguíneas, de cada una de las aves en forma periódica.

Estos datos son diferentes a los logrados por algunos investigadores, los cuales han observado baja de postura de seis a 17 porciento acompañada de alteraciones externas -- del huevo (23,80).

En el estudio del grosor del cascarón mediante el método de Gravedad Específica, la densidad que se obtuvo osciló entre 1.096 y 1.100, mientras que la calidad interna del - huevo, determinada por medio de Unidades Haugh, estuvo entre 56 y 82 UH. Ambos resultados sugieren que la calidad interna y externa del huevo no se vio afectada en el lote inoculado - ni en el grupo control no inoculado. Estos datos son similares a los obtenidos en el Capítulo 1 de esta investigación y a las observaciones hechas por House y colaboradores al inocular un adenovirus aislado de patos en gallinas de postura - White Leghorn donde la calidad interna del huevo no se vio afectada (36).

Considerando los resultados obtenidos en el Capítulo 1, al utilizar el aislamiento MI-6 para comprobar la efectividad de las vacunas inactivadas y emulsionadas así como la adsorbida en hidróxido de aluminio, aunado a los datos obtenidos en el presente capítulo, hacen pensar que el aislamiento hemoaglutinante MI-6, posee baja o nula patogenicidad.

Debe de tenerse presente que se trabajó con un número relativamente pequeño de aves, lo cual constituye un factor decisivo en los resultados logrados, tanto en la capacidad que el agente MI-6 tiene para difundirse horizontalmente, como en el efecto que ocasiona sobre la producción del huevo.

Capítulo 3.

Lesiones del oviducto de gallinas inoculadas con el agente -- hemoaglutinante MI-6

La sintomatología que caracteriza al síndrome de la baja de postura (SBP), es una alteración en la producción del huevo, misma que ha sido asociada al momento en el cual se -- produce la infección en la parvada (22).

Aparte de los posibles problemas en la calidad externa e interna del huevo como son: pérdida de color, fragilidad del cascarón, presencia de huevo en fáfara y alteraciones de la albúmina (4,6,7,8,11,46,62,74), la enfermedad puede transcurrir sin manifestaciones, de tal forma que la parvada puede observarse sana (12,46). En el examen posmortem, no -- existe ningún cambio macroscópico que sea de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad, mientras que al examen microscópico es posible el hallazgo de ciertos cambios en las diferentes - regiones del oviducto, que pueden orientar a un diagnóstico - presuntivo (3,30,53,69). El virus del síndrome de la baja de postura (VSBP), puede ocasionar una severa degeneración y des- camación de las células epiteliales, atrofia de glándulas ute- rinas con una marcada infiltración de heterófilos , linfociti- tos y células plasmáticas, todo ello acompañado de edema del oviducto. También puede haber formación de cuerpos de inclu- sión en las células epiteliales del útero, istmo y región --- glandular de la vagina (69).

Es de suponer que la gravedad de las lesiones pro- ducidas por el VSBP, está relacionada con la severidad en el descenso de la producción y los cambios en la calidad interna y externa del huevo, ya que los mayores cambios en la calidad del huevo fueron encontrados con cepas que producen lesiones severas (69); por otro lado, la capacidad para prevenir las - lesiones histológicas, puede ser un parámetro más objetivo pa

ra evaluar la calidad de las vacunas contra el SBP, las que - hasta la fecha, se evalúan solo por su capacidad para inducir anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y para prevenir la presentación clínica de la enfermedad (9,51,52,55).

La capacidad para inducir anticuerpos inhibidores - de la hemoaglutinación, es un indicador de la calidad de la - vacuna, pero no asegura que protegerán contra la enfermedad, - mientras que la evaluación clínica de la protección es diff-- cil, a menos que se use un gran número de animales.

El propósito de este trabajo, fue determinar la capacidad que el aislamiento hemoaglutinante MI-6 tiene, para producir cambios en el oviducto de gallinas ponedoras Babcock B-380, con el objeto de utilizarlos como parámetros de su patogenicidad ; y de resultar patógeno, desarrollar una prueba para la constatación de la protección conferida por las vacunas contra el síndrome de la baja de postura.

Materiales y Métodos

Aves experimentales

Para la realización de este estudio, se trabajó con un lote de 40 aves de 35 semanas de edad, de la estirpe Babcock B-380, libres de anticuerpos contra el VSBP e inmunizadas contra la enfermedad de Newcastle, laringotraqueitis infecciosa, viruela aviaria, enfermedad de Marek y encefalomyelitis aviaria.

Prácticas de manejo

La parvada fue dividida al azar en dos grupos experimentales; al grupo A se le consideró como lote testigo no inoculado, formado por 10 aves. El grupo B, constituido por 30 aves, fue el lote inoculado con el agente hemoaglutinante MI-6.

Ambos grupos fueron alojados en cuartos diferentes con ventilación positiva, a razón de tres aves por jaula.

El alimento para ponedoras, suministrado a razón de 115 gramos por ave por día, fue elaborado en el Centro de Enseñanza Investigación y Extensión Avícola y Cunicola y Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Réplica del agente hemoaglutinante MI-6

Se inocularon 0.2 ml del aislamiento MI-6 en la cavidad alantoidea de embriones de pato comercial, de la estirpe Pekín blanco. Después de seis días de incubación a 37°C, se cosechó el líquido amnioalantoideo (LAA), procediendo después a la titulación del mismo, por medio de la prueba de hemoaglutinación viral (HA), descrita en el Capítulo 1 (página 14).

Como testigos, se inocularon tres embriones de pato con caldo nutritivo, usando su LAA para dar tres pases ciegos.

A los ocho días de haber sido alojadas las parvadas, se procedió a realizar la inoculación de las aves del grupo B, con $10^{5.7}$ dosis infectante embrión de pato 50 por ciento por ave (DIEPa₅₀ por ciento/ave) del agente MI-6 por vía ocular.

Sacrificio y Recolección de muestras

Antes de inocular a las gallinas del grupo B, se sacrificaron cuatro aves del grupo control como testigos de la prueba. A los 6,10,14,20,24 y 28 días postinoculación; se seleccionaron en forma aleatoria cinco aves del grupo inoculado y una del lote control. A estas gallinas se les sangró para realizar la prueba de inhibición de la hemoaglutinación con el suero obtenido. Posteriormente se realizó la necropsia en forma detallada y se recolectó una muestra de infundíbulo, --itsmo, magnum, útero y vagina en cada ave. Todos los tejidos fueron fijados en formol al 10 por ciento, embebidos en parafina y cortados a cinco micras de espesor para ser teñidos con hamatoxilina y eosina (40).

Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH)

Se realizó siguiendo la técnica descrita por Villegas (75).

Resultados y Discusión

Réplica del agente hemoaglutinante MI-6

A los seis días de haberse inoculado el aislamiento MI-6 en la cavidad alantoidea de embriones de pato comercial, Pekín blanco, se cosechó el LAA. Este presentó un título de 640 unidades hemoaglutinantes (UHA).

El LAA de los embriones testigos inoculados con caldo nutritivo, no presentó título hemoaglutinante después de realizar los tres pases ciegos, lo que viene a reducir las posibilidades de que el inóculo se haya contaminado con el adenovirus de patos. A pesar de esto, debe de tenerse presente que se trabajó con embriones de pato procedentes de una granja infectada (28).

Prueba de inhibición de la hemoaglutinación

Los resultados obtenidos en esta prueba, se encuentran expresados en el Cuadro 3.1.

Las aves testigo pertenecientes al Grupo A, no mostraron anticuerpos contra el VSBP durante el estudio. El lote B presentó un título de anticuerpos de 2.2 en el primer muestreo, los cuales siguieron en aumento hasta alcanzar un nivel de 5.0 a los 28 días de la inoculación.

Examen posmortem

En el examen a la necropsia no se encontró ningún cambio macroscópico en las aves testigo ni en las aves inoculadas con el aislamiento MI-6.

Al estudio microscópico de las diferentes regiones del oviducto, en las cuatro aves del grupo control, se observó edema e infiltrado linfocitario en la zona correspondiente a infundíbulo y útero, mientras que en magnum, itsmo y vagina, no se encontró ninguna alteración microscópica. En los si---

Cuadro 3.1 Titulos de la inhibición de la hemoaglutinacion, en gallinas ponedoras Babcock B-380, inoculadas con el aislamiento MI-6.

Días postdesafío	Nivel de anticuerpos A/Log ₂ .	
	Lote A.	Lote B.
0	0 ^{b/}	0 ^{c/}
6	0 ^{d/}	2.2
10	0 ^{d/}	3.6
14	0 ^{d/}	4.7
20	0 ^{d/}	4.9
24	0 ^{d/}	4.9
28	0 ^{d/}	5.0

A/Log₂ de la dilución más alta capaz de inhibir 4UHA.

^{b/} promedio de cuatro gallinas.

^{c/} promedio de cinco gallinas.

^{d/} una gallina del 6^º al 28^º día postinoculación.

guientes muestreos, se siguieron observando las mismas lesiones en infundíbulo y útero, tanto en las aves control como en las infectadas y sacrificadas a los 6,10,14,20,24 y 28 días - postinoculación. La presencia de focos linfocitarios o la infiltración de células inflamatorias, heterófilos y células mononucleares en la lámina propia del útero, así como el edema y la atrofia glandular, han sido los hallazgos histopatológicos en aves control de algunas investigaciones, en donde los autores han establecido la diferencia con las lesiones presentadas en las aves inoculadas, por el grado de severidad en las mismas (26,63).

Sin embargo, en este estudio no se encontró diferencia alguna entre las lesiones en el oviducto del grupo control y el inoculado.

Por consiguiente y tomando en consideración que no se detectaron anticuerpos contra el VSBP en el lote control, - los resultados obtenidos al estudio de las diferentes regiones del oviducto, indican que el aislamiento hemoaglutinante MI-6, no es capaz de ocasionar cambios microscópicos en el oviducto, lo que indica que dicho aislamiento, es de baja patogenicidad, a diferencia de los resultados que obtuvieron algunos investigadores en el estudio de la patogenicidad del adenovirus JPA-1, aislado en el Japón (69).

Los resultados descartan la posibilidad de usar el aislamiento MI-6 como desafío en la constatación de la protección conferida por vacunas contra el SBP. Su baja patogenicidad podría llevarnos a pensar que es un virus adecuado para ser usado como vacuna a virus vivo, pero debemos recordar que existe el peligro de que este virus aumente su patogenicidad a través de pases en gallinas, como sucedió con el agente aislado por Villegas (77).

Capítulo 4.

Algunas pruebas para la caracterización de los agentes hemoaglutinantes HP-1 y MI-6

El síndrome de la baja de postura (SBP), caracterizado por las bajas que ocasiona en la producción y por las alteraciones en la calidad externa e interna del huevo (4,6,7,8,11,17,46,62,74), afecta primordialmente gallinas reproductoras pesadas y ponedoras comerciales (4,45,46,58).

El agente etiológico de la enfermedad, es un adenovirus con características diferentes al resto de los adenovirus aviáres, ya que éste es capaz de hemoaglutinar glóbulos rojos de aves (1,6,11). Las cepas BC-14 y 127 aisladas por Baxendale en Gran Bretaña y McFerran en Irlanda del Norte, -- respectivamente, han sido propuestas como los prototipos de esta enfermedad (6,7,10,45).

