

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

**COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS DE
INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (HI) Y LA PRUEBA
DE INMUNO ENSAYO DE ENZIMA ASOCIADA (ELISA) EN LA
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CIRCULANTES CONTRA LA
ENFERMEDAD DE NEWCASTLE**

MAYRA LISSETTE MOTTA PADILLA

GUATEMALA, OCTUBRE 2002

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS DE
INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (HI) Y LA PRUEBA
DE INMUNO ENSAYO DE ENZIMA ASOCIADA (ELISA) EN LA
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CIRCULANTES CONTRA LA
ENFERMEDAD DE NEWCASTLE**

**PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

POR

MAYRA LISSETTE MOTTA PADILLA

AL CONFERÍRSELE EL GRADO ACADEMICO DE

MEDICO VETERINARIO

GUATEMALA, OCTUBRE DEL 2002

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO: Dr. Mario Llerena Quan

SECRETARIO: Lic. Robin Ibarra

VOCAL PRIMERO: Lic. Carlos Saavedra

VOCAL SEGUNDO: Dr. Fredy González

VOCAL TERCERO: Lic. Eduardo Spiegeler

VOCAL CUARTO: Br. Manuel Arenas

VOCAL QUINTO: Br. Alejandro Chávez

ASESORES:

Dra. Lucero Serrano de Gaitán

Dra. Consuelo Beatriz Santizo

Dra. Elizabeth Padilla de Motta

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

CUMPLIENDO CON LO ESTABLECIDO POR LOS ESTATUTOS DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA PRESENTO A
CONSIDERACIÓN DE USTEDES EL TRABAJO DE TESIS TITULADO:

**COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS DE
INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (HI) Y LA PRUEBA
DE INMUNO ENSAYO DE ENZIMA ASOCIADA (ELISA) EN LA
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CIRCULANTES CONTRA LA
ENFERMEDAD DE NEWCASTLE**

CON REQUISITO PREVIO A OPTAR AL TITULO PROFESIONAL DE

MEDICO VETERINARIO

TESIS QUE DEDICO

A DIOS	Por ser mi guía, consuelo y apoyo durante toda mi vida.
A LA VIRGEN	Por llevarme siempre de su mano.
A MIS PADRES	Mario Antonio Motta González, Elizabeth Padilla de Motta, por creer siempre en mí.
A MIS HERMANOS	Karla, Mario Roberto y Giovanni, por todo su apoyo
A MIS ABUELITOS	Efraín Roberto Padilla (QEPD) Marina Paz de Padilla Elena de Arriaga Benjamín Motta (QEPD) Triny de Motta (QEPD)
A MI FAMILIA	Padilla Solórzano, Dávila Padilla, Villagrán Padilla, Dávila Frantzen, Villagrán Rivas Por su apoyo incondicional
A	Héctor Ariel Román, gracias por ser parte de mi vida.
A MI AMIGA	Susanna Huertas (QEPD), nunca te olvidaré.
A MIS AMIGAS	Lucrecia Arens, Jessica Pacas, Vanesa Centeno, Evelyn Gutiérrez y Lorena de Rodríguez
A MIS AMIGOS	Ramón Vidaurre, Miguel Rivera, Mario Velasco, Mario Díaz, Francisco Escobar, Federico Villatoro, José Hurtarte, David Moran, Juan Manuel Ruiz.
TO	Steve Mathis, Thank you for being there for me.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

A LA VIRGEN

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

A MIS PADRES Dr. Mario Antonio Motta y Dra. Elizabeth Padilla de Motta, por su apoyo y paciencia.

A MIS ASESORES Dra. Lucero Serrano, Dra. Beatriz Santizo, Dra. Elizabeth Padilla de Motta por todas las horas de paciencia

A MI AMIGO Francisco Escobar, por su ayuda en el laboratorio.

AL LABORATORIO DE ORNITOPATOLOGÍA Y AVICULTURA (LOA) Por su colaboración y ayuda otorgada.

A MIS AMIGOS Hugo Blanco y Dalybert Westler, por su gran apoyo.

A LOS DOCTORES Fredy Gonzáles y Jaime Méndez por su valiosa ayuda.

A MIS CATEDRÁTICOS Que con su ejemplo me ayudaron a ser cada día mejor.

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE DE UNA U OTRA FORMA PARTICIPARON EN LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.

A TODOS USTEDES MIL GRACIAS

INDICE

I INTRODUCCIÓN	8
II HIPOTESIS	10
III OBJETIVOS	11
IV REVISION DE LITERATURA	12
4.1.5 EPIDEMIOLOGÍA	19
4.1.5.1 Distribución	19
4.1.5.2 TRANSMISIÓN	19
4.1.5.3 FUENTES DE INFECCIÓN	20
4.1.5.4 SUSCEPTIBILIDAD	23
4.1.6 SIGNOS CLINICOS	25
4.1.6.1 PERIODO DE INCUBACIÓN	25
4.1.7 DIAGNÓSTICO	27
4.1.7.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO	27
4.1.7.2 AISLAMIENTO DEL VIRUS	28
4.1.7.3 SEROLOGÍA	28
4.1.8 PREVENCIÓN Y CONTROL	32
4.1.8.1 PROCEDIMIENTOS DE VACUNACIÓN	34
4.1.8.2 VACUNAS	35
4.2 SISTEMA INMUNE	36
4.2.1 ÓRGANOS LINFOIDES PRIMARIOS	37
4.2.2 ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS	40
V MATERIALES Y METODOS	42
5.1 MATERIALES	42
5.2 METODOLOGÍA	43
VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
VIII CONCLUSIONES	58
IX RECOMENDACIONES	60
X RESUMEN	61
XI ANEXOS	63
XI BIBLIOGRAFÍA	88

I INTRODUCCIÓN

La producción avícola de Guatemala en los últimos años ha mostrado un incremento constante del 5% a nivel nacional y un promedio de un 5.5% a nivel internacional obligado por la demanda en el mercado de consumo. Esto ha exigido hacer uso de alta tecnología, para obtener productos de bajo costo para alimentar a la población con una proteína de alta calidad, como lo son el huevo y carne de pollo. También se ha visto favorecida su demanda por su precio accesible al consumidor. Los subproductos avícolas como gallinaza o pollinaza ocupan un lugar en el mercado nacional ya que son utilizados en la nutrición de otras especies, particularmente los rumiantes, además de ser utilizados como fertilizante en cultivos agrícolas.

La avicultura en Guatemala debido a su explotación intensiva, está constantemente amenazada por diferentes enfermedades, que cuando se presentan provocan dramáticas pérdidas en la producción por lo que es necesario mantener estrictos controles de vacunación para proteger la salud de las parvadas. Esto ha exigido a los productores a estar siempre a la vanguardia, y ha mantener su eficiencia en la producción para cumplir con la demanda de los productos avícolas.

Entre las enfermedades aviares la enfermedad de Newcastle es una de las principales y de las que más daño causan a la avicultura, la misma tiene un origen viral, es altamente contagiosa, y afecta tanto a aves

domésticas como silvestres. Entre sus síntomas se citan signos respiratorios, gastrointestinales y las aves que sobreviven, quedan con signos nerviosos que se observan en la etapa final de la enfermedad; es por ello particularmente importante conocer el grado de inmunidad o protección que poseen las aves, por lo que se hace necesario cuantificar el nivel de anticuerpos circulantes de la parvada como respuesta a una vacunación. La presente investigación tendrá como objetivo comparar las dos pruebas serológicas de mayor uso en nuestro medio para medir el nivel de anticuerpos circulantes contra de la enfermedad de Newcastle en las aves, la de Inhibición de la hemoaglutinación (HI) y Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA).

Es de trascendencia determinar la similitud o correlación existente entre estas pruebas en cuanto a la medición de anticuerpos. La importancia de este estudio también radica en establecer cual es más económica y de fácil ejecución, esto debido a que la infraestructura zoosanitaria del país obliga a buscar un método más confiable, sencillo y de menor costo.

II HIPOTESIS

No Existe correlación entre los resultados obtenidos de niveles de anticuerpos circulantes contra la enfermedad de Newcastle usando los métodos de HI y ELISA.

III OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- ✚ Determinar si hay diferencia entre los resultados de detección de anticuerpos circulantes contra la enfermedad de Newcastle, por los métodos de HI y ELISA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✚ Establecer la correlación existente entre las dos pruebas.
- ✚ Comprobar la concordancia de los resultados obtenidos en las dos pruebas.
- ✚ Determinar la Sensibilidad y especificidad de cada una de las pruebas.
- ✚ Establecer cual de los métodos ofrece mayor rapidez para el diagnóstico.
- ✚ Evaluar cual de los métodos es más económico.

IV REVISION DE LITERATURA

4.1 ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

4.1.1 Definición

Es una enfermedad viral altamente contagiosa de curso agudo, y de difusión rápida en las aves domésticas y silvestres, en las que afecta los sistemas respiratorio, digestivo y nervioso. Se caracteriza por tener alta morbilidad y la mortalidad puede variar entre el 0% y 100%, dependiendo de la cepa involucrada, la edad, estado nutricional e inmunidad de las aves. En el hombre puede ocasionar una conjuntivitis por contacto accidental del virus ya sea vacunal o de campo, en el laboratorio de diagnóstico o en la producción de biológicos. (9,14, 17, 23, 25)

4.1.2. Sinónimos

Estos se han dado por los órganos o sistemas afectados y por la mortalidad causada.

- Pneumoencefalitis aviar
- Paramixovirus 1
- Pseudopeste aviar
- Enfermedad de Coshen
- Enfermedad de Ranikhet
- Peste asiática
- Moquillo Aviario
- Dandi Seco
- Enfermedad Tetelo
- Enfermedad de Doyle (Newcastle vicerotrópico)
- Enfermedad de Beach (Newcastle velogénico)
- Enfermedad de Beudette (Newcastle mesogénico)
- Enfermedad de Hitchner (Newcastle lentogénico) (1, 7, 18)

4.1.3 HISTORIA

Los primeros brotes de la Enfermedad de Newcastle se presentaron en 1926 en Indonesia e Inglaterra, específicamente en el condado de Newcastle; debido a este primer aislamiento se le dio el nombre de enfermedad de Newcastle. Sin embargo Ochi y Hashinomoto, indican que la enfermedad pudo haberse presentado en Corea desde 1924. En 1930-1940 en Estados Unidos se presentó una enfermedad respiratoria relativamente benigna que manifestaba signos nerviosos, a la cual se le llamó *neumoencefalitis aviar*, y se demostró que era provocado por un virus indistinguible del virus causante de la enfermedad de Newcastle por pruebas serológicas. (7, 25)

La segunda panzootia de la enfermedad de NC ocurrida a finales de los años 1960s e inicios de los 70's se caracterizó por la introducción de Newcastle Velogénico Vicerotrópico (VVNDV) en muchos países a través del comercio de aves de compañía principalmente del grupo psittacideas que eran portadores del virus. (11)

La primera evidencia de que virus de moderada virulencia podían adquirir alta virulencia ocurrió en un brote en pollos en Gran Bretaña en 1984. (11)

