



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PROTECCION CONTRA LA
ENFERMEDAD DE NEWCASTLE CON UNA COMBINACION
DE VACUNAS ACTIVAS E INACTIVAS FRENTE A UN
DESAFIO CON VIRUS DE NEWCASTLE VELOGENICO
VISCEROTROPICO EN POLLOS DE ENGORDA ESTIRPE
ROSS/ROSS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

ADRIANA ROJAS ZUÑIGA

ASESORES: MVZ. TAMAS FEHERVARI BONE
MVZ. RUBEN MERINO GUZMAN



MEXICO, D. F.

ABRIL 2005

m343458



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Para la mujer que más admiro en esta vida.
Por su empeño, su coraje y por sus ganas de salir adelante día a día,
sin importar lo difícil que sea el camino.
Por que ella me enseñó a luchar y a levantarme hasta lograr lo que deseo.
A mis hermanos que me han apoyado tanto y que en los momentos más
difíciles siempre han estado conmigo.
A ese hombre que ha estado a mi lado alentándome y regañándome cuando
quise dejarlo todo.
Y por último gracias a esa necesidad de seguir adelante y hacer lo que
quiero, hasta llegar a esta gran meta,
dejando atrás lo difícil.

Dedicada a Juana, Omar, Adán, Ale y Omar

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: MVZ. ADRIANA ROJAS
ZUÑIGA

FECHA: 22-ABRIL-05

FIRMA: 

AGRADECIMIENTOS

A mi Facultad de Medicina Veterinaria y a la
Universidad Nacional Autónoma de México, que la considero mi segundo
hogar.

Al Departamento de Producción Animal: Aves y a todo su personal.

A todos los profesores, maestros y doctores que contribuyeron a mi
formación académica y que gracias a ellos he podido lograr una gran parte
de lo que más quiero en esta vida ser un MVZ profesional, ético y útil
para la sociedad, capaz de ayudar a los animales y por lo tanto
a la humanidad.

A todas las personas que de alguna manera han compartido momentos de mi
vida.

A la memoria de todos los animales que pasaron por mis
manos.

Muchas gracias

SOLO LA VIDA
VIVIDA AL SERVICIO DE OTROS
VALE LA PENA VIVIRLA.

ALBERT EINSTEIN

CONTENIDO

Página

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
CONTENIDO	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVO	10
HIPÓTESIS	10
JUSTIFICACIÓN	10
MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
RESULTADOS	14
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	32
LITERATURA CITADA	34

LISTA DE ABREVIATURAS

ALPES	Aves Libres de Patógenos Específicos
DD	Día del desafío
DLEP	Dosis Letales Embrión de Pollo
DIEP	Dosis Infectantes Embrión de Pollo
ENC	Enfermedad de Newcastle
ENCVV	Enfermedad de Newcastle Velogénica Viscerotrópica
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas)
HI	Inhibición de la Hemoaglutinación
n =	Número de muestras
PMV-1	Paramixovirus serogrupo 1
PMV-3	Paramixovirus serogrupo 3
PMV-9	Paramixovirus serogrupo 9
PBS	Solución Buferada de Fosfatos
PD	Post desafío
µl	Microlitro
VENC	Virus de la Enfermedad de Newcastle

RESUMEN

ROJAS ZÚÑIGA ADRIANA. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PROTECCION CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE CON UNA COMBINACIÓN DE VACUNAS ACTIVAS E INACTIVAS FRENTE A UN DESAFÍO CON VIRUS DE NEWCASTLE VELOGÉNICO VISCEROTROPICO EN POLLOS DE ENGORDA ESTIRPE ROSS/ROSS (Bajo la asesoría de Tamas Fehervari Bone y Rubén Merino Guzmán).

La enfermedad de Newcastle es altamente contagiosa, destructora y representa una seria amenaza económica para todos los sectores de la industria avícola. Afecta a casi todas las aves domésticas y silvestres, aunque se presenta más frecuentemente en su forma letal velogénica viscerotrópica en aquellas áreas con alta densidad de población avícola. Es por ello que la vacunación es una forma de prevenir y controlar el padecimiento.

Fuerón utilizadas 200 aves comerciales de pollo de engorda estirpe Ross/Ross de 1 día de edad, alojadas en unidades de aislamiento y divididas en 5 grupos. A los 11 días de edad, los pollos fueron inmunizados como sigue, grupo 1: cepa lentogénica inactiva hiperconcentrada (LIH) por vía subcutánea más cepa activa apatógena (AA) por vía ocular; grupo 2: cepa activa lentogénica La Sota (ALS) por vía ocular; grupo 3: virus activo apatógeno (AA) por vía ocular más vacuna de virus lentogénico inactivado (ALI) vía subcutánea; grupo 4: cepa viva apatógena (AA) vía ocular; grupo 5 testigo no vacunado. El desafío fue (cepa Chimalhuacán, $10^{7.5}$ DLEP₅₀/0.2 ml) al día 36 de edad de las aves por vía intramuscular. En cada grupo de aves hubo pollos no desafiados para confirmar la trasmisión horizontal del virus de desafío. Fuerón tomadas muestras de suero sanguíneo los días 2, 11, 21, 36 y 51 de edad para pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (HI) y ELISA, así como muestras de hisopos cloacal y traqueal para aislamiento virológico en embrión de pollo. Fueron comparados los signos, lesiones, porcentaje de mortalidad, reaislamiento viral y títulos de anticuerpos. La reacción respiratoria postvacunal fue leve en todos los grupos inmunizados. Los títulos de anticuerpos no mostraron diferencia estadística a los 21 y 36 días con la prueba de HI, pero el grupo 4 tuvo el menor título ELISA ($P < 0.05$) a los 36 días. A los 51 días, el mayor título de anticuerpos fue en el grupo 4 de trasmisión horizontal, seguido del grupo 3 de trasmisión horizontal y luego por los grupos 2, grupo 2 de trasmisión horizontal, grupo 3 y grupo 4; el menor título de anticuerpos lo presentó el grupo 1. El virus vacunal se aisló de hisopo traqueal en los grupos 1 y 3 a los 21 días de edad, y a los 36 días en el grupo 4. El virus de desafío fue aislado de hisopo cloacal de los grupos 1 y 4 a los 51 días de edad. La mortalidad fue del 5% en el grupo 2, 10% tanto en el grupo 3 como en el grupo 4; 20% en el grupo 4 expuesto a la trasmisión horizontal y 100% en el grupo no vacunado, el resto de los grupos no presentó mortalidad. Todas las aves muertas presentaron lesiones típicas de la enfermedad de Newcastle. Las aves vacunadas presentaron más signos respiratorios y menos signos digestivos que el grupo 5 testigo. Los signos nerviosos en los grupos 2 y 4 fueron iguales que en el grupo 5 testigo, los grupos 1 y 3 manifestaron menos signos nerviosos. Las cuatro vacunas y sus combinaciones fueron efectivas ante el desafío del virus velogénico viscerotrópico cepa Chimalhuacán de la ENC protegiendo por lo menos al 80% de las aves contra la mortalidad. El mejor programa de vacunación fue el de la aplicación simultánea de la cepa hiperconcentrada inactivada con la cepa activa apatógena.

SUMMARY

ROJAS ZÚÑIGA ADRIANA.COMPARATIVE STUDY ON PROTECTION AGAINST NEWCASTLE DISEASE IN ROSS/ROSS BROILER CHICKENS TREATED WITH COMBINATIONS OF ACTIVE AND INACTIVE VACCINES AND CHALLENGED WITH VELOGENIC VISCERTOTROPIC NEWCASTLE VIRUS (Guided by Tamas Fehervari Bone and Ruben Merino Guzman)

The Newcastle disease is a highly contagious, destructive disease and represents a serious economic stress for every sectors of modern aviculture. It affects almost all domestic and wild bird species but it can be found most frequently in its lethal, velogenic-viscerotropic form in regions with high poultry population. Vaccination is one of the forms to prevent and control the disease.

Two hundred, one day old, Ross/Ross commercial broiler chickens were obtained than divided into 5 groups and kept in isolation units. At the age of 11 days, they were immunized with Newcastle disease vaccines as follows: group 1 inactivated hyper-concentrated vaccine produced from lentogenic virus and applied via sub-cutaneous, plus vaccine with apatogenic live virus via ocular(conjunctiva); group 2 active vaccine with La Sota virus via ocular; group 3 apatogenic live virus vaccine via ocular and inactivated hyper-concentrated vaccine produced from lentogenic virus, subcutaneous way; group 4 vaccine with active apatogenic virus, via ocular; group 5 remained without treatment. At age 36 days, birds were challenged with strain Chimalhuacan ($10^{7.5}$ $DI_{50}/0.2ml$) via intramuscular. In each group some birds were left out of challenge to detect horizontal transmission of challenge virus. Blood samples were collected on 2, 11, 21, 36 and 51 days of age for hemagglutination inhibition (HI) and ELISA tests as well as cloacal and tracheal swabs were taken for virus isolation using chicken embryos. Signs, lesions, mortality ratio (%), serum antibody titres and virus re-isolation were compared. After vaccination, slight respiratory reactions were observed in each immunized groups. Antibody titres did not showed statistical differences on 21 and 36 days in IH tests, however, using ELISA method, the lowest antibody level was observed in group 4 ($P<0.05$) on day 36. The highest humoral antibody level was detected in group 4 chickens exposed to horizontal virus transmission, followed by the same chickens in group 3, challenged chickens in group 2, horizontal transmission chickens in group 2, challenged birds in group 3 and 4; the lowest titres were observed in chickens of group 1. Vaccine viruses were isolated from trachea swabs on group 1 a days 3 and 21 and from the group 4 on the 36 days of age. Challenge virus was isolated on the 51 days from the groups 1 and 4. The mortality ratio was 5 % in group 2, 10 % in groups 3 and amongst challengedbirds of group 4, 20 % in chickens exposed to horizontal virus transmission in group 4, 100 % mortality was detected in the group without vaccination, meantime all others showed no mortality at all. All dead birds were submitted to necropsy and lesions found were typical for Newcastle disease. Respiratory signs dominated in vaccinated chicks and they showed less signs related to the digestive organ failures than in chicks of control group. Neural signs were identical in groups 2, 4 and 5; the less significant signs were detected in the groups 1 and 3. All four vaccines and their combinations were found effective in preventions of challenge with Chimalhuacan velogenic viscerotropic virus giving at least 80 % of protection against mortality. The best protection was found in the group vaccinated simultaneously by the vaccines containing inactivated hyperconcentrated virus and live apatogen strain.