Entre las características físico-químicas que la literatura menciona para el nuevo grupo de adenovirus aviáres, están su capacidad de crecimiento en varios tipos de tejidos celulares como son riñón de pato, fibroblastos de embrión de pollo y pato y células hepáticas (1,6,11,46,47,83), ocasionando un efecto citopático caracterizado por la presencia de células refráctiles, redondas con inclusiones basófilas (1,6,11,47,79). En algunas ocasiones deben de realizarse pases ciegos previos a la observación del mencionado efecto citopático --- (73,79). El virus presenta resistencia al cloroformo, es termorresistente y estable en solventes orgánicos así como a un pH de 3.0. Su crecimiento se ve inhibido con la enzima 5-fluoruro-2-deoxyuridina, indicando la presencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) (1,47,79,81,83).

El objetivo de este capítulo, fue el de llevar a --
cabo la tipificación viral del agente hemoaglutinante HP-1, -
aislado de patos (28) y del MI-6, aislado de una parvada de -
gallinas ponedoras que presentaba un cuadro clínico que hizo
sospechar del síndrome de la baja de postura; así como tam---
bién el llevar a cabo la multiplicación del agente HP-1 en --
embriones de pollo libres de patógenos específicos (SPF), con
la finalidad de reducir los costos de producción en la elabo-
ración futura de vacunas a virus muerto y emulsionadas.

Materiales y Métodos

Prueba de hemoaglutinación con glóbulos rojos de diferentes especies

Esta prueba se realizó únicamente para el aislamiento MI-6. Se utilizaron eritrocitos de gallina, pato, pavo, faisán, ganso, vaca, caballo, cerdo y perro al dos por ciento y los antígenos MI-6, K-11, virus de la enfermedad de Newcastle (VENC) (Cepa La Sota) y virus de la influenza aviaria (VIA), así como solución salina fosfatada (SSF) y líquido amniótico (LAA) no infectado.

Prueba de hemoaglutinación (HA) e inhibición de la hemoaglutinación (IH), para los aislamientos HP-1 y MI-6

La prueba de HA e IH con el adenovirus 127, fue realizada en los Estados Unidos por el Dr. Dardiri, jefe del Laboratorio de Diagnóstico del Centro de Enfermedades Animales de la Región Noroeste de Plum Island, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

Réplica del aislamiento HP-1 en embriones de pollo SPF

Para llevar a cabo la réplica del agente hemoaglutinante HP-1 en embriones de pollo SPF, se trabajó con dos vías de inoculación: saco vitelino y cavidad alantoidea en embriones de seis y diez días de edad respectivamente.

En ambos casos, se inocularon 0.02 ml del aislamiento HP-1. Los embriones fueron dejados en incubación a 37°C por espacio de seis días, procediendo después a la cosecha del saco vitelino y del líquido amniótico. Empleando la prueba de hemoaglutinación viral en microplaca con diluciones de 1:5, 1:10, etc., se determinó la presencia de hemoaglutinas en el contenido del saco vitelino y en el LAA.

De inmediato se procedió a realizar un nuevo pase en los embriones SPF.

La prueba se repitió cuatro veces con tres pases -- ciegos en cada repetición.

Crecimiento de los aislamientos HP-1 y MI-6, en cultivos celulares

Las células que se emplearon fueron: fibroblastos - de embrión de pollo (FEPO), fibroblastos de embrión de pato - (FEPA) de embriones comerciales de 11 días de edad y células renales (CREPO) de embriones de pollo SPF de 19 días de edad.

La elaboración de los cultivos se hizo siguiendo la técnica descrita por Villegas (76).

Se llevaron a cabo diluciones decimales desde 10^{-1} hasta 10^{-10} , para cada uno de los aislamientos, de las cuales 0.5 ml de cada dilución fue inoculada en una monocapa de cultivo celular y dejada a temperatura ambiente por 30 minutos, para permitir la adsorción del virus. Posteriormente se retiró el inóculo y se procedió a cubrir las células con medio de mantenimiento.

Las cajas fueron incubadas a 37°C durante seis días y observadas diariamente para el efecto citopático.

Al finalizar los seis días de incubación, cada una de las diluciones fue titulada para determinar la presencia - de hemoaglutininas y preservadas después en congelación a --- -70°C .

Se realizó un total de tres pases para cada una de las diluciones de los dos inóculos, procediendo al congela--- miento y descongelamiento de las células, antes de emplearlas para el siguiente pase.

En las células renales, únicamente se realizó un -- pase.

Determinación del tamaño de las partículas virales

El tamaño de las partículas virales, fue determinado por medio de microscopía electrónica, observando en un microscopio JEOL JEM-100 S * a 60 Kv, para lo que se empleó la técnica de tinción negativa.

El LAA infectado con el aislamiento HP-1 o MI-6, -- fue centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 10,000 rpm para sedimentar el material celular extraño. El líquido sobrenadante se recolectó y se volvió a centrifugar durante tres horas a 20,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en una pequeña cantidad de acetato de amonio al uno por ciento, para ser montado en rejillas de carbono; sobre las que se tiñó con ácido fosfotúngstico al dos por ciento.

* División Hoffman Pinter, México D.F.

Resultados y Discusión

Prueba de hemoaglutinación con glóbulos rojos de diferentes especies

Los resultados de esta prueba de hemoaglutinación en placa, son semejantes a los mencionados en la literatura (6,11,46) y a los obtenidos por García con el aislamiento de pato HP-1 (28) (Cuadro 4.1), ya que el agente MI-6 solo aglutinó glóbulos rojos de origen aviar.

Prueba de hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación para los aislamientos HP-1 y MI-6

El Laboratorio de Diagnóstico del Centro de Enfermedades Animales de la Región Noreste de Plum Island, encontró que un suero positivo contra el adenovirus 127 del síndrome de la baja de postura, tuvo un título inhibitorio de la hemoaglutinación de 1:1024, al usar los aislamientos HP-1 y MI-6 como antígeno.

El título de la hemoaglutinación viral fue de 1:256 para el agente HP-1 y de 1:128 para el MI-6 y su conclusión fue que por lo tanto, los aislamientos realizados en la República Mexicana, pueden ser considerados similares al prototipo 127 del SBP.

Réplica del aislamiento HP-1 en embriones de pollo SPF

Los resultados obtenidos en la réplica del agente HP-1 en los embriones de pollo SPF, fueron negativos para el LAA y saco vitelino, después de haber realizado los tres pases ciegos en cada una de las cuatro repeticiones. Estos resultados son similares a los obtenidos por Zanella y colaboradores con el aislamiento hemoaglutinante del SBP, E-77 (83).

Cuadro 4.1 Hemoaglutinación en placa, con glóbulos rojos de diferentes especies.

Antígeno.	Globulos rojos al dos por ciento .								
	gallina.	pato.	pavo.	falsán.	ganso.	vaca.	caballo.	cerdo.	perro.
K-II	+	+	+	+	+	-	-	-	-
MI-8	+	+	+	+	+	-	-	-	-
VENC a/	+	+	+	+	+	-	-	-	-
VIA b/	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAA no inoculado .	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSF .	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a/ virus de la enfermedad de Newcastle.

b/ virus de la influenza aviaria .

Crecimiento de los aislamientos HP-1 y MI-6 en cultivos celulares

El comportamiento de los aislamientos HP-1 y MI-6 en cultivos celulares, fue similar en relación a los títulos obtenidos a la prueba de hemoaglutinación viral y efecto citopático. Por tal motivo, los resultados serán presentados en forma conjunta para los dos aislamientos hemoaglutinantes.

-Fibroblastos de embrión de pato (FEPa):

La presencia de hemoaglutininas se determinó hasta después de haberse realizado el segundo pase. El título que se obtuvo en FEPa inoculados con las diluciones 10^{-1} a 10^{-5} , osciló entre 1:20 y 1:80 unidades hemoaglutinantes (UHA), --- mientras que el resto de las diluciones, el resultado fue negativo.

No se obtuvo ningún cambio en los títulos, después de haberse realizado el tercer pase.

-Fibroblastos de embrión de pollo (FEPo):

En el cultivo FEPo, la presencia de hemoaglutininas, se determinó solo después de haberse llevado a cabo el tercer pase. Los títulos obtenidos estuvieron entre 1:10 y 1:80 UHA en las diluciones 10^{-2} a 10^{-5} .

No fue posible el observar un efecto citopático característico de los adenovirus en FEPa ni en FEPo, en ninguno de los pases realizados, así como tampoco la presencia de los corpúsculos de inclusión.

-Células renales de embrión de pollo SPF (CREPo):

En éstas células, solo se obtuvo un crecimiento viral hasta la dilución 10^{-2} con un título de 1:40 UHA en el -- primer pase.

Tampoco fue posible determinar un efecto citopático propio de los adenovirus.

Por lo expuesto, es evidente que los aislamientos - hemoaglutinantes HP-1 y MI-6, presentaron un crecimiento muy pobre en FEPO, FEPA y CREPo, en contraste con las investiga-- ciones que se han realizado con el virus del síndrome de la - baja de postura (6,11,46,47,81,83).

Por consiguiente y tomando en consideración que no fue posible determinar un efecto citopático de los aislamientos HP-1 y MI-6 y por el poco crecimiento que tuvieron en los cultivos celulares, no se pudo llevar a cabo el resto de las pruebas para la tipificación viral tales como: determinación del ácido nucleico, presencia de envoltura externa y sensibilidad a cambios de temperatura y pH.

Determinación del tamaño de las partículas virales

Al microscopio electrónico se pudo observar que las partículas virales, tanto para el aislamiento HP-1 como para el MI-6, presentan un tamaño de 67-75 nm.

La estructura icosaédrica y la presencia de fibras, no fueron claramente observadas (Fotos 4.1 y 4.2).

Estos resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores que han tenido problemas en la demostración de la forma icosaédrica y de las fibras. Las observaciones en cuanto a tamaño coinciden con las realizadas en este - trabajo (79,81,83).

Foto 4.1 Microscopía electrónica del aislamiento HP-1 .

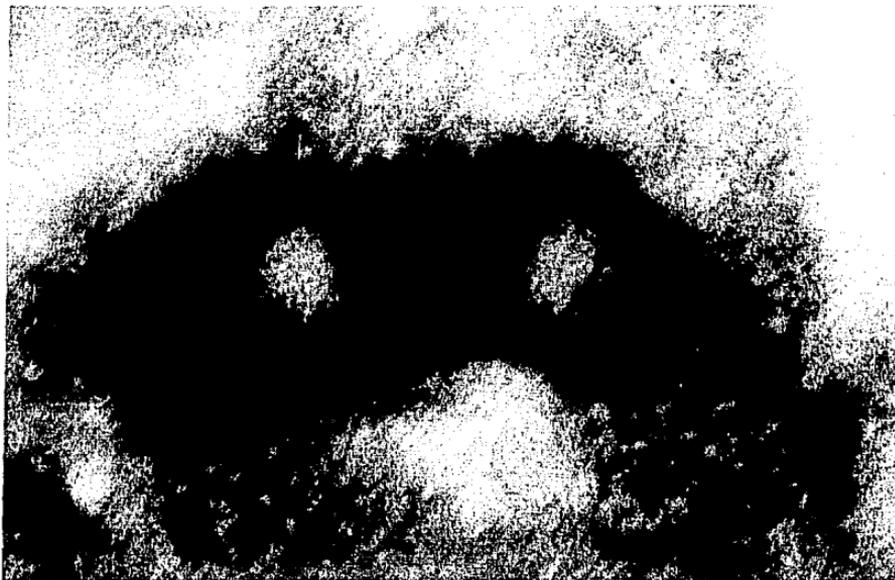
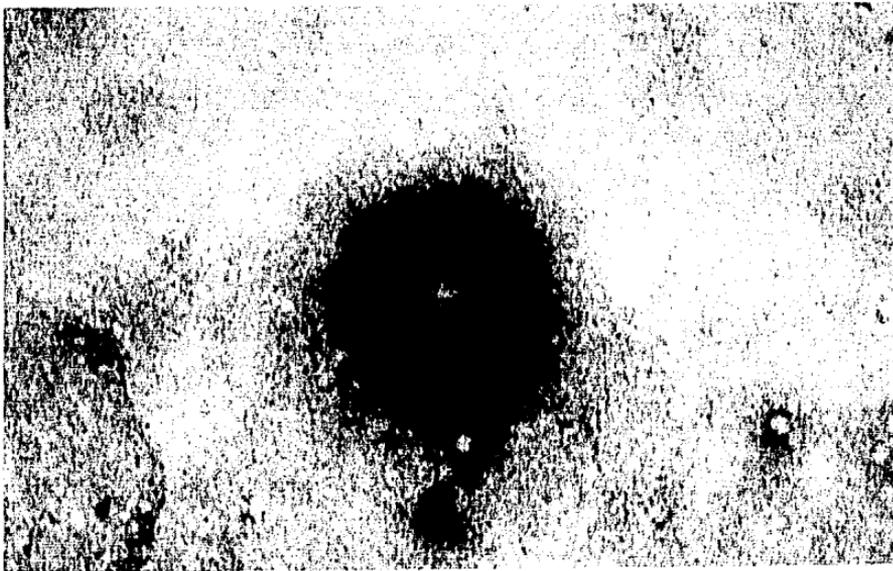


Foto 4.2 Microscopía electrónica del aislamiento MI-6.