En 1992 en Estados Unidos, el virus de la Enfermedad de Newcastle (VENC) fue aislado en un brote que produjo la muerte a cuervos acuáticos. Los cuales son una especie migratoria. El brote se extendió a pavos criados en las cercanías del lago donde ocurrió el brote en los cuervos migratorios. (11)

4.1.4 ETIOLOGÍA

La enfermedad de Newcastle es causada por un virus que pertenece a la familia Paramyxoviridae, género Paramyxovirus. Dentro de este género, se reconocen nueve serogrupos de paramixovirus aviares (PMV-1 a PMV-9) entre los cuales el virus de la enfermedad de Newcastle o Paramyxovirus 1 (PMV-1) es el patógeno más importante que afecta todo tipo de aves; aunque PMV-2 y PMV-3 pueden ocasionar enfermedades graves. (1, 3, 7, 11, 13, 15, 18, 25)

El virus posee 3 toxinas:

a. Hemolisina

El virus de la enfermedad de NC y otros paramixovirus pueden provocar la hemólisis de eritrocitos. (7)

b. Hemoaglutinina

El virus de la enfermedad de Newcastle se caracteriza por su capacidad de aglutinar los glóbulos rojos de aves y del hombre. Esta hemoaglutinación se debe a la presencia de

la proteína conocida como Hemoaglutinina, proteína que junto con la Neuraminidasa se proyectan en la superficie del virus. Otra proteína que es parte del virus es la proteína E responsable de la adhesión de la membrana del virus con la célula huésped durante el ciclo de replicación y constituye las proyecciones menores de la superficie del virus. Estas dos proteínas son importantes antígenos en la respuesta inmune inducida por el virus de Newcastle en las aves. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra estas dos proteínas, neutralizan el virus in vivo e in vitro. (7,12)

La capacidad del virus de la enfermedad de NC para aglutinar células rojas se debe a la fijación de la proteína HN a los receptores sobre la superficie de los eritrocitos. Esta propiedad y la inhibición específica de aglutinación por antisueros son instrumentos muy útiles en el diagnóstico de la enfermedad. (7)

c. Neuroaminidasa

Esta también es parte de la proteína HN y está presente en todos los miembros del género *Paramixovirus*. Esta enzima causa la elusión gradual de eritrocitos aglutinados. (7)

El virus se replica fácilmente en embrión de pollo de 9 - 11 días de incubación y en histocultivos. (18)

Las diferentes cepas del virus de la enfermedad de Newcastle varían ampliamente en virulencia y tropismo tisular. Están clasificados basándose en el tiempo en que matan al embrión de pollo bajo condiciones definidas; esto a permitido agruparlos en tres grupos de cepas:

- Velogénico: Altamente patógeno. Mata al embrión en 60 horas.
- Mesogénico: Moderadamente patógeno. Mata al embrión entre 60 - 90 horas.
- Lentogénico: Baja patogenicidad. Mata al embrión en más de 90 horas. Algunas cepas lentogénicas del virus de la enfermedad de Newcastle son consideradas como avirulentas. (3, 7, 9, 23, 25)

La severidad de la enfermedad depende de la cepa involucrada. Por esta razón, cuando se aísla un paramixovirus de un brote de la ENC, deben clasificarse con el objeto de distinguir cepas de alta y baja patogenicidad. Beard y Hanson en Estados Unidos clasificaron las diferentes cepas del virus en cinco patotipos de acuerdo con la forma de la enfermedad y los signos clínicos presentes. (21)

- A. **Newcastle velogénico viscerotrópico:** (VVNC) Enfermedad letal aguda en pollos de todas las edades, generalmente con producción de hemorragias y necrosis en el tracto digestivo, con alta morbilidad y mortalidad que puede llegar a matar a todas las aves, aunque depende de la inmunidad presente. Las cepas Milano y Herts 33 son un ejemplo de este patotipo. (21)
- B. **Newcastle velogénico neurotrópico:** (VNNC) Se caracteriza por alta mortalidad con desarrollo de síntomas respiratorios y nerviosos. Este tipo de enfermedad es fácilmente reconocido. La cepa representativa de este patotipo es la Texas GB. (21)
- C. **Newcastle mesogénico:** (MNC) Causa mortalidad baja y en algunas aves síntomas respiratorios agudos y nerviosos. La cepa más conocida es la cepa Roakin. En algunas vacunas emulsionadas se utiliza como antígeno. (21)
- D. **Newcastle lentogénico:** (LNC) Está representado por una forma respiratoria muy suave de la enfermedad producida por cepas lentogénicas que son generalmente usadas como vacunas vivas. Entre ellas se encuentran las cepas Hitchner B1, La Sota y el Clon 30. (20, 21)

E. *Newcastle asintomático*: (ANC) En esta forma de la enfermedad no se observan síntomas clínicos y las cepas tiene mayor predilección por el tracto digestivo. Como ejemplo están las cepas Ulster 2C, V4 y VG/Georgia. (21)

Los paramixovirus consisten de una molécula sencilla de RNA de cadena sencilla. La secuencia de nucleótidos del genoma del virus de la enfermedad de Newcastle, se sabe que se forma de 15,156 nucleótidos. (7,19, 23, 25)

PERSISTENCIA DEL VIRUS

En cuanto a la persistencia, el virus de la enfermedad de Newcastle es relativamente estable en la naturaleza, se mantiene infectivo por semanas a baja temperatura y sobrevive por muchas horas en un amplio rango de pH (3-10); aunque parece más susceptible a la acción de los álcalis que a la de los ácidos. El virus puede sobrevivir por meses a temperatura ambiente en huevos puestos por aves infectadas, en basura puede sobrevivir por 20 días, y en agua, suelo, carcazas y plumas por 255 días. Sobrevive en carne y hueso por 6 meses a -20°C y por 4 meses en temperatura de refrigeración. (3,4)

La luz solar directa inactiva el virus en 30 minutos. Se ha asociado la presencia de lípidos en el revestimiento del virus de la enfermedad de Newcastle, con el grado de susceptibilidad a todos los desinfectantes que contienen detergente. (3)

4.1.5 EPIDEMIOLOGÍA

4.1.5.1 Distribución

Cepas de la enfermedad de Newcastle están presentes en casi todos los países. (3,6, 9, 16)

La enfermedad fue observada por primera vez en Java en el año de 1926 y a finales de ese año se diseminó al condado de Newcastle en Inglaterra donde fue aislado e identificado el virus por primera vez. (3)

En Australia, Nueva Zelanda y Papua, Nueva Guinea están libres de cepas patógenas de la enfermedad de Newcastle. En Australia no se ha observado la enfermedad de Newcastle virulenta desde el año de 1932; pero son endémicas las cepas avirulentas de la enfermedad. El prototipo de estas cepas fue identificado en 1966 y designado V4. La virulencia de la cepa V4 es tan baja que ha sido la base para las vacunas de la enfermedad de Newcastle. (3, 9)

4.1.5.2 TRANSMISIÓN

La diseminación del virus de la enfermedad de Newcastle se le ha atribuido al movimiento de aves clínicamente sanas pero que liberan virus (incluyendo las aves vacunadas). La transmisión es por contacto directo con productos infectados, por aerosoles y secreciones de aves infectadas.

Puede ocurrir transmisión mecánica por el calzado, ropa, piel, alimento, camiones, equipo, etc. (1, 3, 4, 5, 7, 14, 16)

4.1.5.3 FUENTES DE INFECCIÓN

El virus se puede aislar de todas las secreciones respiratorias y de las heces, así como de todos los órganos y tejidos de las aves muertas por causa del virus de la ENC. El virus es eliminado durante el periodo de incubación y por un periodo limitado durante la convalecencia. Se ha demostrado que algunos psitácidos eliminan el virus de la enfermedad de Newcastle durante más de un año de manera intermitente, y han sido los responsables de las panzootias en varias partes del mundo. (1, 5, 12, 16)

Las aves acuáticas pueden excretar el virus por más de 6 semanas, aunque generalmente son refractarias a la infección. Se han aislado cepas de del virus de NC de patos y gansos tipificados como lentogénicos y termoestables. (1, 3)

En las aves vivas enfermas de ENC, el virus está presente en la mayoría de secreciones tisulares y excreciones de las aves infectadas de forma aguda empezando 24 horas antes de que aparezcan los signos clínicos. Se ha reportado que se puede recuperar el virus de las aves por lo menos 7 días después de la infección. (3)

En la carcasa el virus puede permanecer viable hasta que la descomposición esté bien avanzada. Es estable en tejidos no putrefactos y en muestras de órganos o heces si no han sido expuestos a altas temperaturas; se ha aislado de la médula ósea de aves que han sido mantenida por varios días a 30° C. (3, 16)

Las aves beneficiadas durante un brote, pueden ser una fuente de contaminación significativa de virus. Y puede ser recuperado de músculo después de 250 días conservada a -14° C a -20° C y de piel y médula ósea después de 250 días a -4° C. (3)

Hay evidencia que alimentaron a aves susceptibles con desechos de aves no cocinados y esto ayudó a la diseminación de la enfermedad de Newcastle en Melbourne en 1930 y 1932. La temperatura mínima acordada para inactivar el virus de Newcastle:

- * 70° C por un mínimo de 30 minutos
- * 75° C por un mínimo de 5 minutos
- * 80° C por un mínimo de 1 minuto

Aunque muchas aves afectadas dejarán de poner huevos, los huevos puestos durante la fase temprana del brote pueden acarrear el virus de la enfermedad de Newcastle en la superficie y contaminar las empacadoras. El virus puede

penetrar la cáscara rajada o intacta o más significativamente contaminar las empacadoras. La supervivencia del virus en la cáscara del huevo y en las empacadoras es suficiente como para diseminarlo ampliamente por medio de los separadores contaminados. (3)

Para eliminar el virus del huevo se recomienda usar el siguiente proceso de pasteurización:

- * Huevo entero: 2.5 minutos a 64.5° C
- * Yema de huevo: 3.5 minutos a 60° C
- * Clara de huevo: 9 minutos a 55.5° C

Se considera que las formas de diseminación más importantes son:

- ❖ Movimiento de Psitácidas vivas, aves mascotas exóticas, aves de combate, palomas de competencia, aves comerciales.
- ❖ Aves silvestres.
- ❖ Movimiento de gente y equipo de un área infectada a una susceptible.
- ❖ Movimiento de productos y subproductos avícolas contaminados.
- ❖ Diseminación por corrientes de viento.
- ❖ Alimento y agua contaminado.
- ❖ Moscas.
- ❖ Vacunas

4.1.5.4 SUSCEPTIBILIDAD

La enfermedad afecta a casi todas las especies de aves tanto domésticas como silvestres. En los mamíferos se ha reportado una infección natural en el hombre y en los roedores. (1, 3, 14)

Pollos : son altamente susceptibles al virus de la enfermedad de Newcastle, incluyendo la variante PMV1, considerados como los más susceptibles. (3)

Pavos : Son susceptibles a la enfermedad de Newcastle y a brotes, usualmente menos severo que en pollos. Algunos brotes han causado alta mortalidad otros, parálisis en las patas. (3)

Palomas: Son susceptibles, y la variante de PMV1 puede producir hasta un 80% de mortalidad con signos nerviosos y diarrea. (3)

Patos y Gansos: Usualmente refractarios a la enfermedad de Newcastle pero puede ocurrir, algunas veces con parálisis de las patas y alas. Los signos respiratorios no han sido reportados y la morbilidad en los brotes es usualmente menos del 10%. Se ha encontrado que los patos clínicamente infectados excretan el virus por más de 6 semanas. (3)

Pavos, Gallinas de Guinea, Faisanes: Todas son susceptibles a la infección natural de la enfermedad de Newcastle, aunque la manifestación clínica es leve, se ha observado mortalidad. (3)

Codorniz: Es un ave muy susceptible a padecer la enfermedad. (3)

Canarios : Son susceptibles a la infección, la cual produce una enfermedad suave o inaparente aunque se ha reportado 20-30% de mortalidad en infecciones experimentales en donde predominaron los signos nerviosos. (3)

Psitácidos : Son altamente susceptibles a la enfermedad de Newcastle; Los signos nerviosos predominan cuando hay enfermedad clínica. Los loros tropicales son reservorios del cepas velogénicas de la enfermedad de Newcastle y han sido los responsables de haber introducido la enfermedad a los Estados Unidos de Norte América desde América Latina. Los psitácidos infectados pueden excretar el virus hasta por 1 año. (3)

Avestruces: En un brote en Israel, 13 de 46 avestruces en edad de 5-9 meses murieron con signos nerviosos típicos de la enfermedad de Newcastle. Se aisló la cepa virulenta Israel - 67 del virus de la enfermedad de Newcastle. (3)

En 1993 ocurrieron 3 brotes en granjas de avestruces en África del Sur. El rango de mortalidad fue bajo y se limitó a un grupo en particular.