INTRODUCCIÓN.

La enfermedad de Newcastle (ENC) es ocasionada por un virus que provoca una infección altamente contagiosa y destructora que representa una seria amenaza económica para todos los sectores de la industria avícola ⁽¹⁾. Es una enfermedad que afecta a casi todas las aves domésticas y silvestres tanto jóvenes como adultas ^(2,3).

La ENC afecta especialmente a las gallinas de cualquier edad y en ocasiones a los pavos. Los gansos y los patos pueden ser portadores del agente causal y no muestran signos clínicos específicos.

La paloma es más resistente que la gallina pero puede ser portadora de la infección y rara vez se enferma. El hombre puede sufrir conjuntivitis cuando tiene contacto con el agente etiológico, ya sea personal que trabaja en granjas, plantas de procesamiento de aves o en laboratorios ⁽⁴⁾.

Los signos que se pueden asociar con la enfermedad de Newcastle ocasionada por una cepa velogénica viscerotrópica son: estornudos, estertores traqueales y bronquiales, disnea, conjuntivitis, sinusitis, exudado nasal, exudado conjuntival, anorexia, diarrea color verde esmeralda, deshidratación, depresión, torticollis, incoordinación, temblor, tics, parálisis de alas o patas, ausencia de postura de huevo y muerte. Se pueden presentar todos o algunos de estos signos, además de disminución de la conversión alimenticia en el pollo de engorda y la calidad del huevo en gallinas de postura y reproductoras ^(1,4, 5,32).

Ninguno de estos signos puede ser considerado característico de la enfermedad por lo que no deben ser utilizados como métodos de diagnóstico definitivo. Sin embargo, cualquier infección, toxina u otra condición que provoque signos semejantes, ya sean leves o severos, pueden hacer sospechar de ENC o de una infección provocada por otros agentes, por lo que se requiere de pruebas complementarias que lleven a un diagnóstico definitivo ^(5,19,20, 21).

Los virus de la enfermedad de Newcastle presentan una gran variación en cuanto a su virulencia. Existen cepas que producen infección sin ocasionar signos de enfermedad, algunas otras producen enfermedad y mortalidad de hasta un 100%. La ENC afecta sucesivamente a todas las parvadas de la explotación atacada y también a las de las granjas vecinas en el curso de pocos días si no existe protección vacunal y medidas de bioseguridad adecuadas ^(1,2,4).

La ENC es ocasionada por un paramixovirus del género *Rubulavirus* que contiene RNA, perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*. Los paramixovirus aviares pertenecen a 9 serogrupos [Paramixovirus -1 al Paramixovirus -9 (PMV - 1 al PMV -9)] de los cuales sólo el PMV-1 se relaciona con la ENC. Estos virus se replican en embriones de pollo y no presentan reacción serológica cruzada entre ellos, a excepción del PMV -3 que puede tener reacción cruzada con el PMV -1. Los serogrupos son estables antigénicamente y no llegan a mutar de un serogrupo a otro ^(5,15,19,20).

El virus de ENC sobrevive largos periodos a temperatura ambiente, especialmente en las heces; es sensible al éter e inactivado a 56°C/3 horas, 60°C/30 minutos, al pH ácido, a la formalina y al fenol ^(1,6,19).

En cuanto a su virulencia, la clasificación de las cepas depende de la velocidad con la que ocasionan la muerte embrionaria: lentógenicas (baja patogenicidad) si tarda más de 90 horas en morir el embrión o no muere, mesogénicas (moderada patogenicidad) si muere entre las 60 y 90 horas post inoculación en cavidad alantoidea y velogénicas (alta patogenicidad) si el embrión muere en menos de 60 horas postinoculación en cavidad alantoidea. Los virus también se pueden clasificar de acuerdo con los órganos más afectados y los signos clínicos que ocasionan: cepas neurotrópicas, que provocan signos clínicos y lesiones de tipo nervioso, y las cepas viscerotrópicas que dañan al sistema digestivo y provocan hemorragias

severas en las vísceras, sin la presentación de signos de tipo nervioso (5,6,7,8,19).

La ENC ha sido un serio problema para la avicultura mexicana, ya que el desarrollo de ésta se ha visto frenado por las diversas formas de presentación de la enfermedad ⁽⁵⁾.

En México existen cinco formas de presentación de la ENC clasificadas por la virulencia de las cepas :⁽³³⁾

1. Asintomática, conocida también como presentación entérica. Esta presentación solamente es detectada por métodos serológicos y aparentemente no hay signos. Las cepas involucradas son Ulster, 2C, QV4 y VG/GA ^(5,15,21,33).

2. Hitchner, que es la presentación menos severa. Las cepas pertenecientes a esta clasificación se emplean en la elaboración de vacunas activas e incluye a las cepas lentogénicas Bl, La Sota y Clon 30. Llegan a ocasionar signos respiratorios de leves a moderados y disminución de los parámetros productivos como respuesta postvacunal ^(5,21,22,23,24,33).

3. Beaudette, la cual produce signos respiratorios y disminuye la producción de huevo durante varias semanas. Pueden presentarse signos nerviosos. Las cepas involucradas son las mesogénicas y dentro de este grupo se encuentran las siguientes cepas: Roakin, Haifa-Komarov, Krananueid, cepa H y Mukteswar ^(21,23,33).

4. Beach, en esta presentación encontramos signos respiratorios y nerviosos en aves de cualquier edad. Involucra a cepas velogénicas neurotrópicas como la cepa Texas. La morbilidad puede llegar al 100% y la mortalidad puede ser del 50% en aves adultas y 90% en aves jóvenes ^(5,21,23,33).

5. Doyle, que se caracteriza por producir signos respiratorios, digestivos y nerviosos. La mortalidad alcanza el 100% en aves susceptibles. Esta es una forma aguda y letal para aves de cualquier edad. En este tipo de

presentación se encuentran las cepas mexicanas Iztapalapa, Querétaro y Chimalhuacán. La enfermedad se presenta más frecuentemente en su forma letal de velogénica y viscerotrópica en aquellas áreas con alta densidad de población avícola ^(9,20,21,22,23,33).

A partir de 1991 en el mundo se ha detectado un aumento de la incidencia de brotes de la enfermedad. En México, durante 1998 se registraron 30 focos de la enfermedad de Newcastle velogénica viscerotrópica, 20 en 1999 y más de 41 focos en el 2000 a raíz del brote en la comarca Lagunera, Coahuila, durante el cual fueron sacrificadas más de 13,610,000 aves de 93 granjas afectadas, y despobladas. El costo del brote se estimó en aproximadamente 250 millones de pesos ^(2,9).

En algunos países ha sido difícil erradicar la enfermedad de Newcastle mediante procedimientos de bioseguridad, limpieza y desinfección ya que no sólo las aves infectadas, sino también todos los materiales con los que establezcan contacto deben considerarse como transmisores o portadores intermediarios de la enfermedad de Newcastle. Esta enfermedad se propaga de una explotación a otra con las jaulas de captura y de transporte, con los restos del sacrificio, plumas, cartones, bandejas de huevos y vehículos. Las exposiciones de aves de ornato y exóticas fueron no pocas veces en el pasado, el punto de partida para que la infección se extendiera. Es indudable que el hombre desempeña un papel especial como portador intermediario pues éste puede contribuir de manera esencial a la propagación de la enfermedad con la ropa de trabajo y los zapatos sucios de heces. El contagio de un animal a otro dentro de la explotación se produce principalmente por medio del alimento y el agua contaminados. El aire polvoriento extraído de los locales por los ventiladores puede propagar rápidamente la enfermedad a las explotaciones vecinas.

En consecuencia, algunos países se han visto obligados a usar la vacunación como método de control ^(5,10).