Capítulo 5.

Evaluación en campo de la protección contra el síndrome de la Baja de postura, conferida por el agente HP-1

El principal control que se ha establecido para el síndrome de la baja de postura (SBP), es la inducción de una inmunidad específica a través de la vacunación (10,55,83).

Experimentalmente se ha estudiado la efectividad de una vacuna a virus vivo, demostrándose que ésta brinda una -- protección como las vacunas a virus muerto y emulsionadas. -- Sin embargo, el empleo de éstas últimas sigue siendo la mejor opción para el control del síndrome de la baja de postura, sobre todo al considerarse que la epidemiología de la enferme--dad no se encuentra aún bien definida, así como también, que eliminan el riesgo de difusión del virus en áreas densamente pobladas, mientras que la vacuna a virus vivo pudiera perpe--tuar la enfermedad (7,8,10,11,12,58,74).

Cuando el agente HP-1 fue administrado como vacuna a virus muerto en emulsión simple o emulsión múltiple, se encontró que indujo niveles de anticuerpos comparables en can--tidad y duración a los inducidos por la vacuna comercial; --- mientras que, en la respuesta a una vacuna a virus muerto ad--sorbido en hidróxido de aluminio, los niveles de anticuerpos desarrollados aunque bajos, se mantuvieron por un período comparable de tiempo (Capítulo 1).

Sin embargo, no fue posible evaluar la protección - conferida por éstas vacunas, ya que el agente aislado en Méxi--co a partir de gallinas y usado como desaffo, no produjo cam--bios significativos en la postura ni en la calidad del huevo (Capítulo 1 y 2). Este agente, MI-6, tampoco ocasionó cambi--os microscópicos en el oviducto al ser inoculado en gallinas susceptibles de la estirpe Babcock B-380 (Capítulo 3).

En base a lo expuesto y ante la imposibilidad de --- utilizar como desafio un virus patógeno que hubiera tenido --- que ser introducido al país con el riesgo de que fuera un ---- agente más patógeno que los presentes en México, se decidió -- evaluar bajo condiciones de campo, dos vacunas producidas con el aislamiento HP-1 inactivado; la primera usando una emulsión simple y la segunda adsorbiendo el HP-1 con hidróxido de aluminio, para determinar si los niveles de anticuerpos inducidos - por este tipo de vacunas, son suficientemente altos para proteger contra el SBP.

Para ello, las vacunas se aplicaron en aves de 19 semanas de edad, Babcock B-380, en una granja de medio millón de aves, enclavada en una zona avícola donde la población calculada es de cuatro millones de gallinas ponedoras y en la que se ha venido presentando problemas de baja de postura atribuibles al virus del síndrome de la baja de postura (72).

Materiales y Métodos

Multiplicación del HP-1

La multiplicación del agente HP-1, fue realizada -- según se describió en el Capítulo 1 (página 14).

Antígeno vacunal

El líquido amniótico (LAA) conteniendo $10^{6.1}$ -dosis infectante embrión de pato 50 por ciento por ml (DIEPa₅₀ por ciento/ml), fue inactivado con 0.1 por ciento de formaldehído *, durante 12 horas a 37°C.

Prueba de hemoaglutinación (HA)

Se hizo siguiendo el procedimiento mencionado en el Capítulo 1 (página 14).

Vacuna emulsionada

Para llevar a cabo la preparación de la vacuna emulsionada, se adicionó el fluido amniótico gota a gota a un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund **, mezclándolos a alta velocidad por 10 minutos en un homogenizador de tejidos *** (37).

* J.T.Baker S.A. Xalostoc, México

** Difco Laboratories. Detroit 1, Michigan, U.S.A.

*** Virtis "45". Research Equipment. Gardiner. New York.

Vacuna adsorbida en gel de hidróxido de aluminio

La vacuna adsorbida en gel de hidróxido de aluminio elaborada utilizando volúmenes iguales de LAA y de gel de hidróxido de aluminio * al dos por ciento, se homogenizó a alta velocidad por 10 minutos (2).

Aves experimentales

Para realizar la prueba de campo, se trabajó con -- una parvada de 3024 gallinas ponedoras Babcock B-380, de 19 - semanas de edad, inmunizadas contra la enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa, viruela aviaria, laringotraqueitis infecciosa, tifoidea aviaria, infección de la bolsa de Fabricio y encefalomielititis aviaria.

La parvada se alojó dentro de una caseta con capacidad para 5,400 aves, en una granja de medio millón de aves de varias edades.

Las gallinas fueron colocadas en número de tres por jaula.

Ubicación de la granja

Sección cuarta de Granjas El Calvario, Tehuacán, -- Puebla. Se eligió esta zona por ser uno de los lugares más - afectados en la República Mexicana por el virus del SBP (60,- 72).

Prácticas de manejo

El alimento suministrado fue elaborado por la misma empresa, con los requisitos necesarios para la postura. La - recolección del huevo se realizó dos veces al día, llevando - un control de la producción para cada repetición.

* Gel de hidróxido de aluminio comercial

Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con diferente número de repeticiones y cuatro tratamientos, tal como se ilustra en el Cuadro 5.1.

La ubicación física de la parvada dentro de la casetta, se hizo en bloque de 84 jaulas asignando el número de tratamiento aleatoriamente.

Cuadro 5.1. Tratamientos y repeticiones utilizados en el diseño completamente al azar en la prueba de campo, de las vacunas: emulsión simple, emulsión comercial y adsorbida en gel de hidróxido de aluminio.

Tratamiento	Num. de trat.	Num. de aves/rep.	Num. total aves	Repeticiones	Num. de jaulas/repeticiones
Testigo no vacunado	1	252	504	2	84
Testigo E. comercial	2	252	504	2	84
Adsorbida gel de hidróxido Al.	3	252	1008	4	84
Emulsión simple	4	252	1008	4	84

Inmunización con las vacunas a estudiar

Antes de realizarse la inmunización a la parvada a las 19 semanas de edad, se realizó un muestreo a un grupo de 200 aves seleccionadas al azar, con el fin de comprobar que estuvieran libres de anticuerpos contra el virus del síndrome de la baja de postura.

La aplicación de las vacunas fue vía subcutánea en la región dorsal del cuello, a razón de $10^{6.1}$ DIEPa₅₀ por ciento por ave. Simultáneamente se aplicó la vacuna comercial -- contra el SBP en las aves restantes dentro de la caseta.

Estudio de la respuesta inmune

Para realizar el estudio de la respuesta inmune, para cada repetición se seleccionaron desde el inicio del experimento, cinco jaulas al azar, sangrando sus correspondientes aves semanalmente. El grupo vacunado con la emulsión comercial, no fue sangrado durante las primeras semanas por un --- error de comunicación con el médico encargado de la granja.

Los sueros obtenidos fueron inactivados en baño María a 56°C durante 30 minutos, antes de realizar la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH).

Se consideró la unidad de análisis al promedio de anticuerpos obtenido en cinco jaulas (cada jaula representa el valor medio de anticuerpos de tres aves).

Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH)

La prueba de inhibición de la hemoaglutinación se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 1 (página 19).

Análisis estadístico

Estudio de la respuesta inmune

Para el estudio de los niveles de anticuerpos de -- las vacunas a investigar, se ajustaron los modelos de regresión lineal múltiple sin intercepto; el modelo raíz cuadrada y el cuadrático (24), representados en ecuaciones 1 y 2 respectivamente:

$$Y_{it} = B_1 X_{it} + B_2 X_{it}^{1/2} + E_{it} \quad (1)$$

$$Y_{it} = B_1 X_{it} + B_3 X_{it}^2 + E_{it} \quad (2)$$

donde;

t; $0 \leq t \leq 16$ semanas

Y_{it} = es el nivel promedio de anticuerpos en la i-ésima repetición, de la semana t; $1 \leq i \leq 4$

X_{it} = es el valor de la semana t,

X_{it}^2 y $X_{it}^{1/2}$ = son el cuadrado y raíz cuadrada respectivamente de la semana t,

B_1 , B_2 y B_3 = son parámetros a estimar y

E_{it} es una variable tal que $E_{it} \sim N(0, \sigma^2)$, $1 \leq i \leq 4$, e independiente.

El criterio de selección de los modelos de las ecuaciones 1 y 2, se basó en el máximo coeficiente de determinación, R^2 , y el mínimo cuadrado medio del error.

Con el fin de asociar los niveles de anticuerpos -- que se obtuvieron en condiciones de laboratorio, descritos en el Capítulo 1, por la vacuna emulsionada simple y la adsorbida en hidróxido de aluminio, se correlacionaron linealmente -- dichos niveles de anticuerpos con los obtenidos en ésta prueba de campo. Los resultados de las aves vacunadas con la emulsión comercial, no se incluyeron en el análisis estadístico, por la falta de datos durante las primeras seis semanas -- de estudio.

Estudio de la producción del huevo

Para el estudio de la producción del huevo, solo se realizó un análisis descriptivo de la producción gallina-día, obtenida semanalmente para cada una de las repeticiones de -- las dos vacunas y para los grupos: controles no vacunados y -- vacunados con la vacuna comercial.

Resultados y Discusión

Multiplificación del HP-1

El LAA de los embriones testigo inoculados con caldo nutritivo y después de haberle realizado tres pases ciegos en embriones comerciales de pato Pekín blanco, fue negativo a la prueba de hemoaglutinación viral. Con ello se puede descartar la posibilidad de que el inóculo inicial se hubiera -- contaminado, ya que los embriones procedían de una granja infectada con el VSBP (28).