Aves Acuáticas Silvestres : Es otro reservorio de la enfermedad de Newcastle, pero usualmente están asociados con virus avirulentos que se replican en el intestino. (3)

Humanos : La mayoría de infecciones han ocurrido a los trabajadores de laboratorios de producción de biológicos. Pero también puede ocurrir en los vacunadores y a personas que evisceran y preparan a las aves para el mercado. (1, 3)

Es poco frecuente, pero las personas expuestas al virus de la enfermedad de Newcastle sufren de dolor de cabeza, congestión, lagrimeo, síntomas similares a gripe, y pueden desarrollar conjuntivitis, usualmente leve y persistente de 1-2 días. En ocasiones puede convertirse en conjuntivitis muy severa y puede hasta llevar a problemas de visión. (1, 3)

Se sospechó de una transmisión de persona a persona durante un brote en California en 1971-1972. (3)

4.1.6 SIGNOS CLINICOS

4.1.6.1 PERIODO DE INCUBACIÓN

El periodo de incubación es generalmente corto para aves jóvenes. Puede variar de 2 a 15 días siendo como promedio de 5 días (3, 7, 16).

Esto varia dependiendo de:

- ❖ Virus infectante
- ❖ Especie del huésped, edad y estado inmune
- ❖ Infección con otros organismos
- ❖ Condiciones ambientales
- ❖ Vía de exposición y dosis.

La OEA da un periodo máximo de 21 días por propósitos de regulación. (3)

4.1.6.2 SIGNOS

En aves infectadas con virus muy virulentos la enfermedad puede presentarse en forma repentina, con alta mortalidad sin presentar otros signos clínicos.

Cepa Velogénica Vicerotópica: En pollo de engorde por lo general comienza con indiferencia, aumento de frecuencia respiratoria y debilidad, terminando con postración y muerte. Puede ocasionar edema alrededor de los ojos y cabeza, diarrea verde, temblores musculares, tortícolis, parálisis de patas y alas, y opistotonos. La mortalidad puede llegar al 100%. (3, 7, 9)

Cepa Velogénica Neurotrópica: Inicio repentino de problema respiratorio severo, 1-2 días después se presentan signos neurológicos. En gallinas ponedoras disminuye la producción de huevo dramáticamente, es raro encontrar

diarrea, y se puede observar mortalidad de 50% en aves adultas y un 90% de mortalidad en aves jóvenes y adultas no inmunizadas. (3, 7, 9)

Cepas Mesogénicas: Provocan problemas respiratorios severos en infecciones de campo, en gallinas ponedoras hay disminución de la producción de huevo, al final de la enfermedad pueden haber signos nerviosos, pero no es común. La mortalidad es baja principalmente en aves adultas. (3, 7, 9)

Cepas Lentogénicas: Por lo general no provocan enfermedad en aves adultas. En aves jóvenes susceptibles se observan problemas respiratorios leves, frecuentemente con mortalidad con las cepas más patógenas y con infecciones complicadas. (3, 7, 9)

4.1.7 DIAGNÓSTICO

Se pueden realizar diferentes formas de diagnóstico para comprobar la presencia de la enfermedad. Entre estas tenemos:

4.1.7.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Es de importancia la historia de la parvada así como la presencia de síntomas clínicos y lesiones a la necropsia, pero ninguno de los signos clínicos de la enfermedad de Newcastle

así como las lesiones observadas debe considerares como patognomónica. (3, 4, 7, 11,16, 17)

4.1.7.2 AISLAMIENTO DEL VIRUS

En embrión de pollo, utilizándose embriones de 9-11 días, o histocultivo. Este permite la caracterización de cepas infectantes. (7, 16)

4.1.7.3 SEROLOGÍA

Las pruebas serológicas nos indicarán la presencia de anticuerpos, sin indicarnos la cepa involucrada. Estas pruebas son útiles para cuantificar anticuerpos posvacunación, para confirmar la aplicación de la vacuna y una adecuada respuesta inmune. Entre estas pruebas tenemos: (7, 16)

4.1.7.3.1 Detección directa de antígenos virales:

Técnicas inmunohistológicas, técnicas de Inmunofluorescencia, técnica de inmunoperoxidasa.

4.1.7.3.2 Seroneutralización en Placa y en embrión de Pollo

4.1.7.3.3 Inmunodifusión Radial

4.1.7.3.4 Hemólisis Radial

4.1.7.3.5 Prueba de Hemaglutinación (HA)

4.1.7.3.6 Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI)

Los virus aviares que aglutinan los eritrocitos incluyen el virus de la enfermedad de Newcastle, influenza, adenovirus 127 y

bronquitis infecciosa (después de concentración y tratamiento enzimático). Muchas especies de micoplasmas también son capaces de hemoaglutinar. La inhibición de la hemoaglutinación por anticuerpos específicos es la base de la prueba de HI. (2, 7, 20)

Fundamento De La Prueba De HI: Algunos virus se unen a los eritrocitos de aves y los aglutinan. Los anticuerpos contra dichos virus inhiben esta hemaglutinación al bloquear sus lugares de unión. La detección de la hemaglutinación inducida por virus sirve de prueba preliminar cuando se trata de identificar un virus; la inhibición de este fenómeno por un anticuerpo se utiliza tanto como método para identificar un virus específico como para medir las concentraciones de anticuerpos en el suero. La capacidad del virus de la enfermedad de NC para aglutinar glóbulos rojos, es debido a la fijación de la proteína HN a los receptores sobre la superficie de los eritrocitos. (7, 20)

4.1.7.3.7 Inmuno Ensayo de Enzima Asociada (ELISA)

La Primera vez que se utilizó ELISA para medir anticuerpos virales fue realizado por Voller y Bidwell. Es una prueba inmunológica muy sensitiva utilizada para detectar y medir la cantidad de anticuerpos circulantes tanto en aves como en otras especies. El nombre ELISA es una abreviación en inglés de Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. ELISA ha sido

aplicada para una serie de patógenos incluyendo virus, bacterias, micoplasmas y parásitos (6, 10, 12, 20, 21, 24).

Se han sucedido muchas variaciones en la metodología del ELISA desde su desarrollo en los años 60, pero el concepto básico sigue siendo la detección inmunológica y la cuantificación simple o múltiple de antígenos o anticuerpos de la muestra del paciente (usualmente suero) (21, 24).

La prueba de ELISA es altamente sensitiva, pero debemos reconocer que tiene baja especificidad, pero es una excelente herramienta de diagnóstico porque mide cuantitativamente todos los serotipos de un antígeno viral determinado. La prueba de ELISA debe ser utilizada como prueba de monitoreo y posteriormente efectuar una prueba diagnóstica de serotipificación. La prueba de ELISA se considera más sensitiva que la prueba de HI en los grupos de perfil bajo (0-3) para medir anticuerpos contra el virus de Newcastle (6, 10, 20, 24)

La prueba ELISA convencional es realizada en una microplaca de 96 pozos. Normalmente estas placas están fabricadas en poliestireno o polivinilo. La superficie de los pozos es tratada con especial interés para optimizar la adhesión de la proteína o “antígenos” a los pozos. (6, 10, 20, 24)

Fundamento De La Prueba De ELISA: Los pozos en la microplaca sirven como el “fundamento” de la prueba ELISA. Cuando el suero de prueba que contiene los anticuerpos reconocen al antígeno agregado, estos anticuerpos se adhieren a los pozos recubiertos de antígeno (10, 24)

La prueba ELISA deriva su nombre al uso de enzimas (peroxidasas, fosfatasas, biotin, etc.) que están ligadas a los anticuerpos específicos. Estos anticuerpos ligados a enzimas (a menudo llamados conjugados) cuando se juntan a otro anticuerpo o a un antígeno, se vuelven los “generadores de color” del ensayo. Cuando una solución incolora llamada sustrato se mezcla con el conjugado, el sustrato transparente se colorea. La cantidad de color puede ser medida con un lector de placas ELISA (12, 20, 24).

CONCEPTO BÁSICO DE LA TÉCNICA DE ELISA

Placa de Prueba + Anticuerpo del pollo + Conjugado + Sustrato = COLOR
con el Antígeno del suero etiquetado solución
de enzimas
Anti - pollo
incoloro

La prueba de ELISA es una prueba colorimétrica, la cantidad de color de cada muestra es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en la muestra (entre más oscuro esté el pozo con la muestra, mayor es la cantidad de anticuerpos presentes en esa muestra de suero). La cantidad de color se mide en un lector ELISA y registrada en

Densidades Ópticas (D.O.). La D.O. de cada muestra es comparada con el control positivo para calcular el factor SP (muestra positiva). El título de cada muestra se calcula usando una ecuación de regresión lineal y el factor SP. (12, 24)

Debido a que las condiciones ambientales y el tiempo usado en la prueba varían a diario en el laboratorio, el ajuste SP normaliza el cálculo del título al minimizar el impacto de las condiciones que afectan a la microplaca (temperatura del cuarto, tiempo de incubación, etc.). Esto permite al personal del laboratorio correr la prueba dentro de un rango razonable de condiciones y así obtener resultados reproducibles. (12, 24)

4.1.8 PREVENCIÓN Y CONTROL

Durante 1995 se han reportado varios brotes severos de la enfermedad de Newcastle en algunos países de América Latina, sin embargo, en general se puede decir que los brotes de la enfermedad han disminuido considerablemente quizás debido a los programas de vacunación que contemplan la aplicación de varias vacunas durante la vida del ave. Sin embargo se han observado brotes serios de la enfermedad tanto en pollos de engorde como en ponedoras comerciales y reproductoras; cuando se presentan fallas en los programas de vacunación, los métodos de aplicación o el manejo de las vacunas, así como aves con inmunodepresión. Esto indica

que el virus patógeno está presente en el ambiente avícola y que los efectos de la enfermedad se controlan a través de adecuados métodos de vacunación, sin embargo, el virus patógeno es capaz de infectar las aves inmunizadas y aunque no cause mortalidad severa, sí encuentra una forma de sobrevivir dentro del ave y de multiplicarse para en un futuro afectar aves que presentan bajos niveles de anticuerpos o que tienen fallas en su sistema inmune. En ponedoras no provoca mortalidad pero si es responsable de baja en la producción y huevos de mala calidad tanto interna como externa. (3, 21, 22, 23)