Clasificación de las vacunas contra la enfermedad de Newcastle

Las vacunas se clasifican como de virus activo o de virus inactivo:

a) Vacunas con contenido de virus activo: dentro de este grupo están las vacunas de cepas apatógenas, las cuales son enterotrópicas, no producen enfermedad y se aislaron directamente del intestino de aves sanas. Estas cepas no inducen la producción de anticuerpos circulantes, pero proporcionan protección efectiva. Es por ello que se emplean para la elaboración de vacunas. En este grupo de virus activo se encuentran también las cepas lentogénicas adaptadas a embriones de pollo. Ejemplo de éstas son las cepas Bl, F y la Sota. Generalmente las vacunas F y Bl no provocan enfermedades nerviosas pero pueden causar la aparición de signos respiratorios leves y pasajeros. La cepa F es la que suele provocar la menor reacción y la cepa Bl provoca, por lo general, poco o ningún efecto clínico respiratorio postvacunal. Para estas vacunas la dosis óptima está comprendida entre $10^{6.5}$ y 10^7 DIEP₅₀/ave ^(7,10,12).

Las principales vías de aplicación de estas vacunas son por instilación ocular o nasal. La administración de vacunas lentogénicas a través del agua potable no siempre provoca una respuesta en cada ave lo suficientemente fuerte para que la protección conferida sea efectiva. La administración individual de las vacunas por vía intranasal o vía ocular provoca una respuesta de anticuerpos más pronunciada y más regular.

Finalmente, las vacunas mesogénicas más conocidas son elaboradas con las cepas Roakin, Komarov, Hertfordshire y Mukteswar. Para estas vacunas la dosis óptima es aproximadamente 10^5 DIEP₅₀/ave administrada por vía parenteral. Estas vacunas no son recomendables para inmunizar pollos de menos de 8 semanas de edad, ni para aves adultas que no hayan sido inmunizadas previamente con alguna vacuna lentogénica, ya que pueden causar alguna reacción por ser muy virulentas. La inmunidad conferida por estas vacunas es de gran duración. Las vacunas mesogénicas son utilizadas

para reforzar la inmunidad de los pollos previamente vacunados con virus lentogénicos. Estas vacunas son utilizadas casi únicamente en aves de traspatio y aves de combate. La vía de aplicación de estas vacunas es por vía parenteral ^(5,10,11,12).

b) Vacunas con contenido de virus inactivo: en éstas se administra formalina o betapropiolactona al líquido alantoideo del embrión de pollo infectado con una de las cepas antes mencionadas, y una base adyuvante de gel de hidróxido de aluminio o emulsiones oleosas. La vía de aplicación de las vacunas inactivadas contra la enfermedad de Newcastle es por vía subcutánea. En este grupo también se incluyen las vacunas adaptadas a cultivos de tejidos. La adaptación de cepas de la enfermedad de Newcastle de virus a cultivos de células de mamíferos ha permitido la producción de vacunas atenuadas que, aunque no contagiosas, son capaces de infectar a los pollos por inoculación. Estas vacunas se inyectan a aves completamente susceptibles y originan niveles de anticuerpos duraderos ^(7,10,11,12).

En general las dos formas principales de inmunización individual son la inoculación subcutánea y la vía ocular o nasal, las cuales dan como resultado una dosificación y una respuesta de inmunidad más uniformes en la parvada. Su principal desventaja estriba en el tratamiento y confinamiento de las aves, que produce la fatiga de las parvadas y que requiere de mano de obra capacitada y conciente.

Las cepas vacunales lentogénicas y las vacunas inactivas de gran calidad, aplicadas con precaución, pueden conferir el mismo grado de protección que las vacunas mesogénicas ^(7,11).

Como la ENC es un riesgo importante para la avicultura mexicana, la aplicación de vacunas ha sido considerada hasta ahora el mejor medio de prevención en zonas endémicas. El objetivo principal es el desarrollo de anticuerpos que protejan contra la infección del virus velogénico viscerotrópico ⁽¹²⁾.

En México las vacunas empleadas para la prevención de la enfermedad de Newcastle son controladas y reguladas por la Norma Oficial Mexicana NOM-052-ZOO-1995, la cual indica los requisitos para las vacunas y el control de la enfermedad de Newcastle, además de las medidas de bioseguridad y la posibilidad de aplicar vacunas con virus activo e inactivo, mediante varios calendarios de inmunización ^(7,8,10,11,20).

La importancia del desarrollo adecuado de la inmunidad activa contra esta enfermedad, ha provocado que día a día se busquen alternativas que permitan favorecer o potenciar la respuesta postvacunal ⁽¹³⁾ y reducir al mínimo los efectos negativos sobre la parvada durante el manejo de la vacunación ⁽¹⁴⁾.

OBJETIVOS

General:

Evaluar la protección contra el desafío con la cepa velogénica viscerotrópica Chimalhuacán de la enfermedad de Newcastle, conferida por la combinación de dos vacunas con virus activo y dos con virus inactivo.

Específicos:

- Determinar la diseminación del virus vacunal a través de las secreciones tanto de las aves vacunadas como las aves de transmisión horizontal.
- Medir el grado de inmunidad humoral estimulado por la inmunización.
- Evaluar los signos, lesiones y la mortalidad ocasionada por el virus de desafío en las aves vacunadas, no vacunadas y de transmisión horizontal.

HIPOTESIS

Las vacunas contra la enfermedad de Newcastle, elaboradas con virus apatógeno activo confieren protección similar a la estimulada por vacunas de cepa activa La Sota o virus inactivo, ante un desafío con virus velogénico visceotrópico.

JUSTIFICACION

Todo biológico debe de ser evaluado antes de ser introducido al mercado para que éste sea un producto eficaz, confiable y seguro. Además los calendarios de vacunación deben estar relacionados con el tipo de producto a utilizar, por esto es importante que el biológico sea evaluado in vitro, mediante las pruebas de potencia desafío en condiciones controladas en unidades de aislamiento para elegir las vacunas que confieren una mayor protección con menos efectos colaterales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Vacunas.

Se emplearon cuatro vacunas comerciales:

a) **Vacuna con cepa activa apatógena (AA) PHY.LMV.42.** Cada 1,000 dosis de esta vacuna fue reconstituida en 30 ml de agua bidestilada y administrada ocularmente, 30 μ l/ave.

b) **Vacuna con cepa activa lentogénica La Sota (ALS).** Cada 1,000 dosis de esta vacuna fue reconstituida en 30 ml de agua bidestilada y administrada ocularmente, 30 μ l/ave.

c) **Vacuna con cepa lentogénica inactiva (LI).** Aplicada subcutáneamente a dosis de 0.5 ml por ave, en el segundo tercio posterior del cuello del ave.

d) **Vacuna con cepa lentogénica inactiva hiperconcentrada (LIH).** Administrada subcutáneamente en el segundo tercio posterior del cuello del ave con una dosis de 0.1 ml por ave.

Las vacunas de virus activo fueron tituladas antes de su aplicación de acuerdo con la metodología descrita ⁽¹⁹⁾, fueron realizadas diluciones décuples seriadas de 10^{-1} a 10^{-9} y por cada dilución de 10^{-4} a 10^{-9} fueron inoculados 5 embriones de pollo de 9 días de edad vía cavidad alantoidea e incubados durante 7 días, registrada la mortalidad y aglutinación en placa durante ese periodo, para obtener el título por el método de Reed y Muench.

Aves

Fueron utilizadas 200 aves comerciales de pollo de engorda estirpe Ross/Ross de 1 día de edad, alojadas en las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los pollos recibieron agua y alimento comercial *ad libitum* según el requerimiento nutricional de la estirpe. Las aves fueron mantenidas en un

solo grupo apartir del día de la recepción hasta el día de la inmunización (11 días de edad) que es cuando fueron divididas por grupo. En ambos días fueron sacrificadas 25 aves para la obtención de muestras de suero. Las aves restantes fueron divididas aleatoriamente en 5 grupos e inmunizadas a los 11 días de edad de la siguiente manera:

Grupo 1 (n = 30) identificadas con anillo blanco en el tarso izquierdo e inmunizadas con 0.1 ml por ave de la vacuna "d" (**LIH**) por vía subcutánea y 30 µl por ave de la vacuna "a" (**AA**) por vía ocular.

Grupo 2 (n = 30) identificadas con anillo verde en el tarso izquierdo, fueron inoculadas con 30µl por ave de la vacuna "b" (**ALS**) por vía ocular.

Grupo 3 (n = 30) identificadas con anillo rojo en el tarso izquierdo e inoculadas con 30 µl por ave de la vacuna "a" (**AA**) por vía ocular y 0.5 ml por ave de la vacuna "c" (**LI**) por vía subcutánea.

Grupo 4 (n = 30) identificadas con anillo negro en el tarso izquierdo e inmunizadas con 30 µl por ave de la vacuna "a" (**AA**) por vía ocular.

Grupo 5 (n = 25) no estuvieron marcados y fungieron como testigo, los cuales fueron inoculados con 30 µl por ave de PBS vía ocular y 0.1 ml de PBS por ave vía subcutánea.

En cada grupo de aves hubo pollos no desafiados para confirmar la transmisión horizontal del virus de desafío. A los grupos 1, 2, 3 y 4 fueron asignados 10 aves y al grupo 5 testigo solo 5 aves.

Virus de desafío.

La cepa velogénica viscerotrópica Chimalhuacán proveniente del cepario del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, fue propagada y titulada en embriones de pollo ALPES I (Aves Libres de Patógenos Específicos, S.A., 7 Norte #416 Tehuacán, Puebla, México) de 9 días de incubación mediante la técnica descrita ⁽¹²⁾, del cual se preparó un inóculo de desafío con $10^{7.5}$ DLEP₅₀/ 0.2ml.