Estudio de la respuesta inmune

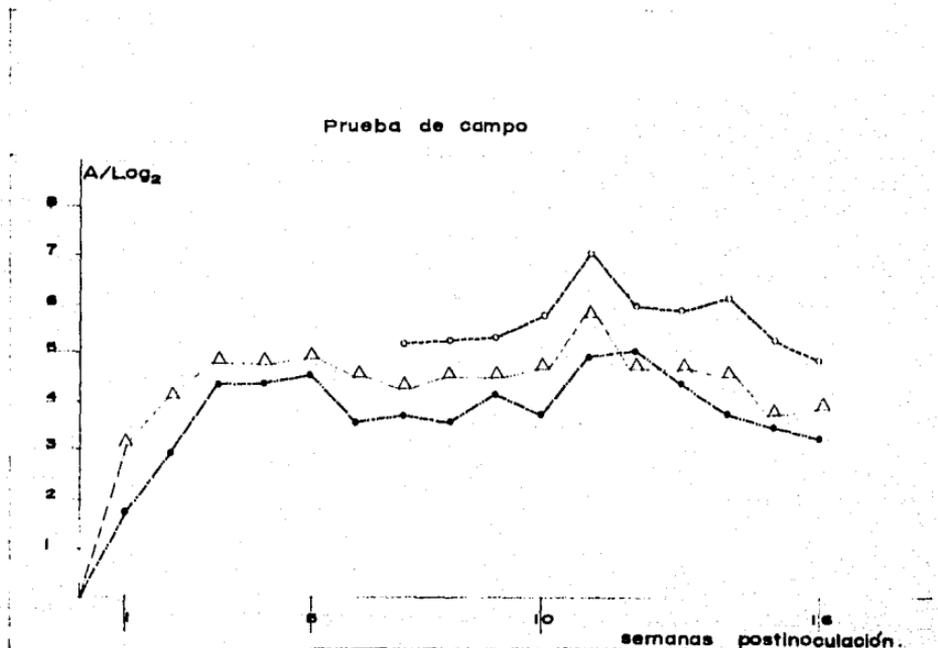
Los niveles de anticuerpos que se obtuvieron en esta prueba de campo, se encuentran expresados en la Gráfica -- 5.1. Los valores graficados, representan la media general obtenida de los promedios semanales de cada una de las cuatro -- repeticiones por vacuna. Los resultados del sangrado inicial antes de la inmunización a la parvada, fueron negativos.

Ocho días postinmunización, tanto la emulsión simple como la adsorbida en gel de hidróxido de aluminio, indujeron la producción de anticuerpos. A través de las primeras 11 semanas de estudio, se puede observar que ambas vacunas -- presentaron un comportamiento similar y ascendente, manteniéndose la vacuna adsorbida en gel de hidróxido de aluminio a -- un nivel ligeramente superior a la vacuna emulsionada.

Después de la semana 12, se nota un descenso en el título de anticuerpos en ambas vacunas.

Los niveles más altos que se obtuvieron en esta --- prueba fueron de 5.0 y 5.8 para la emulsión simple y la adsorbida en gel de hidróxido de aluminio, respectivamente, entre las semanas 11 y 12 postinmunización, mientras que para la -- emulsión comercial, el título fue de 7.0.

Gráfica 5.1 Títulos de inhibición de la hemoaglutinación en gallinas vacunadas contra el SBP



●—●—●—● Emulsión simple.
 ▲—▲—▲—▲ Vacuna adsorbida en gel de hidróxido de aluminio.
 ○—○—○—○ Vacuna comercial.
 A/Log₂ de la dilución más alta capaz de inhibir 4UHA.

El grupo control no vacunado, permaneció libre de anticuerpos durante las 16 semanas del estudio.

En relación a la respuesta inmune que se obtuvo en el Capítulo 1, nótese que la vacuna adsorbida en hidróxido de aluminio, presentó desde el primer muestreo, títulos de anticuerpos bajos, los cuales fueron ascendiendo lentamente para llegar entre las 16 y 20 semanas a presentar el nivel más alto, seguido de un lento descenso. En esta prueba de campo, los niveles de anticuerpos fueron altos desde el primer sangrado, manteniéndose a través de las semanas de estudio, diferenciando así con las observaciones realizadas por otros investigadores al adsorber un agente inmunógeno en gel de hidróxido de aluminio (67,68).

En cuanto a la emulsión simple, podemos observar -- que los niveles de anticuerpos que indujo tanto en la prueba de campo como en el laboratorio (Capítulo 1), fueron similares; sin embargo, la emulsión comercial produjo títulos más altos a los obtenidos en la prueba de laboratorio.

En el análisis estadístico para el estudio de los niveles de anticuerpos, el coeficiente de determinación R^2 -- para cada una de las vacunas, obtenido para el modelo de regresión lineal múltiple raíz cuadrada y el cuadrático, fue -- superior al 90 por ciento, lo cual indica que todas las observaciones están próximas a la recta de regresión, aproximadamente el 90 por ciento de la variación total de los Y_i es explicada por la regresión.

En el Cuadro 5.2 se presenta el valor estimado para los parámetros B_1 y B_2 , así como el coeficiente de determinación, tanto para la emulsión simple como para la adsorbida -- en gel de hidróxido de aluminio, obtenidos en el modelo raíz cuadrada, el cual fue seleccionado para esta investigación -- por presentar el máximo coeficiente de determinación y por -- ser el mismo modelo con el cual se trabajó en el Capítulo 1, -- con el fin de asociar los resultados logrados en dicho capítulo, con los de la prueba de campo.

Cuadro 5.2 Valor estimado para los parametros β_1 y β_2 y coeficientes de determinacion.

Modelo de regresión lineal múltiple raíz cuadrada.

Modelos ajustados

R^2 .

Emulsion simple.

$$\hat{Y}_i = -0.5078 X_i + 2.9271 X_i^{1/2}$$

(0.0484) (0.1506)

0.965

Adsorbida en hidroxido de aluminio.

$$\hat{Y}_i = -0.6715 X_i + 3.6669 X_i^{1/2}$$

(0.0490) (0.1626)

0.973

Nota : Los coeficientes de regresión son altamente significativos, $P < 0.01$.

Al asociar los niveles de anticuerpos logrados en el Capítulo 1, para la vacuna emulsionada; a los cuales se les denotará como nivel de anticuerpos laboratorio (NAL), con los niveles de anticuerpos obtenidos en la prueba de campo (NAC)-por dicha vacuna, se obtuvo un coeficiente de correlación lineal simple "r" de 0.847, por consiguiente, y al considerarse que el coeficiente de correlación puede tomar cualquier valor entre -1 y +1, existe una alta correlación lineal positiva -- entre los títulos de anticuerpos obtenidos en el laboratorio y el campo.

Para el caso de la vacuna adsorbida en gel de hidróxido de aluminio, el valor de "r" fue de 0.486, lo cual -- indica también una correlación positiva entre NAL y NAC inducidos por esta vacuna, aunque el mayor grado de asociación lo presentó la emulsión simple al haber obtenido un coeficiente de correlación muy cercano a +1.

Estos resultados vienen a indicar que la respuesta inmune inducida por las vacunas emulsión simple y adsorbida -- en hidróxido de aluminio a nivel de laboratorio, fue similar a la observada en la prueba de campo, por lo que se puede considerar que la efectividad de las mencionadas vacunas en cuanto a la capacidad para inducir anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación, es semejante aún cuando las vacunas fueron probadas bajo condiciones experimentales muy diferentes.

Nótese que la vacuna adsorbida en gel de hidróxido de aluminio, indujo niveles de anticuerpos más altos en esta prueba de campo en relación a los inducidos por el HP-1 adsorbido en hidróxido de aluminio (Capítulo 1). Puede pensarse -- que que este comportamiento se debe principalmente a la utilización del gel de hidróxido de aluminio como adyuvante en la respuesta inmune, permitiendo un catabolismo más lento del -- antígeno y un mayor estímulo a las células de defensa, además de haber trabajado con un número mayor de aves.

Estudio de la producción del huevo

Los porcentajes obtenidos para la producción del --huevo gallina-día, se encuentran representados en las Gráfi--cas 5.2, 5.3 y 5.4.

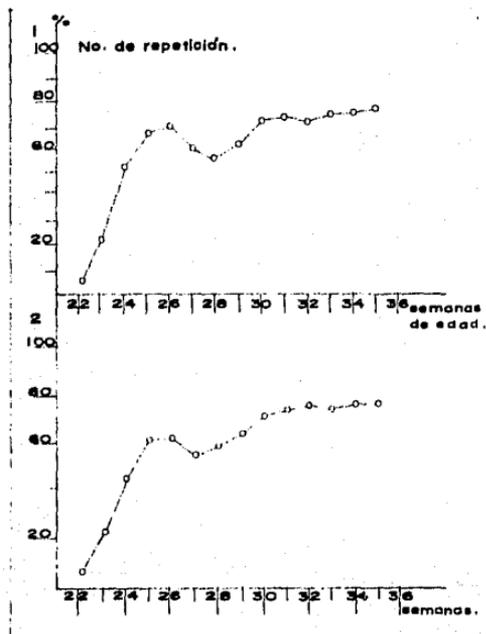
Nótese que los porcentajes de postura para cada una de las repeticiones de cada grupo, fue similar, inclusive se nota un ligero descenso de la misma entre las semanas 26 y 27, el cual vuelve a recuperarse de forma inmediata. Dicho descen--so se asoció a una alza en la temperatura ambiental con una --duración aproximada de tres semanas, afectando la producción de huevo en toda la granja.

El grupo de aves testigo no vacunadas, no presentó ninguna alteración en su postura, lo que aunado al hecho de --que no se presentaron anticuerpos inhibidores de la hemoaglu--tinación contra el VSBP en dicho grupo, indican que no hubo --una infección natural.

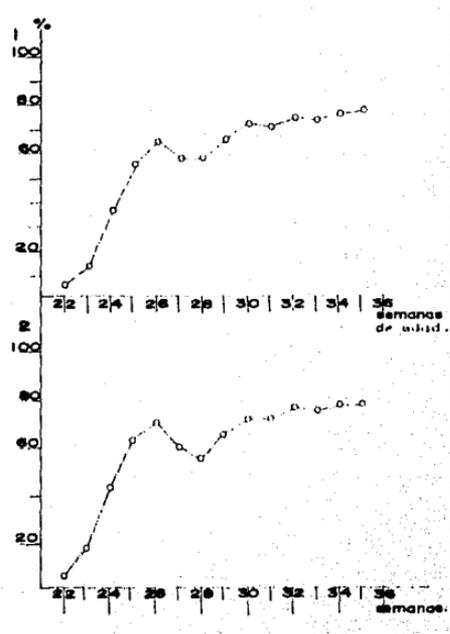
Como se expresó al inicio del presente capítulo, el objetivo de esta investigación, fue el de comprobar la efecti--vidad de la vacuna emulsionada simple y la adsorbida en gel --de hidróxido de aluminio en el campo. Sin embargo, con base en los resultados que han sido expuestos tanto en el estudio de la respuesta inmune como para la producción del huevo, no fue posible evaluar la efectividad de las citadas vacunas, ya que no se presentó el brote de campo. Por consiguiente, los resultados obtenidos en este estudio realizado en Tehuacán, --Puebla, difieren de las observaciones hechas por otros auto--res (60,72), probablemente debido a que el uso continuo de va--cuna emulsionada contra el SBP en la zona y en particular en esa granja, ha reducido a su mínima expresión la excreción --del virus por las gallinas portadoras (9).

Gráfica 5.2 Producción de huevo/gallina-día.

Testigos no vacunados.