En Estados Unidos, las cepas que afectan las aves se consideran de baja patogenicidad (cepas lentogénicas en su gran mayoría) y desde hace muchos años no se aíslan cepas de alta patogenicidad. A pesar de esta situación, la industria avícola de Estados Unidos practica programas de vacunación que ayudan a mantener niveles adecuados de anticuerpos en las aves, suficientes para evitar los efectos de virus patógenos de campo. Los planes de vacunación utilizados son mucho más flexibles que los planes que se utilizan en Latinoamérica. (21, 22)

4.1.8.1 PROCEDIMIENTOS DE VACUNACIÓN

Los programas de vacunación contra la enfermedad de Newcastle contemplan los métodos de vacunación individual y los sistemas de vacunación masivos. En abuelas y reproductoras se utilizan frecuentemente los métodos de vacunación individual, mientras que en los pollos de engorde las vacunas son aplicadas por métodos masivos. (21)

Los métodos de vacunación individual, aunque efectivos la mayoría de las veces, no son tan ampliamente empleados en pollos de engorde debido a que en la mayoría de los casos el manejo individual de las aves implica utilizar mayor cantidad de mano de obra que es costosa. La vacunación vía ocular o nasal, con vacunas a virus vivo, lo mismo que la vacunación por inyección con vacunas oleosas. La inyección de las reproductoras o de aves de larga vida con vacunas oleosas antes del periodo de producción, es hoy una práctica común en la industria avícola. (7, 15, 23)

La industria del pollo de engorde utiliza preferentemente los métodos de vacunación masiva, ya sea por aspersión o por agua de bebida. En la planta de incubación la vacunación por aerosol ya es una práctica común, tanto en pollita de reposición como en pollo de engorde. (6, 7, 19)

En el futuro, el uso de métodos de vacunación masivos, se considera van a reemplazar el método de vacunación individual de los pollos ya alojados en la caseta debido a que son muy costosos e imprácticos en parvadas muy numerosas. (7, 22)

4.1.8.2 VACUNAS

Para prevenir la enfermedad de Newcastle, la industria avícola utiliza vacunas a virus vivo y vacunas inactivadas, generalmente emulsionadas en aceite. En aves de larga vida, se utilizan vacunas a virus vivo e inactivado durante la etapa de cría y desarrollo de las aves para usar el método masivo en la etapa de producción. Las vacunas inactivadas tienen poco uso en la industria del pollo de engorde, excepto cuando se aplican en los 10 primeros días de edad simultáneamente con vacuna a virus vivo vía ocular o nasal. Estas vacunas son efectivas pero su costo de aplicación es alto aunque se aplique una sola vacunación en la vida del pollito. (22)

Las vacunas a virus vivo preparadas con cepas lentogénicas son las más ampliamente aplicadas. La cepa B1 es la más utilizadas en pollitos menores de 10 días de edad como primovacunación, y se replican en el aparato respiratorio produciendo respuesta inmune local y humoral. La cepa La

Sota induce una rápida inmunidad aunque tiene mayor potencial de causar síntomas respiratorios por ser una cepa más invasora, por lo tanto, no se recomienda como primera vacunación, pero sí como una revacunación en aves vacunadas previamente con la cepa B1 para aumentar la respuesta inmune. Por otra parte, la cepa B1 es considerada como una cepa de baja agresividad o patogenicidad, induciendo una protección más leve y de menor duración que la inmunidad obtenida con cepa La Sota. (22)

4.2 SISTEMA INMUNE

Por su capacidad de distinguir lo propio de lo que no lo es, el sistema inmune es el mediador de la relación del individuo con el medio ambiente que le rodea. Cuando el sistema inmune funciona de manera apropiada, protege al organismo de las infecciones (15, 19)

La primera línea de resistencia del hospedero está representada por mecanismos locales que pueden ser de naturaleza mecánica (piel, plumas, mucosas) o de naturaleza bioquímica o biológica (secreciones, jugos gástricos) estos mecanismos no son específicos.

Entre las líneas de defensa se cuenta con los órganos linfoides, los cuales se dividen en Primarios y secundarios. (19)

4.2.1 ÓRGANOS LINFOIDES PRIMARIOS

Son los órganos cuya función consiste en regular la producción y diferenciación de linfocitos. Entre ellos están el Timo y la Bursa de Fabricio.

TIMO : El timo se encuentra en el espacio mediastínico anterior, el cual se extiende hacia arriba, en el cuello. Es una glándula formada por cuerpos lobulares que se extienden a lo largo del cuello, órgano que tiene su máximo desarrollo en los pollitos y de los que apenas quedan vestigios en las aves adultas. Estructuralmente está constituido por linfocitos rodeados de una cápsula conjuntiva. Este puede atrofiarse con rapidez debido al estrés. (8, 20)

Funciones del Timo

- a. Capacidad para desencadenar algunos tipos de respuesta inmunitaria.
 - b. Forma una buena parte de los Linfocitos circulantes.
 - c. Funciona como glándula endocrina. En donde las células epiteliales secretan varias hormonas, las cuales inducen a la maduración de las “Células T”.
- (20)

Bolsa de Fabricio: Sin actuar como una glándula de secreción interna, este órgano, situado encima de la cloaca, presenta un papel esencial en las aves jóvenes, tendiendo a involucionar con la edad. Su papel se ha relacionado con el sostenimiento de la inmunidad humoral durante la primera semana de vida, alcanzando su mayor tamaño a las 2 semanas de edad y luego experimenta una involución gradual. (8, 20)

Función de La Bursa de Fabricio

- a. Sirve como sitio de maduración y diferenciación de las células del sistema productor de anticuerpos. Llamándoseles a estas “Células B”.
- b. También funciona como órgano linfoide secundario. El cual puede atrapar antígenos y llevar a cabo un cierto nivel de síntesis de anticuerpos.
- c. Contiene un pequeño foco de “Células T”. (20)
- d.

Diferencia entre Linfocitos “B” y Linfocitos “T”: Los linfocitos T y linfocitos B se originan en el embrión a partir del saco vitelino y después del hígado, pasando más tarde a la médula ósea y adquiriendo su diferencia en el timo y la bolsa de Fabricio; después de ser programados pasan a los órganos

linfoides secundarios (tejido linfoide asociado a tracto digestivo, tracto respiratorio, bazo). (15)

Antígeno es cualquier sustancia capaz de generar una respuesta inmune, reaccionar con células T y células B para inducir la formación de anticuerpos y linfocitos sensibilizados, que reaccionan con estos anticuerpos y células una vez que son formados. No es posible diferenciarlos por su morfología, por lo que se identifican por sus características funcionales. (15)

El mejor método es identificar los antígenos característicos sobre su superficie. Las células “T” poseen muchos antígenos de superficie, por ejemplo: T₃, T₄, T₈; mientras las células “B” se subdividen basándose en el isotipo de inmunoglobulinas presentes en su superficie, por ejemplo: IgM, IgG, IgA. (15)

Otra forma de distinguirlos implica la demostración de los receptores característicos que se encuentran en las superficies celulares. Los linfocitos “T” tienen receptores que les permiten unirse a los eritrocitos exógenos. En cambio los linfocitos “B” no tienen estos receptores para las regiones Fc de las inmunoglobulinas. (15)

Se puede utilizar otra técnica, la cual consiste en medir sus respuestas a ciertas proteínas llamadas lectinas.

4.2.2 ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS

Estos Proceden del mesodermo, y aparecen en etapas tardías en la vida fetal y persisten a lo largo de la vida adulta. Aquí podemos encontrar órganos como bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, y tejido linfoide disperso por el organismo en vías digestivas, respiratorias y urogenitales. (20)

Bazo: Este filtra la sangre. En el proceso se extraen tanto las partículas antigénicas como las células envejecidas. Además, el bazo almacena eritrocitos y plaquetas. Durante la vida fetal, participa en la eritropoyesis. Está dividido en 2 compartimientos. Uno en la cual almacena eritrocitos, capta antígenos y realiza eritropoyesis, llamándosele “Pulpa Roja”. En el otro se produce la respuesta inmunitaria, llamándosele “Pulpa Blanca”. (20)

CÉLULAS DE MEMORIA: Estas células son derivadas de un Linfocito “B” sensible a los antígenos y estimulado. Estos tienen receptores de inmunoglobulina cuya especificidad para unirse a los antígenos es idéntica a la de la célula original. Sin embargo sus isotipos cambian, de IgM a IgG, IgA o IgE. Estas células de memoria viven durante muchos meses o años después de la primera exposición al antígeno. Por lo que al suministrar una segunda dosis de antígeno se encontrarán muchas células sensibles a los antígenos, que

serán más que las producidas por la primera dosis, y la inmunoglobulina producida es principalmente del isotipo IgG. Esto es debido al estímulo. Por lo tanto, una exposición posterior al mismo antígeno proporciona una respuesta más rápida y de mayor intensidad. La base de esta respuesta aumentada es la proliferación de linfocitos antígeno- específicos después de la interacción con el antígeno. (15, 20)

La reacción final que se detecta después de la inyección de un antígeno es tal vez el resultado de un balance entre los mecanismos supresor y activador. Por tanto una respuesta excesivamente severa puede ser debida a un defecto en los mecanismos supresores; al contrario en estados de inmunodeficiencia la anormalidad puede no sólo deberse a la ausencia de un tipo particular de linfocitos, sino que también puede ser ocasionada por una respuesta exagerada. (15)

V MATERIALES Y METODOS

5.1 MATERIALES

5.1.2 *Material Humano*

- ❖ 3 Médicos Veterinarios

5.1.3 *Material biológico*

- ❖ 360 Sueros de aves de engorde
- ❖ Glóbulos rojos de gallina, lavados al 1%
- ❖ Antígeno de Newcastle conteniendo 4DHA/0.254
- ❖ Microplacas con antígeno de Newcastle adsorbido

5.1.4 Equipo

- ❖ 1 computadora
- ❖ 1 lector
- ❖ Micropipetas multicanal 10 µl a 300 µl
- ❖ Micropipeta unicanal de 0.5 µl a 10 µl
- ❖ Reloj - Alarma
- ❖ Solución salina (PBS)
- ❖ Microplacas de fondo en V
- ❖ Microdiluidores de 0.025 ml
- ❖ Agua Destilada estéril
- ❖ Solución preparada para lavado de placas
- ❖ Cloro al 10 %
- ❖ Solución Buffer
- ❖ 2 cilindros graduados de 50 ml
- ❖ Lavador de Microplacas Mecánico.
- ❖ Jeringas
- ❖ Papel absorbente

5.1.5. Reactivos

- ❖ Solución de Substrato
- ❖ Solución de Conjugados
- ❖ Solución de Parada
- ❖ Solución Buffer
- ❖ Suero control positivo
- ❖ Suero control negativo

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 *Recolección de las muestras*

Se utilizaron 360 sueros sanguíneos de pollos de engorde recolectados al azar de 12 diferentes lotes de una misma empresa que llegaron al Laboratorio de Ornitopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia durante el periodo de abril a agosto del 2001.