La patogenicidad de la cepa fue comprobada en 5 aves ALPES I de 4 semanas de edad inoculadas con 0.2 ml/ ave vía intramuscular.

Desafío

Se realizó al día 36 de edad sólo en 20 aves de cada grupo, con inóculo de $10^{7.5}$ DLEP₅₀ en 0.2 ml, vía intramuscular en el área del músculo pectoral derecho del ave. Las aves restantes de cada grupo quedaron expuestas a la transmisión horizontal del virus de desafío. A partir de las 12 horas post desafío y hasta los 51 días de edad, fueron evaluados y registrados los signos clínicos y la mortalidad.

Toma de muestras

Estudio serológico: fueron obtenidas muestras de sangre sin anticoagulante para la obtención de sueros los días 2, 11, 21, 36 y 51 de edad para ser evaluadas mediante la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI), con 10 UHA, método beta (suero diluido, virus constante), de acuerdo a la Norma Oficial con la técnica descrita ^(6,8,16), y prueba ELISA técnica indirecta (Sinbyotics Corporation, 11011 Via Frontera, San Diego, CA 92127 EUA).

Estudio virológico: se tomaron muestras de hisopos cloacales y traqueales los días 2, 11, 21, 36 y 51 de edad de las aves. Estas muestras fueron colocadas en PBS y conservadas en congelación hasta realizar el aislamiento virológico en embrión de pollo mediante la técnica descrita ⁽¹⁶⁾.

Necropsia

Fué realizado el estudio de necropsia de todas las aves muertas después del desafío, para confirmar las lesiones macroscópicas compatibles con la enfermedad de Newcastle velogénica viscerotrópica.

Análisis estadístico

Los signos y la mortalidad fueron evaluados mediante la prueba de Ji cuadrada, como proporción de las aves afectadas o muertas / total de aves observadas. Los títulos de anticuerpos fueron comparados mediante análisis de varianza.

El grado de significancia estadística de α para todas las pruebas fue del 5%.

RESULTADOS

A) Título de vacunas activas:

- Vacuna con contenido de cepa activa apatógena:
título = $10^{8.93}$ DIEP₅₀/ml.
- Vacuna con contenido de cepa activa lentogénica La Sota:
título = $10^{7.39}$ DIEP₅₀/ml.

B) Título de la cepa de desafío:

- Inóculo de desafío con $10^{7.5}$ DLEP₅₀/0.2 ml. Cepa velogénica viscerotrópica Chimalhuacán de la enfermedad de Newcastle

C) Signos:

- Postvacunal:

A las 48 horas postvacunación se observaron estornudos, estertores y secreción mucosa incolora de pico, narinas y agitación de la cabeza en los grupos 1(LIH+AA) (5 aves), grupo 2(ALS) (7 aves), grupo 3(AA+LI) (2 aves) y grupo 4(AA) (3 aves). No hubo diferencia estadística entre ellos, pero sí con respecto al grupo 5 testigo (0 aves) en donde las aves no presentaron signo alguno, $P < 0.05$.

- Postdesafío

Los signos asociados con la enfermedad de Newcastle fueron:

1) Respiratorios = estornudo y estertor traqueal; 2) Digestivos = diarrea (verde-blanco, verde esmeralda, o café); y 3) Nerviosos = tics, temblores de la cabeza, tremor muscular y tortícolis.

El cuadro 1 muestra la cantidad de aves con signos clínicos compatibles con la enfermedad de Newcastle, después del desafío. En el grupo 1(LIH+AA) los signos respiratorios se observaron entre las 24 y 168 horas postdesafío (PD), los signos digestivos se presentaron entre las 120 y 144 horas PD, no se observaron signos nerviosos en este grupo. En el grupo 2(ALS) los signos respiratorios aparecieron a las 24 horas y perduraron hasta las 168 horas PD, los signos digestivos se presentaron entre las 120 y 144 horas PD, los signos nerviosos iniciaron a las 120 horas PD y se mantuvieron hasta el fin del experimento. En el grupo 3(AA+LI) los signos respiratorios se observaron entre las 48 y 216 horas PD, los signos digestivos se presentaron de las 120 hasta las 240 horas PD, los signos nerviosos se presentaron de las 264 horas PD hasta el fin del experimento. El grupo 4(AA) manifestó los signos respiratorios entre las 48 y 216 horas PD, los signos digestivos se observaron entre las 120 y 144 horas PD, los signos nerviosos aparecieron a las 192 horas PD y perduraron hasta el fin del experimento. Las aves del grupo 5 testigo no mostraron signos respiratorios, sólo presentaron anorexia y depresión; los signos digestivos se observaron de las 72 a las 168 horas PD, mientras que los signos nerviosos se manifestaron de las 72 a las 120 horas PD.

Cuadro 1. Aves que presentaron signos después del desafío con la cepa velogénica viscerotrópica Chimalhuacan del virus de la enfermedad de Newcastle.

Horas	Grupo 1 LIH+AA			Grupo 2 ALS			Grupo 3 AA+LI			Grupo 4 AA			Grupo 5		
	R	D	N	R	D	N	R	D	N	R	D	N	R	D	N
24	3	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	5	0	0	7	0	0	2	0	0	3	0	0	0	0	0
72	3	0	0	5	0	0	4	0	0	6	0	0	0	3	2
96	5	0	0	3	0	0	1	0	0	3	0	0	0	6	3
120	4	3	0	3	3	1	5	5	0	3	3	0	0	+1	1
144	4	3	0	3	3	1	5	5	0	3	3	0	0	+2	0
168	2	0	0	2	0	2	4	3	0	3	0	0	0	+1	0
192	0	0	0	0	0	3	3	3	0	3	0	2	0	0	0
216	0	0	0	0	0	3	2	2	0	2	0	2	0	0	0
240	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	0	2	0	0	0
264	0	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	+2	‡	‡	‡
288	0	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	4	‡	‡	‡
312	0	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	4	‡	‡	‡
336	0	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	4	‡	‡	‡

R = signos respiratorios
D = signos digestivos
N = signos nerviosos
‡ Todas las aves perecieron

Las proporciones de aves con signos clínicos a partir del día del desafío se muestran en el cuadro 2. La cantidad de aves de cada grupo que manifestaron signos respiratorios fue estadísticamente menor en el grupo 5 testigo (0/25) que en el grupo 1(LIH+AA)(15/28, $P < 0.05$), grupo 2(ALS)(7/28, $P < 0.01$), grupo 3(AA+LI)(5/27, $P < 0.05$) y grupo 4(AA)(6/30, $P < 0.05$). La proporción de aves con signos digestivos fue estadísticamente mayor ($P < 0.01$) en el grupo 5 testigo (13/25) que en los grupos 1(LIH+AA)(3/28), grupo 2(ALS)(3/28), grupo 3(AA+LI)(5/27) y grupo 4(AA)(3/30). La cantidad de aves con signos nerviosos en el grupo 5 testigo (6/25) no fue diferente ($P > 0.05$) que la del grupo 2(ALS) (3/28) o el grupo 4(AA)(4/30), pero si fue mayor que la de los grupos 1(LIH+AA) (0/28, $P < 0.01$), y 3(AA+LI)(2/27, $P < 0.1$).

Cuadro 2. Comparación de la proporción de aves con signos respiratorios, digestivos y nerviosos después del desafío con la cepa velogénica viscerotrópica Chimalhuacán del virus de la enfermedad de Newcastle.

Grupo	Signos		
	Respiratorios	Digestivos	Nerviosos
1 (LIH+AA)	5/28 *	3/28	0/28
2 (ALS)	7/28 **	3/28	3/28 **
3 (AA+LI)	5/27 *	5/27	2/27
4 (AA)	6/30 *	3/30	4/30 **
5	0/25	13/25 **	6/25 **

* P < 0.05, ** P < 0.01 denotan diferencia estadística entre los valores mostrados en la misma columna

D) Mortalidad

- Postvacunación

La mortalidad del día de la vacunación al día del desafío fue como sigue: grupo 1(LIH+AA): 1 ave murió de ascitis y 1 de asfixia; grupo 2(ALS): 1 ave muerta por disfunción hepática y 1 ave sin diagnóstico; grupo 3(AA+LI): 2 aves murieron de síndrome ascítico y 1 de asfixia.

- Postdesafío

Existió una reducción altamente significativa de la mortalidad (P<0.001) en todos los grupos vacunados cuando se compararon con el grupo 5 testigo, el cual presentó 100% de mortalidad, incluso en las aves de este grupo expuestas a la transmisión horizontal (no se desafiaron intramuscularmente). No se observó mortalidad en el grupo 1(LIH+AA), y en los grupos 1(LIH+AA), grupo 2(ALS) y grupo 3(AA+LI) expuestos a la transmisión horizontal del virus de desafío. La mortalidad fue del 5% en el grupo 2(ALS), 10% tanto en el grupo 3(AA+LI) como en el grupo 4(AA) y 20% en el grupo 4(AA) expuesto a la transmisión horizontal. Las aves murieron dentro del periodo de 96 horas postdesafío excepto en el grupo 4(AA) de transmisión horizontal, en el cual los pollos murieron entre las 168 y 192 horas postdesafío, cuadro 3.