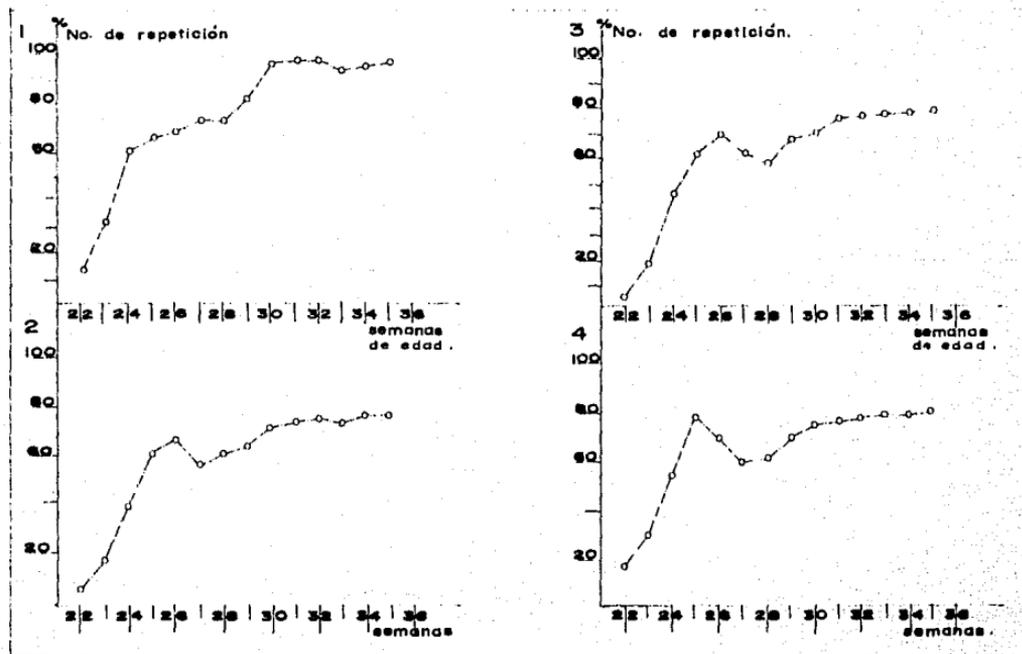
Testigos vacunados (vacuna comercial).



Gráfica 5.3 Producción de huevo/gallina-día.

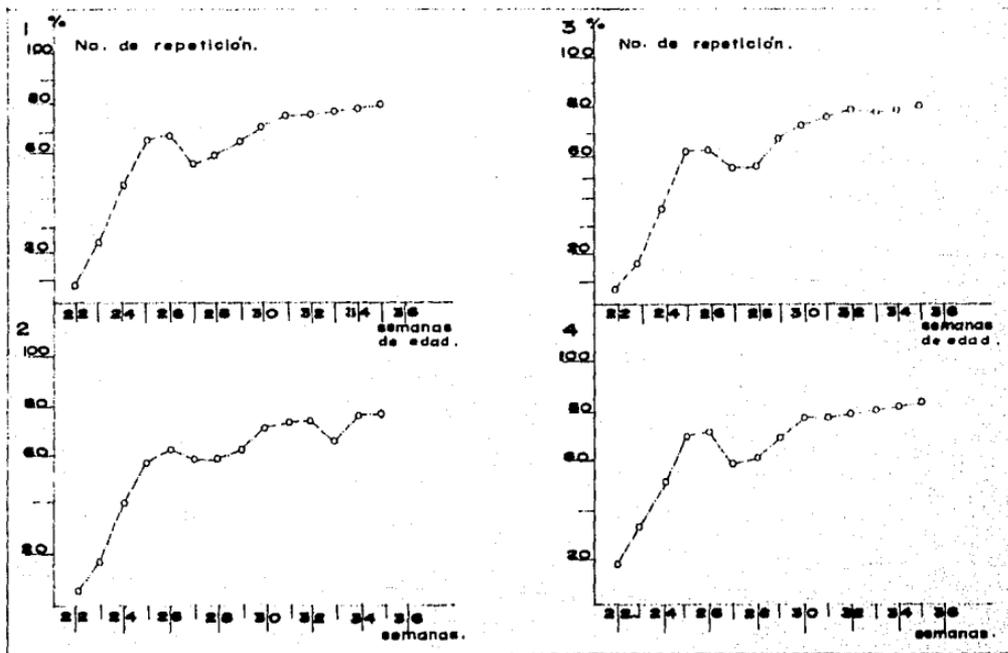
92

Vacuna emulsionada.



Gráfica 5.4 Producción de huevo/gallina-día.

Vacuna adsorbida en hidroxido de aluminio.



CONSIDERACIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en este trabajo indican -- que, tanto el agente HP-1 como el MI-6 son serológicamente -- indistinguibles del prototipo 127 del virus del síndrome de -- la baja de postura (44,45), así como al adenovirus K-11 aislado por Calnek *. El agente HP-1 es serológicamente idéntico al prototipo BC-14 y al MI-6; podemos entonces pensar, que los agentes HP-1, MI-6, K-11, 127 y BC-14 comparten las mismas características antigénicas, al ser comparados mediante -- la prueba de inhibición de la hemoaglutinación y que no existen serotipos del virus del síndrome de la baja de postura -- (44).

El comportamiento de los agentes HP-1 y MI-6 ante -- glóbulos rojos de diferentes especies de animales, fue idéntico al de los prototipos BC-14 y 127 (1,6,11); excepción hecha de la aglutinación con glóbulos rojos de ganso y faisán, los cuales no fueron utilizados por otros autores en la prueba de hemoaglutinación con BC-14 y 127.

Ambos agentes, HP-1 y MI-6 pudieron cultivarse en -- embrión de pato, alcanzando títulos elevados (1:640); en cambio, al ser inoculados en embrión de pollo, no se obtuvo crecimiento. Su inoculación en fibroblastos de embrión de pollo, células renales y fibroblastos de embrión de pato, demostraron un crecimiento muy pobre ya que el título más alto a la prueba de hemoaglutinación viral, fue de 1:80 unidades hemoaglutinantes. No fue posible el observar un efecto citopático propio de los adenovirus en ninguna de las líneas celulares empleadas (1,6,11,47,79). Esto revela ciertas diferencias con los virus prototipos de la enfermedad que sí presentan un -- buen crecimiento en cultivos celulares aviares (6,11).

* Calnek, B.W. Comunicación personal (1981).

La falta de transmisión del agente MI-6 de gallinas infectadas a gallinas en estrecho contacto con ellas, es también otro punto de similitud con los prototipos del virus del síndrome de la baja de postura (3,10,44,62). En cambio, el no observar alteraciones en la postura, en la calidad del ---huevo (3,4,6,7,8,11,17,42,43,45,46,47,58,62,69) y la ausencia de lesiones macro y microscópicas en el oviducto de las gallinas, es algo que diferencia al agente MI-6 de ellos (30,53,--69). Debe de considerarse que estos resultados se puedan deber al pequeño número de aves con el cual se trabajó.

Por lo anterior, se infiere que los agentes HP-1 y MI-6 son, efectivamente virus del síndrome de la baja de postura, siendo el MI-6 una probable variante poco patógena.

Debe de considerarse la posibilidad de que ambos --agentes; HP-1 y MI-6, sean el mismo virus o bien, a pesar de las precauciones que se tuvieron en el manejo de los dos aislamientos en el laboratorio, haya existido una contaminación.

Al utilizar el agente HP-1 como inmunógeno para el control de la enfermedad, se demostró que éste aislamiento --hemoaglutinante es capaz de inducir el desarrollo de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación del virus del síndrome de la baja de postura, al ser empleado como virus muerto y --emulsionado en aceite, así como en su presentación adsorbido en polvo o en gel de hidróxido de aluminio.

Además, el análisis estadístico, comprobó que no --existe diferencia alguna entre el comportamiento presentado --por la emulsión simple y la múltiple, así como el adicionar --antígeno a la fase externa de una emulsión múltiple. Los resultados obtenidos en el empleo del HP-1 inactivado y emulsio--nado, fueron similares a los obtenidos en esta investigación al utilizar la vacuna comercial emulsionada que se emplea actualmente en la República Mexicana para el control del síndro--me de la baja de postura (54,55,56).

A través del modelo de Nerlove citado en Goldberger (29), se encontró que los niveles de anticuerpos para un tiempo t , dependen más del valor esperado, que de los niveles de anticuerpos observados en el tiempo anterior, para cada una de las presentaciones del agente HP-1, así como para la emulsión comercial.

Por otro lado, al realizarse un estudio comparativo entre los niveles de anticuerpos logrados en el laboratorio (NAL) y los obtenidos en la prueba de campo (NAC) que se realizó en Tehuacán, Puebla; se demuestra que existe una correlación lineal positiva entre los títulos de anticuerpos inducidos por la vacuna emulsión simple. También se demostró que existe una correlación lineal positiva para los títulos de anticuerpos producidos por la vacuna adsorbida en hidróxido de aluminio (NAL) y los niveles de anticuerpos logrados en la prueba de campo (NAC) con el HP-1 adsorbido en gel de hidróxido de aluminio, a pesar de que las condiciones bajo las cuales se realizó la prueba de campo y laboratorio, fueron diferentes.

Sin embargo, no es posible concluir si las vacunas a virus muerto elaboradas en esta investigación, son efectivas para el control del síndrome de la baja de postura, ya que en la evaluación a campo que se realizó, no se presentó la infección natural. Tampoco fue posible estudiar la efectividad de las mencionadas vacunas a través de su capacidad para prevenir las lesiones histopatológicas del oviducto, al no contar con un virus de desafío apropiado.

Por otro lado, y con base en que no se presentó el brote de campo, puede pensarse que el uso de la vacuna a gran escala reduce la excreción del virus *, debido a que en la granja en la cual se realizó la prueba de campo, han estado utilizando la vacuna comercial contra el síndrome de la baja de postura en aves de 18 semanas de edad, desde hace dos años aproximadamente.

* McFerran, J.B. Comunicación personal (1984).

Por lo expuesto, se considera que el estudio de la tipificación viral abre nuevas líneas de investigación tales como el determinar las características físico-químicas de los dos aislamientos realizados en el país; el HP-1 y el MI-6. De igual forma, debe de buscarse un sistema de desafío adecuado para poder comprobar la efectividad de las vacunas estudiadas, con la finalidad de fijar la cantidad necesaria de inmunógeno requerido para obtener una buena respuesta inmune y -- desde el punto de vista económico, lograr la protección necesaria para que no se afecte la calidad ni la cantidad del ---huevo producido.

LITERATURA CITADA

- 1- Adair, B.M., McFerran, J.B., Connor, T.J., McNulty, M.S., -- and McKillop, E.R.: Biological and physical properties of a virus (strain 127) associated with egg drop syndrome - 1976. Avian Pathol., 8: 249-264 (1979).
- 2- Allan, W.H., Lancaster, J.E., and Toth, B.: Vacunas contra la enfermedad de Newcastle. 2da. Ed. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, - Roma (1980).
- 3- Anonymous: Egg drop syndrome-1976: A "new" disease of -- chickens. Avian Pathol., 7: 189-191 (1978).
- 4- Anonymous: The egg drop syndrome 1976 (EDS'76) and the - control of egg drop syndrome '76 with Nobi-Vac EDS'76 --- strain BC-14 (Inactivated). Intervet International B.V.- 5830 A.A. Boxmeer, Holand (1978).
- 5- Antillón, A.: Síndrome de la baja de postura (EDS) en la República Mexicana. V Congreso del Istmo Centroamericano, Managua, Nicaragua, Noviembre (1980).
- 6- Baxendale, W.: Observaciones recientes de un nuevo adenovirus y su posible conexión con la baja de postura. Sección Española de la Asociación Mundial de Avicultura. -- XV Simposio Científico, Barcelona, España, Noviembre --- (1977).
- 7- Baxendale, W.: Egg drop syndrome '76. Vet. Rec., 102: 285--- 286 (1978).
- 8- Baxendale, W.: Egg drop syndrome '76 and its control. Memo- rias de la IV Convención Anual. Asociación Nacional de - Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA). Puerto Va--- llarta, México (1979).
- 9- Baxendale, W.: Recent research on egg drop syndrome '76 -- (EDS'76). V Convención Anual de ANECA and 29th. Western Poultry Dis. Conf., Acapulco, México. Abril (1980).
- 10- Baxendale, W.: Vaccination against adenoviruses and parti- cularly against EDS'76. Clin. Vet., 103: 388-393 (1980).
- 11- Baxendale, W., Luttiken, D., and Hein, R.: Observations ma- de with the egg drop syndrome 76 of chickens and the de- velopment of a vaccine against the disease. XVI World's Poultry Congress and Exposition. Rio de Janeiro, Brasil Septiembre (1978).