5.2.2 *Procesamiento de Muestras*

A cada muestra se le realizó la prueba de ELISA así como la Prueba de HI. Con el fin de poder hacer la comparación entre ambas pruebas.

5.2.3.1 *Prueba de ELISA*

Se utilizó el método de ELISA Indirecto. La metodología de la prueba ELISA para medir anticuerpos de suero de pollo contra el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) se listan a continuación:

Es importante que los reactivos y materiales estén a medio ambiente al momento de trabajarlos.

- a. **Preparación de la placa de Dilución de Suero:** Se agregó 500 μm de solución buffer a cada pozo de la microplaca, exceptuando los pozos A1, A2, A3, H10, H11 y H12. Luego se agregó 6 μm de suero problema a cada una de

las fosas conteniendo la solución buffer (A4 - H9), formando una solución 1:50. Estos se dejaron reposando por 5 minutos. Se preparó el suero control positivo y el suero control negativo; para esto se agregó 300 μm de solución buffer en un tubo y 6 μm de suero control positivo, en otro tubo se agregó otros 300 μm de solución buffer y 6 μm de suero control negativo.

b. Preparación de la Microplaca de la prueba: Se removió la microplaca de la bolsa protectora. Esta microplaca ya estaba cubierta con Antígeno. Se agregó solución buffer a todas los pozos. Se agregó 50 μm de la solución de suero control positivo en los pozos A1, A3 y H11. En los pozos A2, H10 y H12 se agregó 50 μm de suero control negativo. Utilizando una pipeta multicanal se agregó 50 μ de cada uno de los sueros problemas a la microplaca, utilizando los pozos A4 al H9. Esto se debe realizó lo más rápido posible. Se incubó al medio ambiente por 30 minutos.

c. Procedimiento de lavado: Se descartó el liquido de todas los pozos en una solución de cloro al 10%. Se secó bien dando golpes sobre una toalla de papel limpia. Luego se le agregó la solución de lavado a cada pozo (aproximadamente 300 μl) y se dejó reposar por 3

minutos más, y se volvió a descartar. Este procedimiento se repitió 2 veces más.

d. Agregado del Conjugado: Se agregó 100 μ l de conjugado a cada uno de los pozos. Este conjugado se preparó de la siguiente manera: A un recipiente adecuado se le agregó 10 ml de solución buffer y 100 μ l de conjugado (esto es suficiente para trabajar una microplaca). Después de enjuagar todos los compuestos del suero que no se hayan adherido a la placa, se agregó un conjugado de anticuerpos etiquetado de peroxidasa (HRP) con anticuerpo de pollo (IgG). El anticuerpo ligado a las enzimas se adhiere firmemente al anticuerpo del pollo que se mantiene adherido al antígeno. Se hizo de nuevo el procedimiento de lavado.

e. Agregado del Substrato: Se agregó 100 μ l de Sustrato (este ya viene listo para utilizarse) a cada pozo. Se incubó por 15 minutos. Después de hacer un nuevo enjuague de la placa se removió el conjugado no adherido y se agregó un substrato (ABTS) a todos los pozos. Los pozos junto con el conjugado volvieron al Substrato transparente de un color verde azulado. El tono del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos del pollo específicos al antígeno recubierto en los pozos. La

cantidad de color (densidad óptica ó D.O) en cada pozo se determinó usando un lector ELISA.

- f. Adición de Solución de Parada:** Luego de los 15 minutos se le agregó a cada uno de los pozos 100 µl de solución de parada. Esta se preparó de la siguiente manera: En un recipiente adecuado se agregó 10 ml de agua destilada y 2.5 ml de solución de parada.

5.2.2.2 Prueba de HI

En el laboratorio de patología aviar del la FMVZ se utilizó el método β (suero diluido y antígeno constante).

- a.** Se colocó la microplaca en forma horizontal. En la columna A de la copa número 1 a la copa número 12 se dejó como control de glóbulos rojos.
- b.** La copa número 12 de las columnas H a la B se dejó para el control de antígeno.
- c.** A las 12 copas de la fila A y a todas las copas de la fila número 12 del pozo A al H se les depositó 0.025 ml de PBS de formando una “L” invertida.
- d.** En las copas de la fila 1 a la 11 de las columnas H a la B, y en la copa número 12 de la fila H, se colocó 0.025 ml de antígeno de Newcastle con 4 DHA.

- e. En las copas de la columna H, de las copas de la fila número 1 a la número 9 se colocó 0.025 ml de suero a examinar. En la copa número 10 se colocó 0.025 ml de suero control positivo y en la copa número 11 se colocó 0.025 ml de suero control negativo. Se diluyó de la columna H hasta la columna B y de la copa número 1 a la copa número 12.
- f. Se dejó reposar la placa tapada con protector plástico transparente, a temperatura ambiente (20°- 22° C) durante 10 minutos, al transcurrir los 10 minutos se colocó en todas las copas de la placa 0.025 ml de glóbulos rojos de gallina lavados y diluidos al 1%, se agitó la placa para hacer una mezcla de los componentes, se cubrió y se incubó a temperatura ambiente (20 - 22° C) durante 45 - 60 minutos. Para poder realizar la lectura de las pruebas, se leyó de la columna H a la B y se tomó como positivas la última copa en la que se forme botón completo de G.R. Todas las copas de la fila A, deben de haber formando el botón de glóbulos rojos y todas las fosas de la columna número 12 que fue el control de G.R.

g. Se determinó el $\log_2$ como medida geométrica, y los resultados obtenidos se anotaron en un protocolo correspondiente, identificando cada muestra.

5.2.3 *Análisis Estadístico*

5.2.3.1 **Correlación entre pruebas**

Para determinar la correlación entre pruebas, se utilizó el diseño estadístico de correlación lineal.

La correlación se calculó aplicando un coeficiente de correlación a los datos de ambos fenómenos. Una correlación positiva perfecta tiene un coeficiente + 1, y para una correlación negativa perfecta es -1. La ausencia de correlación da como coeficiente 0.

Se determinaron los coeficientes de correlación que permitieron expresar cuantitativamente el grado de relación que existe entre las dos variables. Diferencia entre las pruebas se utilizara la Prueba de Hipótesis para la diferencia de promedios.

Se sabe que la técnica Elisa está calibrada para que los resultados de 0 correspondan a 16 con HI.

La fórmula a utilizar será:

$$r = \frac{\sum xy}{(\sum x^2)(\sum y^2)}$$

r = Coeficiente de correlación

$$x = X - \bar{X}$$

X = Título de Anticuerpos de HI

$\bar{X}$ = Media del títulos de anticuerpo de HI

r = Coeficiente de correlación

$$y = Y - \bar{Y}$$

Y = Título de Anticuerpos de ELISA

$\bar{Y}$ = Media del títulos de anticuerpo de ELISA

Número de Muestra	X Anticuerpos de HI	Y Anticuerpos de ELISA	x $\bar{x}$ X - X	Y $\bar{Y}$ Y - Y	$\bar{(X-X)} \bar{(Y-Y)}$

5.2.3.2 Coeficiente de Kappa

Es un índice el cual compara la concordancia entre los resultados. Para esto se realizó una una tabla de 2x2. Con los resultados de las pruebas obtenidas.

La formula utilizada fue:

$$K = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

$$1 - P_e$$

P_o = Frecuencia Observada

P_e = Frecuencia Esperada

5.2.3.3 Sensibilidad y Especificidad

Se calculó la sensibilidad y especificidad para las pruebas. La sensibilidad es la proporción de muestras verdaderamente positivas que fueron correctamente identificados por las pruebas. Para esto se realizó un porcentaje en donde tenemos el número de sueros positivos en ambas pruebas dividido por el número de sueros positivos en la prueba multiplicado por 100. Y la especificidad es la proporción de muestras verdaderamente negativas que fueron correctamente identificados por las pruebas. Para obtener este resultado se divide el número de sueros positivos en ambas pruebas dentro del número de sueros positivos en la prueba multiplicado por 100.

5.2.3.4 Economía de las pruebas

Se evaluará el método más económico tomando en cuenta el equipo, materiales y reactivos, sumando todos los costos que requiere cada una de las pruebas.

5.2.3.5 Rapidez de las Pruebas

Para establecer la rapidez de las pruebas se tomará el tiempo total utilizado por la totalidad de las muestras, desde su inicio hasta la obtención del diagnóstico.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio del Departamento de Ornitopatología y Avicultura (LOA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Fueron analizados un total de 360 sueros sanguíneos provenientes de aves de diferentes edades de una empresa productora de pollo de engorde. Estos sueros provenían de 12 diferentes lotes de aves, de las cuales se tomaron al azar 30 muestras de sangre de cada uno de los lotes, todos los lotes recibieron el mismo programa de vacunación durante su periodo de crecimiento.

La información obtenida fue analizada con el propósito de determinar la correlación, concordancia, especificidad y sensibilidad existente entre los resultados obtenidos en la prueba serológica de HI y la prueba serológica de ELISA; así como sus diferencias en el análisis económico y de tiempo entre cada una.

Se realizó el método estadístico de coeficiente de Correlación r para demostrar la correlación entre las dos pruebas. Como resultado obtuvimos coeficientes de correlación de 0.83 a 0.95 ($P < 0.001$) entre los 12 lotes (Tabla No 1). Un coeficiente de correlación de +1 nos indica una correlación Positiva, -1 correlación negativa y 0 sin correlación. Los resultados evidencian una estrecha relación entre los resultados obtenidos en la prueba de HI y la prueba de ELISA.

Tabla No. 1 Coeficientes de Correlación obtenidos entre las pruebas de HI y ELISA en los 12 diferentes lotes.

Número de Lote	Coeficiente de Correlación
1	0.86
2	0.94
3	0.92
4	0.92
5	0.87
6	0.92
7	0.90
8	0.83
9	0.94
10	0.89
11	0.95
12	0.84

Se obtuvo el valor del coeficiente de Kappa de 0.78 de las 360 muestras analizadas. El coeficiente de Kappa determina la concordancia entre las dos pruebas serológicas. Un coeficiente de kappa de +1 indica concordancia perfecta, un coeficiente de Kappa de cero indica concordancia nula y un coeficiente de Kappa de -1 indica completa discordancia. Por lo que un coeficiente de Kappa de 0.78 indica que hay una concordancia excelente entre las pruebas serológicas de HI y ELISA utilizadas para detectar los anticuerpos circulantes contra la enfermedad de Newcastle. (Tabla No. 2)

Tabla No. 2 Coeficiente de Concordancia Kappa entre ELISA y HI para detectar anticuerpos contra NC.