Cuadro 3. Mortalidad posterior al desafío con la cepa velogénica viscerotrópica Chimalhuacán del virus de la enfermedad de Newcastle

Grupo	Muertos / Total (%)	Tiempo de muerte postdesafío
1 LIH+AA	0 / 20 (0)	--
1 transmisión h. ^a	0 / 8 (0)	--
2 ALS	1 / 20 (5)	144 horas (6 días)
2 transmisión h. ^a	0 / 8 (0)	--
3 AA+LI	2 / 20 (10)	120 - 144 horas (5-6 días)
3 transmisión h. ^a	0 / 7 (0)	--
4 AA	2 / 20 (10)	120 - 144 horas (5-6 días)
4 transmisión h. ^a	2 / 10 (20)	168 - 192 horas (7-8 días)
5	20 / 20 (100) *	72 - 144 horas (3-6 días)
5 transmisión h. ^a	5 / 5 (100) *	48 - 336 horas (2-14 días)

^a = Aves del grupo vacunado que no fueron desafiadas directamente, pero fueron expuestas al virus de desafío por transmisión horizontal

* Indica diferencia estadística altamente significativa dentro de la misma columna (P< 0.001)

E) Lesiones

Se realizó la necropsia a las aves que murieron después del desafío, y a las que sobrevivieron al término del estudio.

- Grupo 1(LIH+AA) desafiado y Grupo 1(LIH+AA) de transmisión horizontal: no hubo mortalidad postdesafío.
- Grupo 2(ALS) desafiado: el ave que murió presentó traqueítis aguda con petequias, proventriculo con aumento de tamaño leve sin hemorragias, encéfalo con petequias e hiperemia.
- Grupo 2(ALS) de transmisión horizontal: no hubo mortalidad postdesafío.

- Grupo 3(AA+LI) desafiado: una de las aves muertas presentó proventriculitis catarral sin hemorragias, hiperemia generalizada y aumento de tamaño de las placas de Peyer, la otra ave muerta presentó lesiones típicas de la ENC como son hemorragias en grasa coronaria y abdominal, en la unión proventrículo y en ventrículo, traqueítis hemorrágica, petequias en laringe, timo, proventrículo, tonsilas cecales, placas de Peyer y encéfalo.
- Grupo 3(AA+LI) de transmisión horizontal: no hubo mortalidad postdesafío.
- Grupo 4(AA) desafiado: un ave presentó proventriculitis con hemorragias leves, aumento de tamaño con hemorragias leves en las placas de Peyer, tonsilas cecales con aumento de tamaño y petequias. En otra ave solo se observó traqueítis leve aguda.
- Grupo 4(AA) de transmisión horizontal: murieron 2 aves y presentaron traqueítis aguda, proventriculo con aumento de tamaño leve sin hemorragias.
Las 4 aves muertas de este grupo, tanto desafiadas como contacto, mostraron signos respiratorios, digestivos y nerviosos.
- Grupo 5 testigo desafiado: se encontró aumento leve del proventriculo (2/20 aves), aumento de proventriculo con petequias (2/20 aves), aumento de tamaño de las placas de Peyer y de las tonsilas cecales (2/20 aves), hematomas con necrosis en el proventriculo (18/20 aves), hemorragia de escasas a abundantes en las placas de Peyer (18/20 aves), tonsilas cecales con hemorragias y úlceras de leves a severas (18/20 aves), hiperemia pulmonar (7/20 aves), traqueítis con petequias (2/20 aves).
- Grupo 5 testigo de transmisión horizontal: 5 aves muertas, todas presentaron hemorragias en el proventrículo, las placas de Peyer y

las tonsilas cecales. Solo 3 de ellas presentaron petequias en la tráquea y hemorragias en el pulmón.

F) Pruebas serológicas

- Inhibición de la hemoaglutinación (HI)

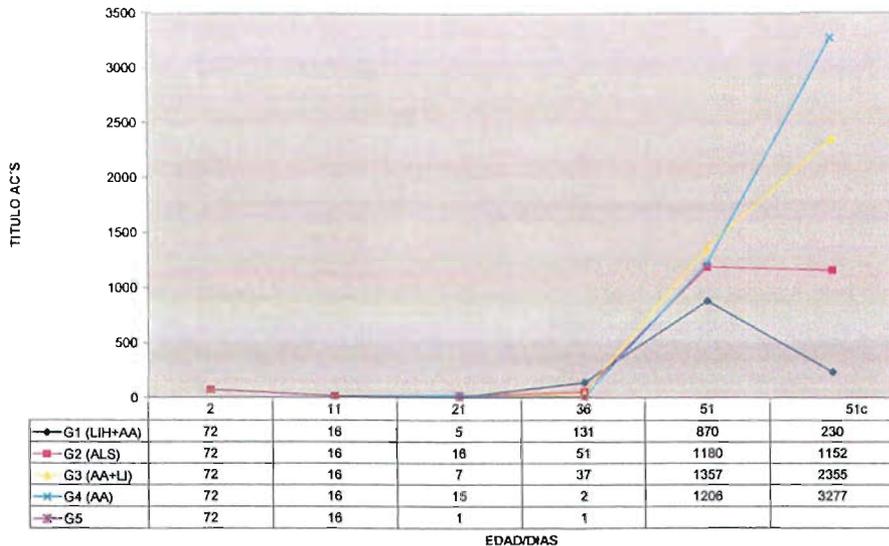
Los títulos promedio de anticuerpos obtenidos en las pruebas de HI se muestran en el cuadro 4 y gráfica 1. Los resultados de las muestras tomadas los días 2 y 11 representan la inmunidad transferida por las reproductoras. No se observó diferencia estadística ($P > 0.05$) en los títulos de anticuerpos a los 21 y 36 días (día del desafío). A los 51 días de edad no hubo sobrevivientes en el grupo 5 testigo no vacunado y desafiado; no se encontró diferencia estadística ($P > 0.05$) entre los grupos vacunados y desafiados, pero las aves de los grupos 3(AA+LI) (HI=2355) y 4(AA) (HI=3277) que se infectaron en forma horizontal presentaron títulos de anticuerpos mayores ($p < 0.05$) que las aves infectadas por transmisión horizontal de los grupos 1(LIH+AA) (HI=230) y 2(ALS) (HI=1152). En la evaluación global de los grupos a los 51 días, el mayor título de anticuerpos ($P < 0.05$) se encontró en el grupo 4(AA) de transmisión horizontal, seguido del grupo 3(AA+LI) de transmisión horizontal y luego por los grupos 2(ALS) (HI=1180), grupo 2(ALS) de transmisión horizontal, grupo 3(AA+LI) (HI=1357) y 4(AA) (HI=1206); el menor título de anticuerpos lo presentaron los grupos 1(LIH+AA) (HI=870) y grupo 1(LIH+AA) de transmisión horizontal.

Cuadro 4. Títulos obtenidos por la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (media geométrica).

Edad /días	Grupo 1 LIH+AA	Grupo 2 ALS	Grupo 3 AA+LI	Grupo 4 AA	Grupo 5
2	72 (51)				
11	16 (9)				
21	5 (4)	16 (14)	7 (5)	15 (7)	
36	131 (56)	51 (37)	37 (21)	2 (1)	1 (1)
51	870 (512)cd	1180 (813)c	1357 (1176)c	1206 (757)c	
51 transmisión horizontal	230 b (111)d	1152 b (776)c	2355 a (1783)b	3277 a (3104)a	

Grafica 1. Títulos de HI de muestras de sueros de aves inmunizadas con diferentes combinaciones de vacunas contra la enfermedad de Newcastle.

PRUEBA HI



- ELISA.