- 12- Baxendale,W., Luttiken,D., Hein,R., and McPherson,I.: -- The results of field trials conducted with an inactivated vaccine against the egg drop syndrome 76 (EDS'76). - Avian Pathol.,9: 77-91 (1980).
- 13- Berlin,B.F.: Gross physical properties of emulsified influenza virus vaccines and the adjuvant response. ----- J.Immunol.,85: 81-89 (1960).
- 14- Berry,D.M.: Egg production and disease: Adenovirus. Vet. Rec.,12: 397-398 (1969).
- 15- Boney,W.A.,Jr., and Stone,H.D.: Immunologic response of two-day-old passively immune and susceptible chicks to - inactivated Newcastle disease virus. 1.Alum-precipitated and sodium-hydroxide-conjugated vaccine. Avian Dis.,23:- 445-455 (1969).
- 16- Box,G.E.P., and Jenkins,G.M.: Time Series Analysis, Forecasting and Control, San Francisco: Holden-day (1976).
- 17- Brugh,M., Beard,C.W., and Villegas,P.: Experimental infection of laying chickens with adenovirus 127 and with a related virus isolated from ducks. Avian Dis.,28: 168-178 (1984).
- 18- Calnek,B.W.: Hemagglutination-inhibition antibodies ---- against an adenovirus (Virus 127) in White Pekin ducks - in the United States. Avian Dis.,22: 798-801 (1978).
- 19- Card,L.E., Nesheim,M.C.: Producción Avícola, la.Ed., A-cribia, Zaragoza, España (1968).
- 20- Cook,J.K.A., and Darbyshire,J.H.: Epidemiological studies with egg drop syndrome-1976 (EDS-76) virus. Avian Pathol., 9: 437-443 (1980).
- 21- Cowen,B., Calnek,B.W., Menendez,N.A., and Ball,R.F.: --- Avian Adenovirus: Effect on egg production, shell quality and feed consumption. Avian Dis.,22: 459-470 (1978).
- 22- Cullen,G.S.: Adenovirus 127 and egg drop syndrome 76 --- (EDS'76), Proc. of 28th. Western Poultry Dis. Conf., University of California, Davis, U.S.A., March (1979).
- 23- Darbyshire,J.H., and Peters,R.W.: Studies on EDS-76 virus infection in laying chickens. Avian Pathol.,9: 277-290 (1980).
- 24- Draper,N., and Smith,H.: Applied Regression Analysis. -- John Wiley and Sons, New York, (1966).

- 25- Eck, van, J.H.H., Davelaar, F.G., Vanden Heuvel-Plesman, --
Thea, A.M., Vankol, N., Kouwenhoven, B., and Guldie, F.H.M.:
Dropped egg production, soft shelled and shell-less eggs
associated with appearance of precipitins to adenovirus
in flocks of laying fowls. Avian Pathol., 5: 261-272 (1976).
- 26- Eck, van, J.H.H., Elenbaas, L., Wensvoort, P., and Kouwenhoven,
B.: Histopathological changes in the oviduct of hens ---
producing shell-less egg associated with precipitins to
adenovirus. Avian Pathol., 7: 279-287 (1978).
- 27- Furminger, I.G.S.: Newcastle disease antibody levels in -
chickens after vaccination with oil emulsion adjuvant --
killed vaccine. Vet. Rec., 96: 108-111 (1975).
- 28- García, J.I.: Aislamiento de un agente serológicamente re
lacionado con el adenovirus causante del síndrome de la
baja de postura 1976., Tesis de Licenciatura. Fac. de --
Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de Méxi-
co., D.F. (1981).
- 29- Goldberger, A.S.: Econometric Theory. John Wiley and Sons,
New York (1964).
- 30- Guittet, M.: Chutes de ponte associées à la production d'-
oeufs sans coquille ou à coquille fragile: Diagnostic et
epidemiologie. L'Aviculteur, 379: 51-54 (1978).
- 31- Gujarati, D.: Use of dummy variables in testing for equa-
lity between sets of coefficients in linear regressions:
A generalization. The American Statistician, 24: 18-21 --
(1970).
- 32- Gujarati, D.: Use of dummy variables in testing for equa-
lity between sets of coefficients in two linear regre-
ssions: A note. The American Statistician, 24: 50-52 ----
(1970).
- 33- Herbert, W.J.: Multiple emulsions: A new form of mineral-
oil antigen adjuvant. Lancet, 2: 771 (1965).
- 34- Hilleman, M.: Critical appraisal of emulsified oil adju-
vants applied to viral vaccines. Progr. Med. Virol., 8: -
131-182 (1966).
- 35- Hitchner, S.B., Domermuth, C.H., Purchase, H.G., and -----
Williams, J.E.: Isolation and identification of avian ---
pathogens. American Association of Avian Pathologists. -
Arnold Printing Corp., Ithaca, New York, U.S.A. (1975).

- 36- House, H., Villegas, P., and Kleven, H.: Effect of a duck - hemagglutinating adenovirus on egg production in White - Leghorn layers. Proc. of 30th. Western Poultry Dis. Conf., University of California, Davis, U.S.A., March (1981).
- 37- Levy, R., and Zakay-Rones, Z.: Immunization of chickens -- with an inactivated oil-adjuvant Newcastle disease virus vaccine. Avian Dis., 17: 598-604 (1973).
- 38- Lohr, L.E.: A serological survey for the presence of anti bodies to egg-drop-syndrome-1976 adenovirus. N.Z.Vet.J., 27: 194 (1979).
- 39- Lombardi, D., Coaro, R., and Buzzaccaro, E.: Immunizzazione simultanea del pulcino di un giorno contro la pseudopeste aviaria con vaccino ucciso iperconcentrato ed emulsionato e con vaccino vivo B₁ spray. La Clinica Veterinaria, 99: 57-64 (1976).
- 40- Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd. Ed., Editor: Luna, L.G., MacGraw, Hill Book Company, New York, U.S.A. (1968).
- 41- Márquez, M.A.: El síndrome de la baja de postura 1976. -- Laboratorios Serva, S.A. México, D.F. Enero (1979).
- 42- McCracken, R.M., and McFerran, J.B.: Experimental reproduction of the egg drop syndrome 1976 with a hemagglutinating adenovirus. Avian Pathol., 7: 483-490 (1978).
- 43- McFerran, J.B.: Adenovirus infection and "EDS-76". V Convención Anual de ANECA and 29th. Western Poultry Dis. -- Conf., Acapulco, México (1980).
- 44- McFerran, J.B., McCracken, R.M., McKillop, E.R., McNulty, M.S., and Collins, D.S.: Studies on a depressed egg production syndrome in Northern Ireland. Avian Pathol., 7: 35-47 --- (1978).
- 45- McFerran, J.B., Rowley, H.M., McNulty, M.S., and Montgomery, L.J.: Serological studies on flocks showing depressed -- egg production. Avian Pathol., 6: 405-413 (1977).
- 46- MacPherson, I.: Clinical aspects of EDS 76 and its control (Egg Drop Syndrome). Proc. of the 28th. Western Poultry Dis. Conf., University of California, Davis, U.S.A. --- March (1979).
- 47- Meulemans, G., Dekegel, D., Peeters, J., Meirhaeghe, van, E., and Halen, P.: Isolation of an adeno-like virus from ---- laying chickens affected by egg drop syndrome 1976. ---- Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 48: 151-157 (1979).

- 48- North, M.O.: Manual de Producción Avícola. El Manual Moderno. México, D.F. México (1982).
- 49- Osebold, J.W.: Mechanisms of action by immunologic adjuvants. JAVMA, 181: 983-987 (1982).
- 50- Parada, J.A. y Telléz G., A: Evaluación serológica de campo de dos tipos de vacunas emulsionadas en aceite contra la enfermedad de Newcastle. V Congreso del Istmo Centroamericano, Managua, Nicaragua, Noviembre (1980).
- 51- Pérez, R.: Immunity study of a new diluted formalin-inactivated Newcastle disease vaccine. Avian Dis., 6: 284-289 (1962).
- 52- Phillips, M.S.: Vaccination against Newcastle disease: An assessment of haemagglutination inhibition titres obtained from field samples. Vet. Rec., 93: 577-583 (1973).
- 53- Picault, J.P.: Chutes de ponte associées á la production d'oeufs sans coquille ou á coquille fragile: Propriétés del agent infectieux isole au cours de la maladie. L'Aviculteur, 379: 57-60 (1978).
- 54- Pineda P., L.: Casos clínicos semejantes al síndrome de la baja de postura en el Estado de Puebla. Memorias de la V Convención Anual de ANECA. Mérida, Yucatán, México. --- Abril (1980).
- 55- Pineda P., L.: Experiencias de campo con la vacuna emulsionada contra el síndrome de la baja de postura. VI Ciclo Internacional de Conferencias sobre Avicultura ---- (1982).
- 56- Pineda P., L., Mata F., M.A.: El síndrome de la baja de -- postura en la región de Tehuacán Puebla. Avirama, año 1, Vol. 1 (1980).
- 57- Quintana L., J.A.: Las Aves: Manejo y Medio Ambiente. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Sistema de Universidad Abierta. Uní versidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. ---- (1981).
- 58- Redmann, von, T., Khalaf, S.E.D., Luders, H., Kaleta, E.F., -- und Siegmann, O.: Feldbeobachtungen zur epizootologie und prophylaxe des egg drop syndrom 1976 (EDS'76). Dtsch. -- Tierarztl. Wschr., 88: 125-160 (1981).
- 59- Roland, D.: Huevos rajados y deformes en el cuerpo. Indus tria Avícola. Julio (1979).