ELISA	HI		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	258	14	272
Negativos	15	73	88
Total	273	87	360

Esta es una tabla 2 x 2 utilizada para obtener los datos para los resultados de Kappa. Los totales de la prueba de ELISA están en el lado izquierdo de la tabla (272 positivos, y 88 negativos) y los totales en los resultados de la prueba de HI están en el extremo inferior de la tabla (273 positivos y 87 negativos). Se puede observar la cantidad de sueros positivos obtenidos en las dos pruebas que es de 258 sueros y la cantidad de sueros negativos para ambas pruebas que es de 73. hay 15 sueros positivos en HI los cuales están negativos en ELISA y hay 14 sueros negativos en HI que están positivos en ELISA.

Se calculó la sensibilidad y especificidad de las pruebas. La sensibilidad se define como la proporción de muestras verdaderamente positivas que fueron correctamente identificados por las pruebas, mientras que la especificidad es la proporción de muestras verdaderamente negativas que fueron correctamente identificados por las pruebas. Los resultados de sensibilidad y especificidad para las dos pruebas de 360

muestras fueron 272 positivos y para ELISA de 273 positivos de las mismas 360 muestras (Tabla No.3). Evidenciando el test de ELISA una sensibilidad de 95 % y una especificidad de 83 %, Y la prueba serológica de HI una sensibilidad de 94.5% y una especificidad de 84%. Siendo para esta prueba, similares la sensibilidad y especificidad.

El que el Kit de ELISA esta calibrado para obtener resultados de cero cuando tenemos títulos de 16 ó menos en la prueba serológica de HI. Por lo que en este estudio se tomaron estos datos como parámetros.

Tabla No. 3 Resultados obtenidos en la prueba de HI y ELISA.

Títulos	HI	ELISA
Positivos	273	272
Negativos	87	88
Total	360	360

Al realizar el análisis económico para ambas pruebas se obtuvo un valor total para la elaboración de las pruebas (cuadro No. 1). Se puede observar que los costos de la prueba de ELISA son superiores a los de la prueba de HI (Cuadro No. 1)

Cuadro No. 1 Precios de equipo necesario para la realización de las pruebas de HI y ELISA

HI	Costo		ELISA	Costo	
	Unidad	Total		Unitario	Total
31 Microplacas	Q. 20.00	Q. 620.00	4 Microplacas	Q. 20.00	Q. 80.00
Micropipeta multicanal + puntas 50-300 µl	Q.7,500.00	Q.7,500.00	Micropipeta multicanal + puntas	Q. 7,500.00	Q. 7,500.00
Micropipeta unicanal 10 - 100 µl	Q.1,800.00	Q.1,800.00	Micropipeta unicanal 0.5- 10 µl	Q. 2,500.00	Q. 2,500.00
4 Canoas	Q. 15.00	Q. 60.00	4 Canoas	Q. 15.00	Q. 60.00
Biológicos y soluciones	Q. 200.00	Q. 200.00	Micropipeta unicanal 10 - 100 µl	Q. 1,800.00	Q. 1,800.00
Agua Destilada	Q. 20.00	Q. 20.00	Agua Destilada	Q. 20.00	Q. 20.00
Toallas de Papel	Q. 18.00	Q. 18.00	Toallas de Papel	Q. 18.00	Q. 18.00
Antígeno	Q. 98.00	Q. 98.00	Kit de Elisa (5 placas)	Q. 3,900.00	Q. 3,600.00
Calculadora	Q. 30.00	Q. 30.00	Computadora	Q. 8,000.00	Q. 8,000.00
Timer	Q. 320.00	Q. 320.00	Timer	Q. 320.00	320.00
			Lector de ELISA	Q.16,000.00	Q.16,000.00
TOTAL		Q10,666.00	TOTAL		Q42,398.00

El tiempo utilizado en las pruebas se describe en el Cuadro No. 2. El tiempo utilizado en ELISA varía muy poco en cuanto a la cantidad de muestras realizadas, ya que el mismo tiempo se utiliza para la realización de 90 muestras que para un número mayor. En HI observamos que el tiempo requerido para la prueba es directamente proporcional al número de muestras trabajadas.

Tabla No. 4 Tiempo utilizado para realizar un total de 90 muestras en las pruebas de HI y ELISA.

HI	Tiempo	ELISA	Tiempo
Paso No. 1	90 minutos	Paso No. 1	120 minutos
Paso No. 2	12 minutos	Paso No. 2	1 minuto
Paso No. 3	12 minutos	Paso No. 3	2 minutos
Paso No. 4	30 minutos	Paso No. 4	30 minutos
Paso No. 5	3 minutos	Paso No. 5	11 minutos
Paso No. 6	90 minutos	Paso No. 6	30 minutos
Paso No. 7	12 minutos	Paso No. 7	11 minutos
Paso No. 8		Paso No.8	15 minutos
		Paso No. 9	2 minutos
		Paso No.10	3 minutos
Tiempo Total	249 minutos	Tiempo Total	225 minutos

- Se trabajó el tiempo con un total de 90 muestras que es la cantidad máxima de muestras que se pueden realizar en una placa de ELISA.
- Paso No.1 HI: Preparación de placas, y cálculos para la titulación de antígeno, dilución de antígeno y dilución de glóbulos rojos.
- Paso No.2 HI: Trabajando 4 microplacas simultáneamente: adición de antígeno y solución PBS.
- Paso No.3 HI: Dilución del suero problema.
- Paso No.4 HI: Incubación de la placa
- Paso No.5 HI: Aplicación de glóbulos rojos.
- Paso No.6 HI: Incubación
- Paso No.7 HI: Lectura
- Paso No.1 ELISA: Preparación de placas de dilución, tiempo de espera para la temperización de reactivos.
- Paso No.2 ELISA: Trabajando una placa, aplicación de solución buffer.
- Paso No.3 ELISA: Adición de sueros problema y controles diluidos.
- Paso No.4 ELISA: Incubación de la placa
- Paso No.5 ELISA: Lavado y adición de conjugado.
- Paso No.6 ELISA: Incubación
- Paso No.7 ELISA: Lavado y adición de sustrato.
- Paso No.8 ELISA: Incubación

- Paso No.9 ELISA: Adicción solución de parada
- Paso No.10 ELISA: Lectura

VIII CONCLUSIONES

1. Los métodos serológicos son parte esencial de cualquier programa de control, monitoreo y diagnóstico de las diferentes enfermedades aviares.
2. La prueba de ELISA ha adquirido una gran importancia en el monitoreo y diagnóstico de las enfermedades aviares, principalmente por la facilidad de procesar un gran número de muestras así como de obtener buenos resultados y de organizar los datos para su uso inmediato o para tenerlos como una referencia futura, ya que nos permite el almacenamiento de datos.
3. La prueba de HI ha sido utilizada como referencia desde hace mucho tiempo, y ha mostrado tener un gran valor para el diagnóstico serológico ya que muestra gran similitud con la prueba de ELISA, demostrando ser una prueba confiable y con un menor costo que la prueba de ELISA
4. Existe correlación positiva entre las pruebas de HI y ELISA, por lo que ambas pueden ser utilizadas para el monitoreo y diagnóstico de las parvadas avícolas
5. Se demostró que la concordancia entre las dos pruebas serológicas es excelente.

6. En este estudio la sensibilidad y especificidad en las pruebas serológicas de HI y ELISA son de valor similar.
7. En una microplaca de ELISA podemos trabajar un máximo de 90 muestras, en cambio para trabajar esta misma cantidad de sueros en HI necesitamos un total de 7.5 microplacas.
8. Trabajar cantidades mayores de 90 sueros ELISA nos lleva el mismo tiempo que trabajar una sola placa de 90 muestras. El Trabajar cantidades mayores en HI incrementa el tiempo de trabajo.
9. Es difícil implementar un método de diagnóstico ELISA para pequeños productores, ya que el costo es muy alto comparado con el costo para la prueba de HI.

IX RECOMENDACIONES

- ❖ Ambas pruebas se recomiendan para su uso en el laboratorio ya que la correlación y la concordancia obtenida entre ambas son excelentes.
- ❖ La sensibilidad y especificidad entre las pruebas serológicas en este estudio no mostraron un valor similar entre cada una de ellas, por lo que ambas pruebas pueden ser utilizadas con confiabilidad para la detección de anticuerpos circulantes contra la enfermedad de Newcastle
- ❖ La prueba serológica de HI es mucho más económica que la prueba serológica de ELISA. Por lo que se recomienda su utilización en áreas donde no se pueda costear la prueba de ELISA, ya que demuestran tener una excelente correlación.
- ❖ Se deben de realizar monitoreos serológicos en las parvadas avícolas para poder mantener la salud de la parvada presente y las futuras.

X RESUMEN

El Newcastle es una de las enfermedades de mayor importancia económica debido a las pérdidas que ocasiona en Guatemala como en otros países alrededor del mundo la cual requiere de métodos estrictos de control. Las pruebas más comúnmente utilizadas en la evaluación de programas de vacunación, son las pruebas serológicas de HI y de ELISA.

En las pruebas serológicas de HI y ELISA realizada a 360 sueros sanguíneos aviares, para detectar anticuerpos circulantes contra el virus de la enfermedad de Newcastle se determinó el coeficiente de correlación y coeficiente de Kappa. Se obtuvieron los datos de sensibilidad y especificidad de cada una de las pruebas. También se analizaron para obtener la relación de las pruebas en cuanto al tiempo utilizado para realizarlas y se analizaron económicamente.

Al analizar los resultados se observó que existe una correlación altamente significativa entre la prueba de ELISA y la prueba de HI; En donde el coeficiente de correlación esta entre 0.83 y 0.93 ($P < 0.0001$) para los 12 diferentes lotes analizados en este estudio.

El índice de concordancia Kappa fue de 0.78 ($P < 0.0001$) indicando que hay una concordancia excelente entre las pruebas. En donde ELISA presentó una sensibilidad del 95% y una especificidad del 84%, mostrando valores muy similares con HI en donde los resultados de sensibilidad y especificidad fueron de 94.5% y 83% respectivamente.

Se obtuvieron datos de tiempo usado para realizar las pruebas, en donde se observó que en la prueba de ELISA podemos trabajar una gran cantidad de muestras utilizando la misma cantidad de tiempo, y con la prueba de HI el tiempo se incrementa con el número de muestras a trabajar.

Al realizar el análisis económico de las pruebas, se encontró que el valor de inversión para la prueba de ELISA es mucho más alto que el costo para implementar la prueba de HI.

SUMMARY

Newcastle is a disease of great importance since it causes many losses in Guatemala as well as other countries around the world and it requires strict methods of control and vaccination programs. The most common tests used to evaluate vaccination programs are the serological tests of HI and ELISA.

The correlation coefficient and the Kappa coefficient were calculated on the results of the serological test of HI and ELISA, done to 360 avian serums, to detect antibodies against Newcastle Disease Virus. They were also analyzed to obtain the relation between the two tests on the time used to make each one of the tests and their costs were also analyzed.

The analysis of the results showed a great significance between the ELISA and HI test. The correlation coefficient is between 0.83 and 0.93 ($P < 0.0001$) for the 12 different groups analyzed in this study.

The Kappa coefficient was 0.78 ($P < 0.0001$) showing an excellent agreement between both tests. ELISA showed a sensibility of 95% and a specificity of 83% and there is no difference between the results obtained in HI where the sensibility was 94.5% and the specificity was 83%.

The time used for each test was recorded and it showed that on the ELISA test can be worked a great amount of serums using the same amount of time, and with the HI test the time rises with the number of serums to be run.