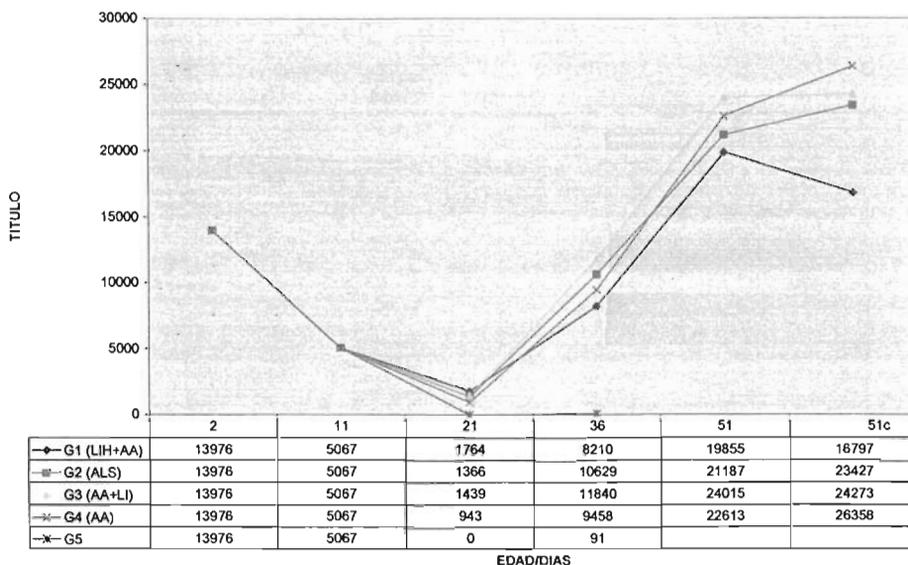
Los títulos de anticuerpos determinados por el método ELISA se muestran en el cuadro 5 y gráfica 2. A la recepción de los pollos y al día 11 de edad los títulos de anticuerpos ELISA fueron 13976 y 5067, respectivamente. Al día 21 de edad no se encontró diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los títulos de anticuerpos de los grupos vacunados. Al momento del desafío (36 días de edad), el título de anticuerpos ELISA del grupo 4(AA) (1458) no fue estadísticamente diferente ($P > 0.05$) del grupo 5 testigo (0). Los grupos vacunados 1(LIH+AA) (8210), grupo 2(ALS) (10629) y grupo 3(AA+LI) (11840) no fueron diferentes entre ellos, pero tuvieron títulos de anticuerpos más altos ($P < 0.01$) que los grupos 4(AA) y grupo 5 testigo. Al día 51 de edad existió diferencia estadística ($P < 0.01$) en los títulos de anticuerpos entre el grupo 3(AA+LI) (24015 a) y los grupo 2(ALS) (21187 bc) y grupo 1(LIH+AA) (19850 c); el grupo 4(AA) (22613 ab) no fue estadísticamente diferente ($P < 0.05$) de los grupos 2(ALS) y grupo 3(AA+LI), pero sí del grupo 1(LIH+AA). No se presentó diferencia estadística ($P > 0.05$) en el título de anticuerpos ELISA entre los grupos de transmisión horizontal 2(ALS), 3(AA+LI) y 4(AA), pero todos fueron estadísticamente superiores ($P < 0.001$) al grupo 1(LIH+AA) de transmisión horizontal. En la evaluación global de los grupos a los 51 días, el mayor título de anticuerpos se encontró en el grupo 4(AA) (26358) de transmisión horizontal, el cual fue diferente ($P < 0.001$) de los grupos 4(AA) (22613), 2(ALS) (21187), 1(LIH+AA) (19855) y 1(LIH+AA) (16797) de transmisión horizontal. El grupo 4(AA) transmisión horizontal no fue diferente estadísticamente ($P > 0.05$) de los grupos 2(ALS) de transmisión horizontal, 3(AA+LI) y 3(AA+LI) de transmisión horizontal. La menor concentración de anticuerpos ELISA la presentó el grupo 1(LIH+AA) de transmisión horizontal.

Cuadro 5. Títulos determinados por el método ELISA.

Edad /días	Grupo 1 LIH+AA	Grupo 2 ALS	Grupo 3 AA+LI	Grupo 4 AA	Grupo 5
2	13976				
11	5067				
21	1764	1366	1439	943	
36	8210 a	10629 a	11840 a	1458 b	91 b
51	19855 c (d)	21187bc (cd)	24015 a (ab)	26358 a (a)	
51 transmisión horizontal	16797 b (e)	23427 a (abc)	24273 a (ab)	26358 a (a)	

Grafica 2. Títulos de ELISA de muestras de suero de las aves vacunadas

PRUEBA ELISA



EDAD/DIAS

G) Aislamiento viral.

Los resultados del aislamiento viral a partir de las muestras de hisopo traqueal y cloacal se muestran en el cuadro 6. No se aisló virus de la enfermedad de Newcastle de las muestras tomadas los días 2 y 11. De las muestras tomadas a los 21 días, se aisló el virus de Newcastle a partir de las muestras de hisopo traqueal de los grupos 1(LIH+AA) y 3(AA+LI). A los 36 días se aisló el virus únicamente a partir de hisopo traqueal del grupo 4(AA). En las muestras del día 51 no se aisló virus de la enfermedad de Newcastle en ninguno de los grupos desafiados por vía intramuscular, pero sí se aisló el virus a partir de las muestras de hisopo cloacal de los grupos 1(LIH+AA) y 4(AA) expuestos a la transmisión horizontal del virus.

Cuadro 6. Resultados de aislamiento viral a partir de muestras de hisopo traqueal y cloacal en aves vacunadas y sobrevivientes al desafío con la cepa velogénica viscerotrópica Chimalhuacán del virus de la enfermedad de Newcastle

Edad días	Grupo 1 LIH+AA		Grupo 2 ALS		Grupo 3 AA+LI		Grupo 4 AA		Grupo 5	
	HT	HC	HT	HC	HT	HC	HT	HC	HT	HC
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
21	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
36	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
51	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	--	--
51c	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	--	--

HT = Hisopo traqueal, HC = Hisopo cloacal

(-) = Aislamiento negativo, (+) = Aislamiento positivo

51c = Aves dentro de cada grupo que no fueron desafiadas directamente, pero fueron expuestas al virus de desafío por transmisión horizontal.

-- = no se realizó

DISCUSIÓN

De acuerdo con Lancaster ⁽¹²⁾, la vacunación de las aves es la única forma específica para prevenir la enfermedad de Newcastle y las pérdidas resultantes de la infección. Cuando se diseña un programa de vacunación, debe tomarse en consideración el tipo de vacuna a utilizar, el estado de salud e inmune de las aves a vacunar, y el nivel de protección requerido en relación con la posibilidad de que se presente la infección con un virus de campo bajo las condiciones locales.

La vacunación efectiva requiere igualmente que todas las aves de la parvada sean vacunadas. Debido a que la diseminación de virus vacunal lentogénico puede ser limitada, se prefiere la vacunación individual, ocular o nasal, para obtener altos niveles de protección uniformes en la parvada. Estos métodos de aplicación estimulan la inmunidad celular y humoral local en el tracto respiratorio lo cual previene la infección de la superficie mucosa por virus de campo o reduce su replicación en este sitio. Como resultado se bloquea la invasión viral sistémica.

Reacción postvacunal

Los resultados del presente estudio muestran que los 4 grupos vacunados contra ENC, presentaron respuesta vacunal 48 horas postinmunización, por la manifestación de signos respiratorios. Como la mayoría de las vacunas comúnmente usadas en muchos países son derivadas de cepas lentogénicas de campo, estas cepas aun tienen patogenicidad residual variable y consecuentemente la reacción vacunal es inevitable. En este estudio, la baja proporción de aves con signos respiratorios postvacunales indica que las vacunas de virus activo (La Sota y apatógeno) ocasionan escasas reacciones postvacunales, por lo que las aves que la reciben no corren riesgos de bajas en la productividad ocasionada por reacción postvacunal severa. Las cepas denominadas "apatógenas" se emplean con cierta frecuencia debido a que no causan reacción vacunal en el tracto

respiratorio. Las reacciones postvacunales, de acuerdo con Butcher y Nilipour ⁽²²⁾, pueden ser más o menos severas. Ellos explican que después de vacunar a los pollos, el virus de la vacuna debe infectar las células y replicarse para aumentar su número y estimular al sistema inmune. Si la vacuna se administra adecuadamente a pollos saludables, se debe lograr una reacción respiratoria normal 2 o 3 días postvacunación. Esta reacción puede variar considerablemente. Una reacción respiratoria leve después de una vacunación es normal y necesaria para que la vacuna estimule el sistema inmunitario. Cuando estas manifestaciones respiratorias se presentan en el campo, pueden complicarse por la presencia de polvo, amoníaco, estrés, malas condiciones ambientales en general y gérmenes secundarios como *E. coli*, *Pasteurella* o los virus de bronquitis infecciosa, laringotraqueitis infecciosa, influenza aviar, etc. De acuerdo con Kennedy y cols., ⁽²⁵⁾, si los signos respiratorios no desaparecen hacia el día noveno o décimo postvacunación, pueden causar lesiones graves que conduzcan al incremento de la mortalidad.

Al-Garib y cols., ⁽²⁷⁾ encontraron niveles de anticuerpos humorales de 3 a 5 veces más altos en pollos infectados experimentalmente con la cepa Roakin que en pollos infectados con La Sota. Sin embargo, esta mejor producción de anticuerpos estuvo acompañada de reacciones postvacunales severas. Como alternativa para reducir las reacciones postvacunales severas, se ha usado la clonación para obtener virus con alta inmunogenicidad combinada con reacción vacunal aceptable. Además, el temor a las reacciones vacunales es la razón para usar la aspersion en lugar del aerosol (porque los aerosoles penetran más profundo en el tracto respiratorio inferior causando reacciones vacunales más severas) y las vacunas Clon 30 en lugar de vacunas más virulentas basadas en la cepa La Sota sin clonar.

Signología postdesafío

En el presente estudio se encontró reacción respiratoria, digestiva y nerviosa a partir de las 24 horas postdesafío en todos los grupos de aves vacunadas. A pesar de esta reacción, las vacunas protegieron contra la mortalidad por lo menos al 80% de las aves. En el grupo 5 testigo no se presentaron signos respiratorios, sólo digestivos y nerviosos a partir de las 72 horas después del desafío hasta alcanzar la muerte. En este estudio la respuesta de cada una de las vacunas fue buena, pero el grupo 1 que recibió la combinación de la cepa hiperconcentrada mas la cepa activa apatógena tuvo 100% de protección ante el desafío. Esto concuerda con Folister ⁽²⁹⁾, quien menciona que se ha mejorado la eficacia de las vacunas inactivadas de emulsiones oleosas usadas en la prevención y control de las enfermedades de los pollos para estimular altos niveles de títulos de anticuerpos circulantes y proveer protección a las aves contra el desafío del virus de Newcastle.