- 60- Rosales C., A.G., Antillón R., A., Morales, C.: Reporte en México sobre la presencia de anticuerpos contra el adeno virus causante del síndrome de la baja de postura (cepa BC-14) en parvadas de gallinas domésticas. V Convención Anual de ANECA and 29th. Western Poultry Dis. Conf., --- Acapulco, México. Abril (1980).
- 61- Sales, P.I.: Vacinas inactivadas/emulsionadas. Uma solução das aves. Ministério de Agricultura Brasileira. Rio de Janeiro, Brasil (1980).
- 62- Sales, P.I.: Observações de campo sobre a síndrome da queda de postura (EDS¹⁷⁶). VII Congresso Brasileiro de Avicultura, Rio de Janeiro, Brasil (1981).
- 63- Sevoian, M., and Levine, P.P: Effects of infectious bronchitis on the reproductive tracts, egg production, and egg quality of laying chickens. Avian Dis., 1: 136-164 -- (1957).
- 64- Shane, S.: El diseño de la jaula influye en la calidad del cascarón. Industria Avícola, 29: 36-40. Julio (1982).
- 65- Schloer, G.M.: Further studies on adenovirus 127 in the United States. Serological studies and characteristics of the isolates. Proc. of 28th. Western Poultry Dis. -- Conf., University of California, Davis, U.S.A., March -- (1979).
- 66- Schloer, G.M., Dardiri, A.H., Butterfield, W.K., Yates, V., and Breese, Jr., S.S.: Isolation of a virus indistinguishable from adenovirus 127 from chickens in the United States. 82nd. Annual Meeting of U.S. Anim Health Assoc. - (1978).
- 67- Stone, H.D., Brugh, M., Hopkins, S.R., Yoder, H.W., and Beard, C.W.: Preparation of inactivated oil-emulsion vaccines with avian viral or mycoplasma antigens. Avian Dis., 22: 666-674 (1978).
- 68- Suvillan, J.F., Gill, E., and Somers, A.S.: Immune response of chickens to Beta-propiolactone-killed Newcastle disease vaccines. Am. J. Vet. Res., 19: 483-488 (1978).
- 69- Taniguchi, T., Yamaguchi, S., Maeda, M., Kawamura, H., and Horiuchi, T.: Pathological changes in laying hens inoculated with the JPA-1 strain of egg drop syndrome-1976 virus. Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn), 21: 83-93 (1981).
- 70- Tizard, I.R.: Inmunología Veterinaria, Nueva Editorial -- Interamericana, México, D.F. (1971).

- 71- Todd, D., and McNulty, M.S.: Biochemical studies on a virus associated with egg drop syndrome 1976. J. Gen. Virol., 40: 63-75 (1978).
- 72- Uribe, J.A.: Relación entre las bajas de postura y detección de anticuerpos contra adenovirus micoplasma y bronquitis infecciosa en parvadas de gallinas. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1982).
- 73- Villegas, P.: Síndrome de la baja de postura. Estudios en los Estados Unidos. Memorias de la VI Convención Anual. ANECA. Puerto Vallarta, México (1979).
- 74- Villegas, P.: Papel de los adenovirus en Patología Aviar. V Congreso del Istmo Centroamericano., Managua, Nicaragua. Noviembre (1980).
- 75- Villegas, P.: Microtécnicas para realizar las pruebas de hemoaglutinación (HA) e inhibición de la hemoaglutinación (IH) en la enfermedad de Newcastle. En Técnicas Viroológicas en Enfermedades Aviarias. Ed. por: Villegas, P. Universidad de Georgia, Centro de Educación Continua. Fac. de Med. Vet., U.S.A. (1981).
- 76- Villegas, P.: Preparación de células primarias en Técnicas Viroológicas en Enfermedades Aviarias. Ed. por: Villegas, P. Universidad de Georgia, Centro de Educación Continua. Fac. de Med. Vet., U.S.A. (1981).
- 77- Villegas, P., House, H., and Kleven, S.H.: Efecto de un adenovirus hemoaglutinante aislado de patos, sobre la postura en aves de raza liviana. Memorias de la VII Convención Anual de ANECA. Mérida, Yucatán. México (1981).
- 78- Villegas, P., Kleven, S.H., Eidson, C.S., and Arnold, B.S.: Adenovirus 127 and egg drop syndrome 76: Studies in the United States. Proc. of 28th. Western Poultry Dis. Conf., University of California., Davis, U.S.A. March (1979).
- 79- Villegas, P., Kleven, S.H., Eidson, C.S., and Trampel, D.: - Isolation of a hemagglutinating adenovirus serologically related to adenovirus 127. Avian Dis., 23: 507-514 (1979).
- 80- Yamaguchi, S., Imada, T., Kawamura, H., Taniguchi, T., and Kawakami, M.: Pathogenicity and distribution of egg-drop syndrome-1976 virus (JPA-1) in inoculated laying hens. Avian Dis., 25: 642-649 (1981).

- 81- Yamaguchi, S., Imada, T., Kawamura, H., Taniguchi, S., Saio, H., and Shimamatsu, K.: Outbreaks of egg drop syndrome-76 in Japan and its etiological agent. Avian Dis., 25: 628-641 (1981).
- 82- Zanders, D.V.: Principles of disease prevention: Diagnosis and control. In: Disease of Poultry. 7th. Ed., Edited by: Hofstad, M.S., Calnek, B.W., Helmboldt, C.F., Reid, W.M., -- and Yoder, Jr., H.W. Iowa State University Press, Ames, -- Iowa, U.S.A. (1978).
- 83- Zanella, A., Nigrelli, A., and Poli, G.: Egg drop syndrome (EDS'76), etiopatogenesis, epidemiology, immunology and control of the disease. V Convención Anual de ANECA and 29th. Western Poultry Dis. Conf., Acapulco, México. ---- Abril (1980).

A N E X O

Anexo 1	
Cuadro 1	-----Hoja de control de campo Producción de huevo
Anexo 2	
Cuadro 2	-----Hoja de control semanal Producción de huevo
Anexo 3	-----Suposición del modelo de regresión lineal múltiple y desarrollos estadísticos
Anexo 4	-----Características externas del huevo. Grupo 1.
Anexo 5	-----Características externas del huevo. Grupo 2.
Anexo 6	-----Características externas del huevo. Grupo 3.
Anexo 7	-----Características externas del huevo. Grupo 4.
Anexo 8	-----Características externas del huevo. Grupo 5.
Anexo 9	-----Características externas del huevo. Grupo 6.

CUADRO 2. HOJA DE CONTROL SEMANAL

GRUPO # _____

SEMANA _____ A _____

AVES INICIALES _____

EDAD _____ A _____

CONCEPTO	1 SEMANA	2 SEMANA	3 SEMANA	4 SEMANA	5 SEMANA	6 SEMANA
PRODUCCION SANO						
UNIDADES ALTERADO						
% DE PRODUCCION GALLINA ENCASETADA						
PRODUCCION KILOS						
PESO PROMEDIO POR UNIDAD						
HUEVOS POR AVE CONFINADA						
% PRODUCCION GALLINA DIA						
ROTO						
EN FARFARA						
PERDIDA DE COLOR						
CAS DEFORME						
GRAVEDAD ESPECIFICA						
CALIDAD INTERNA DEL HUEVO						
ALBUMINA (U.H.)						
No. DE AVES EN EXISTENCIA						
OBSERVACIONES						

Anexo 3.

Suposición del modelo de regresión lineal múltiple y desarrollos estadísticos.

Con base a los resultados obtenidos tanto en el Capítulo 1 como en el Capítulo 5, se observó que el nivel de anticuerpos deseado, Y^* es una función, raíz cuadrada sin intercepto, del tiempo X_t , es decir:

$$Y_t^* = B_1 X_t + B_2 X_t^{1/2} + E_t \quad (1)$$

El nivel de anticuerpos deseado, Y_t^* ; no es directamente observable. Haciendo el símil con Nerlove, citado en Goldberger (29), se postula la siguiente hipótesis:

$$Y_t - Y_{t-1} = \mathcal{S} (Y_t^* - Y_{t-1}^*) \quad (2)$$

donde; \mathcal{S} es tal que $0 < \mathcal{S} \leq 1$, a \mathcal{S} se le conoce como coeficiente de ajuste y a Ec.2 se le conoce como hipótesis de ajuste parcial, y a $Y_t - Y_{t-1}$ la vamos a denominar el cambio actual o verdadero en el nivel de anticuerpos y a $Y_t^* - Y_{t-1}^*$ el cambio deseado en los niveles de anticuerpos.

La hipótesis de ajuste parcial de la Ec.2 postula - que el cambio actual en el nivel de anticuerpos en cualquier período de tiempo t , es una fracción \mathcal{S} del cambio deseado para ese período. De tal modo que si \mathcal{S} es igual a uno, significa que el actual nivel de anticuerpos es igual al deseado instantáneamente, en el mismo período de tiempo ($Y_t - Y_{t-1} = Y_t^* - Y_{t-1}^*$, y por lo tanto, $Y_t = Y_t^*$). El caso extremo, si \mathcal{S} es igual que cero, significa que nada cambia en virtud de que el actual nivel de anticuerpos, al tiempo t , es el mismo al observado en el período de tiempo anterior. Debido a que $0 < \mathcal{S} \leq 1$, al modelo en cuestión se le denomina modelo de ajuste parcial.

En la ecuación 2 se tiene que;

$$\begin{aligned}
 Y_t - Y_{t-1} &= \mathcal{D} (Y_t^* - Y_{t-1}) \\
 Y_t - Y_{t-1} &= \mathcal{D} Y_t^* - \mathcal{D} Y_{t-1} \\
 \mathcal{D} Y_t^* &= Y_t - (1 - \mathcal{D}) Y_{t-1} \\
 Y_t^* &= \mathcal{D}^{-1} [Y_t - (1 - \mathcal{D}) Y_{t-1}], \quad (3)
 \end{aligned}$$

y substituyendo Y_t^* de la Ec.3 en la Ec.1, después de hacer el álgebra correspondiente, se obtiene

$$Y_t = \mathcal{D} B_1 X_t + \mathcal{D} B_2 X_t^{1/2} + (1 - \mathcal{D}) Y_{t-1} + \mathcal{D} E_t, \quad 1 \leq t \leq n \quad (4)$$

el cual es un modelo con retraso de la variable dependiente - como independiente y por lo tanto éste requiere de la totalidad de valores de t , es decir la serie de tiempo $\left\{ Y_t \right\}_{t=1}^n$ completa.

Esto plantea un problema, el que experimentalmente solo se observaron algunos de los valores de niveles de anticuerpos Y_t , $t = 1, 2, 3, 4, 6, 10, 16, 20, 26$ y 29 semanas y donde -- cada Y_t era el promedio aritmético de los niveles de anticuerpos de 10 jaulas, es decir,

$$Y_t = \frac{\sum_{i=1}^{10} Y_{it}}{10} \quad \text{y por ende } \text{Var} (Y_t) = \sigma^2/10.$$

Con el objetivo de disponer de la colección completa $\left\{ Y_t \right\}_{t=1}^n$ para poder hacer los desfases de la variable Y_t , es decir obtener Y_{t-1} , y poder utilizar el modelo de Ec.4, - fue necesario estimar los valores que no se observaron en el transcurso del experimento, los que se denominan Z_t , y éstos fueron obtenidos utilizando el modelo raíz cuadrada ajustado para cada vacuna, esto es, del modelo original:

$$Y_t = B_1 X_t + B_2 X_t^{1/2} + E_t \quad (5)$$

donde para facilitar la notación, $t = 1, 2, 3, 4, 6, 10, 16, 20, 26$ y 29 semanas, Y_t es la media de niveles de anticuerpos por jaula, X_t y $X_t^{1/2}$ las semanas y raíz cuadrada respectiva y E_t es una variable aleatoria tal que $E_t \sim N(0, \sigma^2)$. La ecuación de predicción utilizada para obtener los Z_t no observados fue --

$$Z_t = b_1 X_t + b_2 X_t^{1/2}, \quad (6)$$

$t = 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 27$ y 28 semanas.