In the economical analysis of the tests, reveal that the value of the ELISA test is greater than the costs estimated for the HI test.

XI ANEXOS

**Cuadro No. 1 Resultados obtenidos en ELISA y HI en el lote No. 1
(42 días)**

Número de Muestra	Títulos de ELISA	Títulos de HI
1	1513	256
2	0	0
3	473	64
4	370	0
5	443	64
6	406	32
7	1099	128
8	1181	128
9	876	128
10	1285	128
11	1717	256
12	1918	512
13	730	128
14	704	64
15	384	0
16	1170	128
17	0	0
18	678	64
19	1160	128
20	0	0
21	458	64
22	560	64
23	0	0
24	713	128
25	2442	1024
26	2113	512
27	544	64
28	652	64
29	497	64
30	0	0
$X \log_2$ para HI		5.13

**Cuadro No. 2 Resultados obtenidos en ELISA y HI en el lote No. 2
(47 días)**

Número de Muestra	Títulos de ELISA	Títulos de HI
1	0	0
2	971	256
3	8789	4096
4	0	8
5	355	128
6	593	128
7	5641	2048
8	4930	1024
9	413	128
10	1894	256
11	2826	512
12	0	8
13	398	128
14	0	8
15	0	8
16	784	256
17	0	64
18	505	128
19	443	128
20	0	64
21	0	64
22	0	64
23	3228	512
24	1049	256
25	0	16
26	528	128
27	0	128
28	618	256
29	644	256
30	602	256
$X \log_2$ para HI		6.7

**Cuadro No. 3 Resultados obtenidos en ELISA y HI en el lote No. 3
(43 días)**

Número de Muestra	Títulos de ELISA	Títulos de HI
1	0	0
2	2425	128
3	417	16
4	431	16
5	0	0
6	0	0
7	2671	256
8	0	0
9	0	0
10	1734	64
11	1276	64
12	4509	1024
13	2797	256
14	713	32
15	964	32
16	0	16
17	0	16
18	1326	64
19	0	0
20	2117	128
21	1112	64
22	3658	512
23	3332	256
24	3552	256
25	0	0
26	1866	128
27	875	32
28	1866	128
29	1188	64
30	503	32
$X \log_2$ para HI		4.83

**Cuadro No.4 Resultados obtenidos en ELISA y HI en el lote No. 4
(42 días)**

Número de Muestra	Títulos de ELISA	Títulos de HI
1	0	0
2	353	64
3	0	8
4	0	0
5	0	0
6	841	128
7	0	16
8	777	128
9	2349	512
10	1776	256
11	510	128
12	1306	128
13	1668	256
14	1019	128
15	852	128
16	585	128
17	895	128
18	361	64
19	0	16
20	0	64
21	0	16
22	0	32
23	473	64
24	0	16
25	412	64
26	0	64
27	604	128
28	2304	256
29	412	64
30	1943	256
X log₂ para HI		5.8

**Cuadro No.4 Resultados obtenidos en ELISA y HI en el lote No. 5
(40 días)**

Número de Muestra	Títulos de ELISA	Títulos de HI
1	672	128
2	0	0
3	0	0
4	447	128
5	0	8
6	347	64
7	0	16
8	0	0
9	0	16
10	0	32
11	430	128
12	0	32
13	0	0
14	0	32
15	0	64
16	0	0
17	0	0
18	0	64
19	584	128
20	492	128
21	858	256
22	0	0
23	474	128
24	0	64
25	0	0
26	528	128
27	0	32
28	0	32
29	934	512
30	0	32
$X \log_2$ para HI		3.53

**Cuadro No.6 Resultados obtenidos en ELISA y HI en el lote No. 6
(43 días)**

Número de Muestra	Títulos de ELISA	Títulos de HI
1	0	16
2	0	8
3	904	32
4	1611	128
5	5780	512
6	7645	512
7	1446	128
8	1197	64
9	1528	128
10	1869	128
11	987	64
12	2123	256
13	441	16
14	2564	512
15	8626	512
16	2184	512
17	1121	64
18	567	32
19	577	32
20	1023	64
21	441	32
22	824	32
23	13066	1024
24	1121	64
25	479	32
26	1159	64
27	768	32
28	537	32
29	1942	128
30	0	16
X log₂ para HI		6.3

**Cuadro No.7 Resultados obtenidos en ELISA y HI en el lote No. 7
(46 días)**

Número de Muestra	Títulos de ELISA	Títulos de HI
1	6605	2048
2	12113	8192
3	4279	1024
4	1358	128
5	3577	1024
6	495	64
7	1143	128
8	5375	2048
9	3625	1024
10	11283	4096
11	2497	1024
12	3705	1024
13	1622	512
14	627	64
15	2888	1024
16	9724	2048
17	6954	2048
18	0	32
19	1382	128
20	0	64
21	1244	128
22	1405	128
23	3082	1024
24	10008	4096
25	2274	512
26	0	32
27	512	64
28	8364	2048
29	9833	4096
30	1585	256
X log₂ para HI		8.9

**Cuadro No.8 Resultados obtenidos en ELISA y HI en el lote No.8
(42 días)**

Número de Muestra	Títulos de ELISA	Títulos de HI
1	4793	256
2	496	32
3	2402	128
4	0	32
5	621	64
6	472	32
7	1603	128
8	488	32
9	3021	256
10	682	64
11	0	16
12	2245	128
13	1266	128
14	1940	128
15	674	64
16	0	16
17	9821	256
18	2129	128
19	0	16
20	2402	128
21	464	32
22	1005	64
23	504	64
24	1097	128
25	1005	64
26	1903	128
27	3593	256
28	528	64
29	1066	128
30	755	64
X log₂ para HI		6.23

**Cuadro No.9 Resultados obtenidos en ELISA y HI en el lote No.9
(38 días)**

Número de Muestra	Títulos de ELISA	Títulos de HI
1	3785	1024
2	2697	512
3	0	16
4	487	32
5	1221	64
6	445	16
7	5905	4096
8	389	16
9	4670	2048
10	11650	8192
11	1187	64
12	1772	128
13	0	16
14	1099	64
15	3721	1024
16	4413	1024
17	582	32
18	3834	1024
19	2697	512
20	6111	4096
21	1266	64
22	2371	128
23	1278	128
24	5574	4096
25	5556	2048
26	950	32
27	1045	32
28	4481	2048
29	8572	4096
30	6915	4096
X log₂ para HI		8.20

**Cuadro No.10 Resultados obtenidos en ELISA y HI en el lote No.10
(45 días)**

Número de Muestra	Títulos de ELISA	Títulos de HI
1	396	64
2	0	16
3	0	16
4	356	32
5	473	64
6	883	128
7	689	128
8	640	128
9	780	128
10	0	0
11	1000	256
12	0	0
13	473	64
14	0	32
15	417	64
16	848	128
17	814	128
18	738	128
19	0	16
20	532	64
21	0	16
22	0	32
23	0	16
24	632	64
25	473	64
26	369	32
27	349	32
28	0	32
29	0	16
30	540	64
X log₂ para HI		5.3

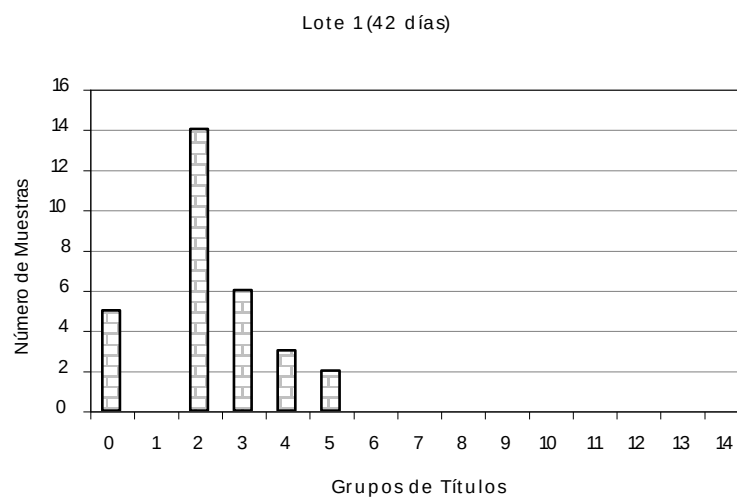
**Cuadro No.11 Resultados obtenidos en ELISA y HI en el lote No.11
(46 días)**

Número de Muestra	Títulos de ELISA	Títulos de HI
1	584	128
2	0	0
3	0	8
4	4766	1024
5	522	128
6	0	0
7	4096	512
8	602	256
9	2419	512
10	1291	256
11	0	8
12	0	0
13	0	16
14	0	16
15	361	64
16	0	16
17	895	256
18	602	256
19	0	8
20	0	32
21	0	32
22	0	32
23	458	128
24	420	64
25	0	8
26	384	64
27	0	64
28	658	256
29	1379	256
30	548	128
X log₂ para HI		5.56

**Cuadro No.12 Resultados obtenidos en ELISA y HI en el lote No.12
(42 días)**

Número de Muestra	Títulos de ELISA	Títulos de HI
1	724	32
2	3202	256
3	768	32
4	1681	128
5	352	32
6	713	32
7	378	32
8	812	64
9	352	16
10	1222	64
11	724	32
12	2711	128
13	801	32
14	0	16
15	557	32
16	1528	128
17	1825	128
18	1146	64
19	702	32
20	835	64
21	1957	128
22	1366	128
23	8579	256
24	1583	128
25	892	64
26	639	32
27	639	32
28	660	32
29	1035	64
30	927	64
X log₂ para HI		6.83

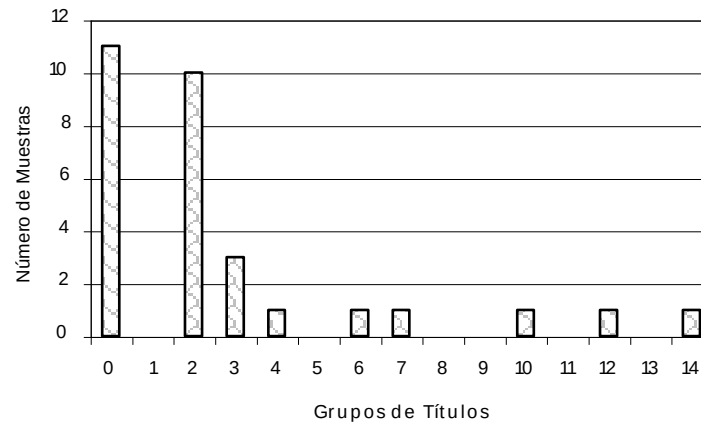
Muestras: 30
 Media: 803
 StDv: 646
 %CV: 51.4



Número	Título	Grupo
1	1513	4
2	0	0
3	473	2
4	370	2
5	443	2
6	406	2
7	1099	3
8	1181	3
9	876	3
10	1285	3
11	1717	4
12	1918	4
13	730	2
14	704	2
15	384	2
16	1170	3
17	0	0
18	678	2
19	1160	3
20	0	0
21	458	2
22	560	2
23	0	0
24	713	2
25	2442	5
26	2113	5
27	544	2
28	652	2
29	497	2
30	0	0

Lote 2 (47 días)