Lesiones postdesafío

Las lesiones encontradas en las aves muertas después del desafío en este estudio coinciden con las señaladas por Brandly ⁽¹⁾ quien describe que las lesiones macroscópicas de la ENC son principalmente hemorrágicas o inflamatorias, y varían mucho de una ave a otra por su situación, severidad y distribución, así como entre brotes y parvadas. Los casos agudos o sobreagudos suelen presentar predominantemente hemorragias, con lesión severa y extensa de la submucosa proventricular, las placas de Peyer, folículos linfoides del intestino y, en menor grado, del ventrículo. La lesión necrótico-hemorrágica de la zona contigua a las placas linfoides del intestino, incluidas las tonsilas cecales, es rasgo significativo de la infección causada por las cepas más patógenas del virus que poseen propiedades endoteliotrópicas.

Mortalidad

En el presente estudio se encontró que la protección contra el virus de la ENC se logra usando cepas vivas o inactivas. Con el uso de la vacunación de cepas no virulentas de la ENC es posible proteger a las aves susceptibles contra la enfermedad a través de la producción de anticuerpos, tanto locales como sistémicos.

La mortalidad después del desafío de las aves se presentó en este estudio a partir de las 48 horas postdesafío. Las aves manifestaron signos respiratorios más o menos severos; a partir de las 72 horas postdesafío se presentaron signos digestivos y nerviosos de moderados a severos. Las manifestaciones respiratorias y digestivas cuando se presentan en el campo, pueden complicarse por la presencia de otros agentes infecciosos.

De acuerdo con Kennedy ⁽²⁵⁾ y cols., en el grupo testigo, no se detectaron anticuerpos contra el virus de la ENC.

La mejor respuesta de anticuerpos fue inducida por la combinación de la vacuna inactiva con la vacuna viva aplicada en los grupos 1(LIH+AA) y 3(AA+LI). Después del desafío, se observó que todas las aves vacunadas obtuvieron una adecuada protección.

Respuesta serológica

Es sabido que la aplicación ocular y nasal del virus vivo atenuado en la mucosa respiratoria estimula a la inmunidad local y sistémica porque se incrementa el número de células productoras de inmunoglobulinas en la glándula de Harder y en tejidos de tracto respiratorio. Incluso ha sido demostrado que la vacunación por aspersión o vía ocular en pollitos de un día de edad es benéfica porque induce una respuesta inmunitaria local en el tracto respiratorio. En cambio la inmunización parenteral con antígeno inactivo generalmente estimula la inmunidad sistémica. Usualmente la inmunidad humoral local y sistémica se desarrolla dentro de 6 - 10 días después de la vacunación ⁽²⁷⁾.

En el presente estudio, por medio de la prueba HI, no se encontró diferencia estadística en el título de anticuerpos a los 21 y 36 días de edad de los grupos vacunados. Sin embargo, el ensayo ELISA determinó que el grupo 4 vacunado solo con la cepa apatógena presentó el menor título de anticuerpos a los 36 días de edad. Al - Garib y cols., ⁽²⁷⁾ demostraron que la prueba ELISA de captura de inmunoglobulinas, detecta IgG, IgM e IgA específicas contra ENC en suero y fluido de lavado traqueal.

En este estudio se encontró que la aplicación de una dosis de la vacuna viva de cepa apatógena (grupo 4) brindó el 80% de protección contra la mortalidad aun cuando al día del desafío los títulos de anticuerpos fueron los más bajos entre todos los grupos vacunados. Estos resultados sugieren que la vacunación con esta cepa apatógena no necesariamente debe inducir la producción de altos títulos de anticuerpos para proteger a las aves contra la mortalidad ocasionada por una cepa velogénica viscerotrópica del virus de la enfermedad de Newcastle. Las aves del grupo 4(AA) tuvieron protección semejante a la ofrecida por la vacunación simultánea de virus activo apatógeno por vía ocular y virus inactivo La Sota por vía subcutánea del grupo 3.

Las vacunas inactivadas generalmente inducen niveles extremadamente altos de anticuerpos protectores, incluso de 5 a 7 meses de inmunidad y la administración de la vacuna de virus vivo seguida por una vacuna inactivada 2-3 semanas después protege por 9-12 meses. Sin embargo, los resultados del presente estudio no mostraron diferencia en el título de anticuerpos entre los grupos que recibieron solo la vacuna de virus activo (grupos 2 y 4) (cepa La Sota y cepa apatógena); los grupos 1(LIH+AA) y 3(AA+LI) que recibieron además la vacuna inactiva. Estos resultados difieren de los publicados por Foltse y cols., ⁽²⁹⁾ quienes encontraron que la respuesta de anticuerpos inducida por la combinación de las vacunas

inactivas oleosas administradas junto con virus activo fue mejor que el inducido solo por la vacuna de cepa activa.

Trasmisión viral

El nivel de inmunidad materna, el tipo de ave (entre otras como pollo de engorda vs gallina de postura), el tipo de vacuna, el equipo de vacunación, y la habilidad del casetero, afectan el resultado de la vacunación. Los resultados de los estudios de vacunación no pueden compararse fácilmente debido a las muchas variables y las diferencias en los métodos y materiales empleados, así que el programa de vacunación ideal no puede darse fácilmente. Survashe y Desmukh ⁽²³⁾ mencionan que las cepas La Sota, B1 y F son comúnmente usadas para la vacunación de pollos jóvenes. En general la vacuna La Sota da mejor protección que la cepa B1 y además tiene una gran tendencia a difundirse de ave a ave.

Aislamiento viral

Las vacunas contra la enfermedad de Newcastle se evalúan rutinariamente sólo para probar su efectividad para inducir protección clínica, lo cual no provee información acerca del nivel de transmisión del virus vacunal. De acuerdo con Singh y cols., ⁽²⁴⁾ el virus de la enfermedad de Newcastle puede aislarse fácilmente durante la infección activa; sin embargo, la persistencia viral no ha sido definida claramente. Ha sido demostrado que la eliminación del virus varía desde muy escasa hasta prolongada entre especies de aves silvestres. Aún no ha sido diferenciado entre la persistencia detectada como eliminación prolongada del virus seguida de la infección aguda, de la persistencia manifestada como eliminación recurrente. Los intentos para detectar la eliminación del virus a partir de aves comerciales clínicamente sanas o convalecientes y de aves silvestres han dado resultados positivos y negativos. Por lo tanto, no es extraño que en el presente estudio el virus vacunal se haya recuperado a los 21 días de edad sólo del hisopo traqueal de los grupos 1(LIH+AA) y

3(AA+LI), mientras que a los 36 días sólo hubo aislamiento positivo de hisopo traqueal en el grupo 4 (AA). La detección de la persistencia del virus en sólo una de tres réplicas de un experimento citado por Singh y cols., ⁽²⁴⁾ es un ejemplo de la inconsistencia que existe dentro de estos reportes de la persistencia del virus de la enfermedad de Newcastle.

Aunque la secreción de anticuerpos tiene actividad viral neutralizante y limitante, no previene la multiplicación viral en la mucosa después del desafío. Este hecho fue evidente en el presente estudio en las aves del grupo 4(AA) que no fueron desafiadas pero que se infectaron por vía horizontal y murieron por el virus de desafío. Además, en este estudio se confirmó, por aislamiento a partir de hisopo cloacal, la transmisión horizontal del virus de desafío a las aves no desafiadas de los grupos 1(LIH+AA) y 4(AA).

Los factores que provocan los signos difieren de los factores que ocasionan la transmisión. Los signos son causados por la replicación viral en el organismo, por ejemplo en las vísceras o en el cerebro, mientras que la transmisión entre las aves ocurre a través de las secreciones contaminadas, por contacto directo, o por el aire ⁽²⁸⁾.

Debido a varios factores epidemiológicos, como bioseguridad deficiente, programas de vacunación inadecuados, situaciones de inmunodepresión, la posible transmisión de ENC por otras especies de aves incluidas la paloma, psitácidos y aves migratorias, es posible que se presente la ENC y exista la necesidad de tomar algunas medidas de prevención ⁽²⁸⁾.

De acuerdo con Dhawale ⁽²⁸⁾, la enfermedad de Newcastle en su presentación velogénica puede rebasar, bajo ciertas circunstancias, la protección conferida por los calendarios de vacunación comunes. Afortunadamente la modificación de estos programas de inmunización puede eliminar casi completamente la enfermedad de Newcastle de áreas donde esta es endémica. Aunque todos los programas de vacunación evaluados en este trabajo

protegieron por lo menos al 80% de las aves, de acuerdo con Butcher y Nilipour ⁽²²⁾ la inmunización no resuelve por sí las deficiencias de bioseguridad que puedan existir en las granjas avícolas.

De acuerdo con Al-Garib ⁽²⁷⁾ las mejoras en el control de la enfermedad de Newcastle requieren de un mejor entendimiento de los mecanismos inmunológicos que son activados por el régimen de inmunización y su efecto sobre la transmisión viral.

CONCLUSIONES

Las aves que recibieron la combinación de vacuna con cepa activa apatógena más la vacuna con cepa activa lentogénica hiperconcentrada (grupo 1), tuvieron alto niveles de anticuerpos y una protección del 100% contra la mortalidad.

Las aves vacunadas con cepa activa lentogénica La Sota (grupo 2) presentaron títulos altos de anticuerpos que les permitieron 95% de supervivencia ante el desafío.