Para obtener las varianzas de los Z_t 's ajustados, se usará la notación matricial y de acuerdo a Draper y Smith (24) se tiene que

$$\text{Var}(z_t) = \left\{ \underline{X}_t' (X'X)^{-1} \underline{X}_t + 1 \right\} \sigma^2 \quad (7)$$

donde

$\underline{X}_t' = [X_t, X_t^{1/2}]$, t son las semanas no observadas y la matriz X definida como

$$X = \begin{array}{ccc} \underline{X}'_1 & & 1 \quad 1 \\ \underline{X}'_2 & & 2 \quad \sqrt{2} \\ \underline{X}'_3 & = & 3 \quad \sqrt{3} \\ \underline{X}'_4 & & 4 \quad 2 \\ \vdots & & \vdots \quad \vdots \\ \underline{X}'_{29} & & 29 \quad \sqrt{29} \end{array}$$

De acuerdo con lo anterior, se va a generar una colección de niveles de anticuerpos en base a los valores observados Y_t , $t = 1, 2, 3, 4, 6, 10, 16, 20, 26$ y 29 semanas y valores no observados pero predecidos, Z_t , $t = 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 27$ y 28 semanas, utilizando la ecuación de predicción de Ec.6. La serie estadística generada con el fin de tener para cada t , $1 \leq t \leq 29$ su respectivo nivel de anticuerpos, plantea el problema de heteroscedasticidad de varianzas, ya que los valores observados Y_t , presentan varianza igual a $\sigma^2/10$ y los Z_t presentan sus respectivas varianzas dadas por Ec.7. La serie de valores citada, se escribirá como el vector \underline{w} , 29×1 y sea Σ la matriz de varianzas y covarianzas definida por

$$\text{Var } (\underline{w}) = \sigma^2 \Sigma = \begin{pmatrix} \sigma^2/10 & & & & \\ & \sigma^2/10 & & & \\ & & \sigma^2/10 & & \\ & & & \sigma^2/10 & \\ & & & & \dots \end{pmatrix} \left[\begin{matrix} X_1' \\ (X'X)^{-1} X_1 + 1 \end{matrix} \right] \begin{pmatrix} \sigma^2 \\ \dots \\ \sigma^2/10 \end{pmatrix} \quad (8)$$

La matriz Σ se puede factorizar por $\Sigma^{1/2}$, es decir

$$\Sigma = \Sigma^{1/2} \Sigma^{1/2}$$

de tal modo que

$$\begin{aligned} \text{Var } (\Sigma^{1/2} \underline{w}) &= \sigma^2 \Sigma^{1/2} \Sigma \Sigma^{1/2} \\ &= \sigma^2 \Sigma^{1/2} \Sigma^{1/2} \Sigma^{1/2} \Sigma^{1/2} \\ &= \sigma^2 I \end{aligned}$$

Con el fin de estimar el coeficiente de ajuste parcial β de Ec.4, se ajustó el modelo de Ec.4 con el vector \underline{w} , es decir

$$w_t = \beta_1 x_t + \beta_2 x_t^{1/2} + (1 - \beta) w_{t-1} + \epsilon_t, \quad 2 \leq t \leq 29 \quad (10)$$

el cual en notación matricial se escribe

$$\underline{w} = X \underline{\beta} + \underline{v} \quad (11)$$

donde \underline{w} es el valor definido anteriormente,

$$X_g = \begin{bmatrix} 2 & \sqrt{2} & w_1 \\ 3 & \sqrt{3} & w_2 \\ & & w-1 \end{bmatrix}, \quad \underline{\beta} = \begin{bmatrix} \int B_1 \\ \int B_2 \\ 1-\int \end{bmatrix}$$

y \underline{w} el vector aleatorio, 1×29 .

Para aplicar el principio de cuadrados mínimos, una de sus suposiciones es la de homoscedasticidad de las varianzas, de los errores, suposición que aquí no se cumple ya que $\text{Var}(\underline{v}) = \text{Var}(\underline{w}) = \Sigma$ y por tal motivo, se premultiplicó el modelo de Ec.11 por $\Sigma^{-1/2}$, es decir,

$$\Sigma^{-1/2} \underline{w} = \Sigma^{-1/2} X \underline{\beta} + \Sigma^{-1/2} \underline{v}, \quad (12)$$

para obtener la homoscedasticidad de varianzas requeridas, esto es, el principio de cuadrados mínimos generalizados.

Anexo 4.0

Características externas del huevo

GRUPO Nº 1

Semana	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Huevo roto	1.4	1.7	1.1	2.5	2.0	1.4	7.2	1.9	1.4	5.0	2.2	5.4	0.8	1.6	2.8	0.8	9.3	2.5	4.7	2.8
Huevo en fărfa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.8	0.0	0.0	0.7	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0
Pérdida de color	0.0	0.0	0.6	13.8	22.8	20.1	18.7	9.1	9.4	13.3	5.1	6.1	12.7	6.4	4.3	9.3	10.1	8.3	8.6	10.5
Cascarón deforme	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	2.5	1.5	0.8	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Semana	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	desafío				postdesafío			
Parámetro														33	34	35	36	37	38		
Huevo roto	0.0	2.6	2.6	2.6	2.8	1.0	1.4	5.4	7.4	4.4	7.1	2.4	4.5	9.2	3.6	1.0	4.5	7.6	5.9		
Huevo en fărfa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
Pérdida de color	10.4	12.9	9.6	7.7	12.4	8.0	6.2	6.4	7.4	2.9	7.1	4.8	4.5	13.1	15.7	9.4	10.2	8.7	9.4		
Cascarón deforme	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	1.3	1.2	1.0	1.1	3.3	3.5		

Anexo 5.0

Características externas del huevo

GRUPO Nº 2

Semana		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Parámetro																					
Huevo roto	%	5.5	0.6	1.2	0.6	3.9	6.4	4.6	4.7	6.6	10.4	6.0	7.9	4.1	4.1	5.5	7.3	0.8	5.0	4.2	2.6
Huevo en fărara	%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.7	0.0	1.5	0.8	0.8	1.6	3.2	3.6	1.7	0.0	1.7	0.8
Pérdida de color	%	0.0	0.0	0.6	10.6	19.6	17.1	9.2	4.7	8.8	10.4	3.7	2.4	1.6	3.3	2.4	4.5	8.5	5.0	5.8	6.0
Cascarón deforme	%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	1.4	0.0	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Semana		20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	desafío		postdesafío				
Parámetro															33	34	35	36	37	38	
Huevo roto	%	3.8	9.9	5.8	5.9	3.3	5.1	9.6	2.8	3.1	7.8	9.5	1.4	8.0	10.8	4.2	8.6	8.9	3.2	6.7	
Huevo en fărara	%	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	3.3	
Pérdida de color	%	2.9	2.7	2.9	2.4	0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	7.1	1.4	3.5	9.2	11.1	6.2	3.0	3.2	1.7	
Cascarón deforme	%	0.0	0.9	0.0	0.0	1.1	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	3.3	

Anexo 6.0

Características externas del huevo

GRUPO Nº 3

Parámetro \ Semana		Semana																			
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Huevo roto	%	2.0	0.6	2.3	1.2	1.9	1.9	1.9	1.3	2.7	2.7	1.5	2.1	4.5	1.5	5.6	6.4	5.4	6.1	3.7	1.5
Huevo en fàrfara	%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.8	0.7	0.0
Pérdida de color	%	0.0	0.0	1.1	12.6	18.9	19.3	11.2	8.2	9.5	10.8	9.6	6.2	3.2	3.0	7.0	3.2	12.2	8.5	8.0	5.3
Cascarón deforme	%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Parámetro \ Semana		Semana												desafío		postdesafío					
		20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	
Huevo roto	%	1.7	4.8	5.0	4.5	4.5	7.8	5.6	2.2	2.3	3.4	8.6	7.3	5.5		6.2	4.5	3.6	2.7	3.8	7.9
Huevo en fàrfara	%	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0
Pérdida de color	%	10.0	8.0	7.4	7.2	9.8	3.9	7.9	7.8	3.4	9.1	7.1	6.2	4.4		7.3	8.2	6.4	6.2	6.7	7.9
Cascarón deforme	%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1

Anexo 7.0 Características externas del huevo

GRUPO Nº 4

Semana		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Huevo roto	%	0.0	2.3	1.2	1.3	2.0	0.6	2.6	1.3	4.2	4.8	2.8	0.0	2.2	0.7	1.3	2.0	3.2	4.5	3.0	2.8
Huevo en fărara	%	1.1	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Pérdida de color	%	0.0	0.0	1.8	1.1	21.3	13.1	10.0	5.8	2.8	8.7	6.3	8.7	3.7	0.0	3.9	2.0	3.8	6.4	1.2	2.1
Cascarón deforme	%	0.0	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	1.4	4.8	0.7	1.4	0.0	0.0	0.0	0.7	0.6	0.6	0.0	0.0

Semana		20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	desafío		postdesafío					
Parámetro															33	34	35	36	37	38		
Huevo roto	%	2.2	3.7	4.2	1.6	4.6	4.2	4.2	3.8	6.9	8.8	2.7	7.2	5.0	X	X	6.8	7.1	2.0	9.4	6.4	9.0
Huevo en fărara	%	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	X	X	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Pérdida de color	%	0.7	2.2	2.1	1.6	0.8	0.8	0.8	2.8	1.0	1.1	1.8	0.9	1.0	X	X	0.8	5.0	5.9	6.2	3.7	4.0
Cascarón deforme	%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	1.7	0.0	2.0	0.0	1.8	0.9	3.0	X	X	3.4	3.0	4.9	2.1	1.8	0.0

Anexo 8.0

Características externas del huevo

GRUPO Nº 5

Semana		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Huevo roto	%	3.2	1.7	1.1	2.5	1.3	2.5	2.9	4.6	6.0	5.7	4.8	6.3	4.9	1.4	3.4	1.5	2.6	2.6	4.1	4.0
Huevo en fărbara	%	0.0	0.6	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	2.3	1.5	0.0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Pérdida de color	%	0.0	0.0	0.0	13.7	19.6	14.6	10.8	7.7	8.3	9.2	12.3	5.6	4.9	5.5	4.1	8.3	2.6	3.5	7.3	2.4
Cascarón deforme	%	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	3.8	2.8	2.0	1.4	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0

Parámetro	Semana	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	desafío		postdesafío				
																33	34	35	36	37	38
Huevo roto	%	4.6	1.8	3.0	0.0	3.8	2.8	5.4	1.0	4.3	4.2	4.8	5.4	2.1		1.9	4.4	1.1	2.1	7.6	2.4
Huevo en fărbara	%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2
Pérdida de color	%	2.7	5.4	8.1	3.5	1.9	2.8	1.8	3.0	2.1	1.0	0.0	2.2	2.1		8.7	7.7	6.4	5.3	5.4	4.8
Cascarón deforme	%	0.0	0.0	0.0	1.7	0.9	0.9	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2		3.9	5.5	2.1	2.1	0.0	0.0

Anexo 9.0

Características externas del huevo

GRUPO Nº 6

Semana		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Huevo roto	%	0.0	1.1	1.6	1.8	1.4	2.8	2.2	1.2	3.2	3.5	6.0	3.9	1.4	4.1	4.0	3.9	3.4	1.3	4.2	2.6
Huevo en fàrfara	%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Pérdida de color	%	0.0	0.0	2.2	17.7	23.3	19.4	15.1	8.6	5.2	14.9	9.6	4.6	7.2	4.1	8.1	3.2	5.5	3.9	3.5	1.9
Cascarón deforme	%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.6	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.7	0.7

120

Semana		20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	desafío		postdesafío				
Parámetro																33	34	35	36	37	38
Huevo roto	%	5.3	5.5	5.3	2.2	2.4	5.0	4.2	4.1	2.6	3.7	1.7	4.8	2.6		3.8	5.3	2.7	1.1	4.1	4.1
Huevo en fàrfara	%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Pérdida de color	%	1.9	2.1	2.2	3.7	2.4	5.0	0.0	0.8	1.7	1.8	2.5	0.8	2.6		8.6	6.3	5.3	6.4	6.2	1.0
Cascarón deforme	%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.8	1.6	0.9			3.8	5.3	1.8	3.2	1.0	1.0