Las aves inmunizadas simultáneamente con la cepa de virus activo apatógeno y la vacuna con cepa lentogénica inactiva (Grupo 3) resultaron con títulos altos de anticuerpos y una mortalidad del 10% después del desafío.

Las aves inmunizadas sólo con la vacuna de cepa activa apatógena (grupo 4), no desarrollaron altos títulos de anticuerpos antes del desafío, pero aun así estuvieron protegidas 80% contra la mortalidad. No se encontró diferencia estadística significativa en la mortalidad respecto a los otros grupos vacunados.

Las 4 vacunas protegieron de 80% al 100% de las aves, a pesar de que se utilizaron $10^{7.5}$ DLEP₅₀/ml como desafío, que es 32 veces más alta que la establecida por la NOM-052-ZOO-1995 (10^6 DL50/ml).

El reaislamiento de la cepa del desafío muestra que algunas aves de los grupos 1 y 4 aún eliminaban el virus 2 semanas después del desafío, lo que

muestra que estas vacunas protegen a las aves contra la mortalidad por Newcastle pero no impide la infección y eliminación del virus de campo. Las aves inmunizadas con la vacuna activa cepa la Sota (grupo 2) y las aves inoculadas con la vacuna de cepa activa apatógena más la vacuna inactiva lentogénica (grupo 3) no excretaron el virus Chimalhuacán 2 semanas después del desafío, es decir, estas 2 combinaciones de vacunas protegen mejor a las aves ya que limitan la infección y por lo tanto evitan la excreción del virus de desafío.

De acuerdo con los resultados de las pruebas serológicas ELISA y HI, las cuales mostraron un patrón semejante, el título bajo de anticuerpos que se obtuvo en el grupo inmunizado sólo con la cepa apatógena (grupo 4) fue suficiente para proteger por lo menos al 80% de las aves, porcentaje de protección que no fue estadísticamente diferente al conferido por la vacuna de cepa activa lentogénica La Sota (grupo 2) o las combinaciones de cepa activa apatógena más cepa lentogénica hiperconcentrada (grupo 1), y cepa activa apatógena más cepa inactivada lentogénica (grupo 3).

Finalmente es necesario mencionar que tanto el Médico Veterinario como el avicultor deben trabajar conjuntamente realizando muestreos periódicos en sus parvadas, ya que con esto puede llegar a comprobar la calidad de productos utilizados en su granja y de otros beneficios como la prevención de enfermedades, para así poder actuar lo antes posible, logrando así equilibrar la relación costo - beneficio y evitar pérdidas económicas.

Además de llevar un adecuado programa de vacunación eficaz, para esto es necesario considerar las buenas prácticas de manejo y bioseguridad con responsabilidad.

LITERATURA CITADA:

1. Brandly CA. Enfermedad de Newcastle. Biester HE, Schwarte LH, Pérez LJ, Ortega J, editores. Enfermedades de las aves. Washington: Editorial Hispanoamericana, 2001: 473-484.
2. Ortíz NM, Fehervari BT, Huerta LB, Ledesma N, Téllez G. Caracterización molecular de aislamientos mexicanos del virus de la enfermedad de Newcastle. Memorias de la XXVII Convención Anual ANECA; 2002 mayo 1-4, Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2002: 77-79.
3. Michael MC. Enfermedad de Newcastle velogénico viscerotrópico. Información Saninet [serial on line] 2003 [citado 23 de abril del 2003]; [5 páginas]. Disponible en: URL <http://www.iicasaninet.net/pub/sanani/html/exoticas/envv.htm>
4. Dorn P. Peste aviar, peste aviar atípica o enfermedad de Newcastle. En Manual de Patología Aviar. 3ra ed. Alemania: Mc-graw-Hill, 1973: 46-54.
5. Alexander DJ. Newcastle diseases and other paramyxovirus infection. In: Calnek BW, editor. Diseases of poultry. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1997: 541-570
6. Muñoz P, Toscano CA, Chapa BJ, Lucio DE. Evaluación de la protección contra la enfermedad de Newcastle ante un desafío, utilizando diferentes calendarios de vacunación: Memorias convención anual ANECA; 2002 mayo 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2002: 98-100.
7. Office International des Epizooties. Enfermedad de Newcastle. Office International des Epizooties [serial on line] 2002 abril [citado 24 de abril del 2003]; [4 páginas]. Disponible en: URL http://www.ioe.int/esp/maladies/fiches/e_A160.htm

8. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-052-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las vacunas empleadas en la prevención y control de la enfermedad de Newcastle. México (DF): 28 de febrero de 1997.
9. Woernle H. Enfermedad de Newcastle. En: Enfermedades víricas más frecuentes en la época de puesta o tras la adquisición de aves. 1er ed. Alemania: Verlag Eugen Ulmer & Co, 1999: 90-92.
10. Juárez M, Petrone MV, Fehervari BT. Caracterización biológica de cuatro cepas velogénicas y una lentogénica del virus de la enfermedad de Newcastle: Memorias convención anual ANECA; 2002 mayo 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2002:79-81.
11. Medina H. Experiences with killed oil emulsion Newcastle disease virus vaccine on day old turkey poults in the Midwest: Memorias convención anual ANECA; 2002 mayo 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2002: 103-105.
12. Lancaster EJ. Vacunas contra la enfermedad de Newcastle. Pruebas de potencia y otras pruebas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1985: 54-70.
13. Rubio GME, Ledesma MN, Sánchez RE: Comparison of one immunostimulant and one antistress compound on the immune response to Newcastle disease, and their effect on broiler productivity: Memorias convención anual ANECA; 2002 mayo 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2002: 95-98.
14. Solís S. Situación de la campaña nacional contra la enfermedad de Newcastle: Memorias curso de enfermedades emergentes ANECA; México

- (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2000: 20-28.
15. Barri CA. Caracterización Histopatológica en encéfalos de pollos libres de patógenos específicos experimentalmente infectados con el virus de la enfermedad de Newcastle cepa Chimalhuacan (tesis de licenciatura). México (DF): Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2001.
 16. Perusquia JT, Paash L. Necropsias en aves. Curso de especialización en producción animal. 2nd ed. México: Editorial Trillas, 1991: 65-77.
 17. Villegas P. Chicken embryo inoculation routes. En: Avian virus diseases, laboratory manual. College of Veterinary Medicine. Athens, Georgia, 1990: 1-8.
 18. Alexander DJ. Paramyxovirus infection. In: McFerran JB and McNulty MS editors. Virus infections of birds. London: Elsevier Science Publishers, 1993; 22: 321-340.
 19. Alexander DJ. Newcastle disease virus and other paramyxovirus. In: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM, editors. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4ta ed. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists, 1998: 156-163.
 20. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-013-ZOO-1994, Campaña nacional contra la enfermedad de Newcastle presentación velogénica. México (DF): 7 de febrero de 1995.
 21. Kouwehoven B. Newcastle disease. In: McFerran JB and McNulty MS, editors. Virus infections of birds. New York, United States of America: Elsevier Science Publishers, 1993: 341-361.
 22. Butcher G, Nilipour A, Díaz C. Reacciones de la Vacuna de Newcastle y Bronquitis Infecciosa en los Pollos. En: Industria Avícola. Panamá; marzo 2001:17-19.

23. Survashe BD, Desmukh SG. Newcastle disease prevention and control. In: Poultry International, February 1998: 26-28.
24. Singh BP, Chauhan RS. Vaccine Failures. In: Poultry International, September 1999: 84-87.
25. Kennedy ME, Rouilly and Anderson CE. Vacunas activas e inactivas contra la Enfermedad de Newcastle. Boletín de la sociedad de Biología de concepción, junio del 2002; 52: 227-243.
26. Survashe B.D, Desmukh S.G. Newcastle Disease Prevention and Control. Poultry International, February 1998. pp: 26-28.
27. Al-Garib SO, Gielkens ALJ, Guys E, Haetog L, and Koch G. Immunoglobulin Class Distribution of Systemic and Mucosal Antibody Responses to Newcastle Disease in Chickens. In: Avian Diseases Edit. January-march 2003; 47(1): 32-40.
28. Dhawale Avinash. Control of Very Virulent Newcastle Disease in India. In: Poultry International, November 2001: 36-38.
29. Folitse Raphael, Halvorson DA and Sivanandan V. Efficacy of combined killed in oil emulsion and live Newcastle disease vaccines in chickens. In: Avian Diseases, 1998; 42: 173-178.
30. Beard CW, Villegas P, and Glisson R. Comparative efficacy of the B-1 and VG/GA vaccine strain against velogenic viscerotropic Newcastle disease virus in chickens. In: Avian Diseases, 1993; 37: 222-225.
31. Mass RA, Oei HL, Venema-Kemper S, Koch G. and Bongers J. Dose-response effects of inactivated Newcastle disease vaccines: influence of serologic assay, time after vaccination, and type of chickens. In: Avian Disease, 1999; 43: 670-677.
32. Fehervari Bone Tamas. Fundamentos moleculares de la patogenicidad del virus de la enfermedad de Newcastle: Memorias de la XI Jornadas Médico Avícolas; 2005 febrero 23-25; UNAM- FMVZ Ciudad Universitaria,

México. México (DF): Departamento de Producción Animal: Aves. 2005: 64-72.

33. Castro M. Enfermedad de Newcastle. En: Material de estudio area: Aves. Clínica de las aves. Sistema Universidad Abierta UNAM, 1998;II: 289-298.