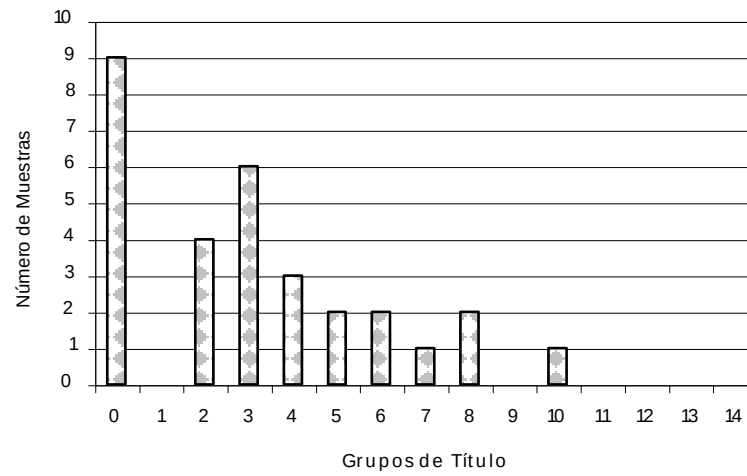
Muestras: 30
Media: 1174
StDv: 2029
%CV: 104.1



Número	Título	Grupo
1	0	0
2	971	3
3	8789	14
4	0	0
5	355	2
6	593	2
7	5641	12
8	4930	10
9	413	2
10	1894	4
11	2826	6
12	0	0
13	398	2
14	0	0
15	0	0
16	784	3
17	0	0
18	505	2
19	443	2
20	0	0
21	0	0
22	0	0
23	3228	7
24	1049	3
25	0	0
26	528	2
27	0	0
28	618	2
29	644	2
30	602	2

Lote 3 (43 días)

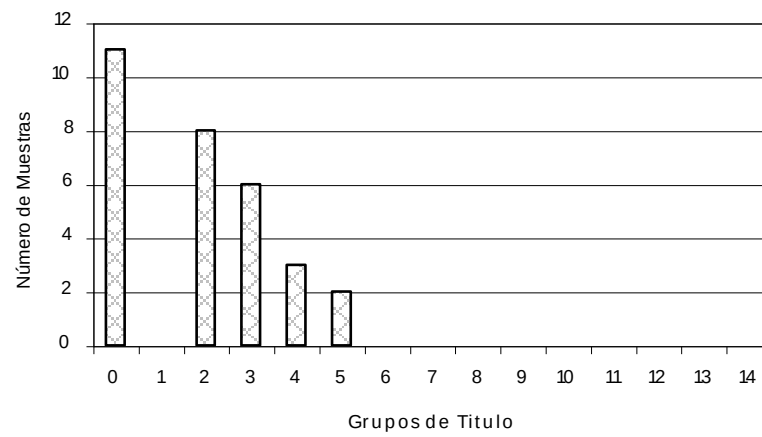
Muestras: 30
Media: 1311
StDv: 1313
%CV: 68.2



Número	Título	Grupo
1	0	0
2	2425	5
3	417	2
4	431	2
5	0	0
6	0	0
7	2671	6
8	0	0
9	0	0
10	1734	4
11	1276	3
12	4509	10
13	2797	6
14	713	2
15	964	3
16	0	0
17	0	0
18	1326	3
19	0	0
20	2117	5
21	1112	3
22	3658	8
23	3332	7
24	3552	8
25	0	0
26	1866	4
27	875	3
28	1866	4
29	1188	3
30	503	2

Lote 4 (40 días)

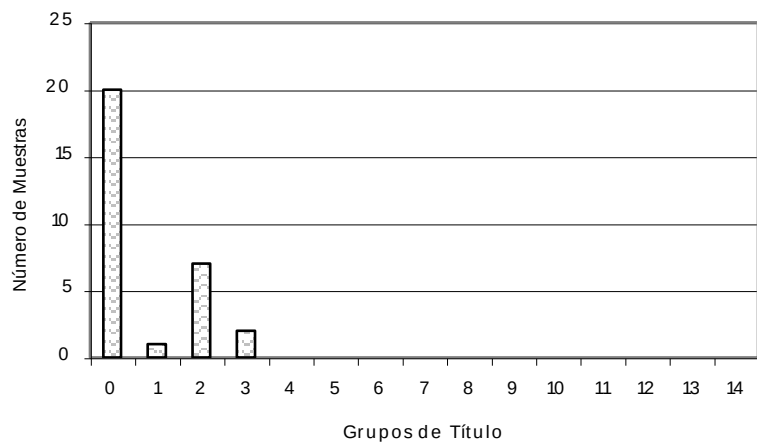
Muestras: 30
 Media: 648
 StDv: 726
 %CV 67.3



Número	Título	Grupo
1	0	0
2	353	2
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	841	3
7	0	0
8	777	3
9	2349	5
10	1776	4
11	510	2
12	1306	3
13	1668	4
14	1019	3
15	852	3
16	585	2
17	895	3
18	361	2
19	0	0
20	0	0
21	0	0
22	0	0
23	473	2
24	0	0
25	412	2
26	0	0
27	604	2
28	2304	5
29	412	2
30	1943	4

Lote 5 (40 días)

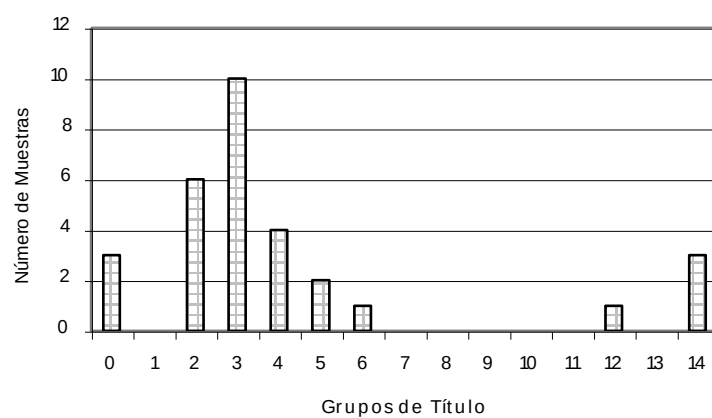
Muestras: 30
Media: 192
StDv: 296
%CV: 55.5



Número	Título	Grupo
1	672	2
2	0	0
3	0	0
4	447	2
5	0	0
6	347	1
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	430	2
12	0	0
13	0	0
14	0	0
15	0	0
16	0	0
17	0	0
18	0	0
19	584	2
20	492	2
21	858	3
22	0	0
23	474	2
24	0	0
25	0	0
26	528	2
27	0	0
28	0	0
29	934	3
30	0	0

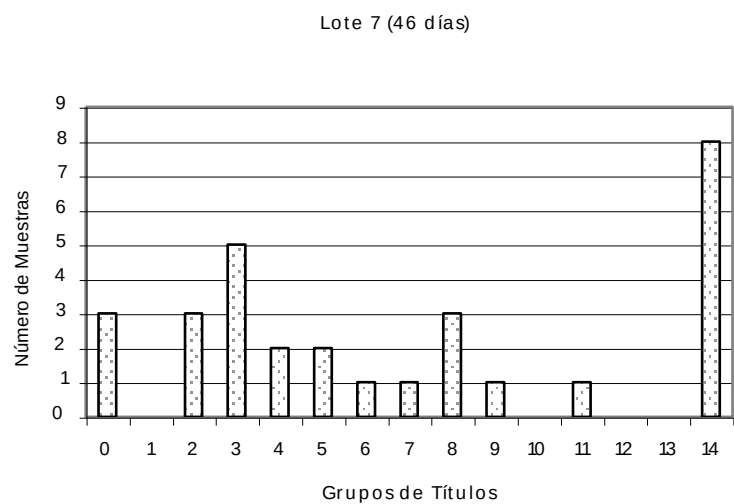
Muestras: 30
 Media: 2084
 StDv: 2923
 %CV: 87.3

Lote 6 (43 días)



Número	Título	Grupo
1	0	0
2	0	0
3	904	3
4	1611	4
5	5780	12
6	7645	14
7	1446	3
8	1197	3
9	1528	4
10	1869	4
11	987	3
12	2123	5
13	441	2
14	2564	6
15	8626	14
16	2184	5
17	1121	3
18	567	2
19	577	2
20	1023	3
21	441	2
22	824	3
23	13066	14
24	1121	3
25	479	2
26	1159	3
27	768	3
28	537	2
29	1942	4
30	0	0

Muestras: 30
 Media: 3919
 StDv: 3702
 %CV: 69.3

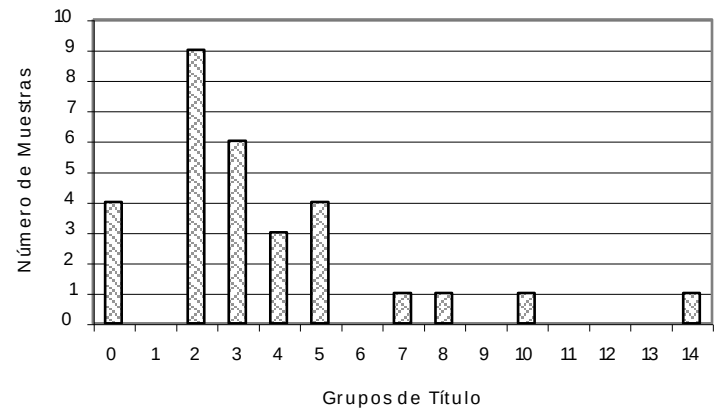


Número	Título	Grupo
1	6605	14
2	12113	14
3	4279	9
4	1358	3
5	3577	8
6	495	2
7	1143	3
8	5375	11
9	3625	8
10	11283	14
11	2497	5
12	3705	8
13	1622	4
14	627	2
15	2888	6
16	9724	14
17	6954	14
18	0	0
19	1382	3
20	0	0
21	1244	3
22	1405	3
23	3082	7
24	10008	14
25	2274	5
26	0	0
27	512	2
28	8364	14
29	9833	14
30	1585	4

Muestras: 30

Media: 1566
StDv: 1932
%CV: 74.3

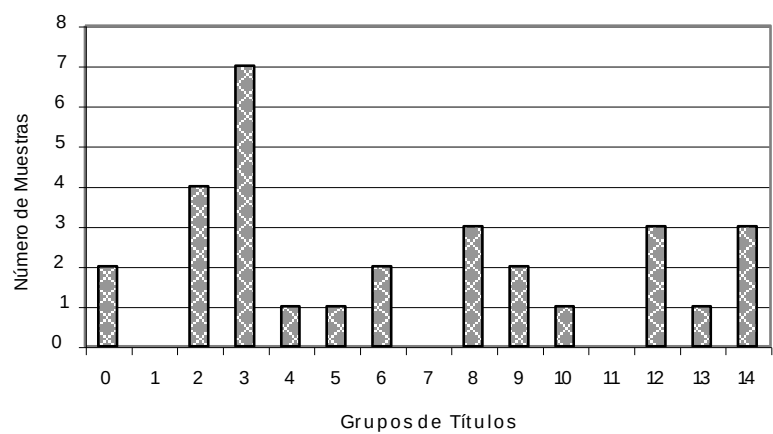
Lote 8 (42 días)



Número	Título	Grupo
1	4793	10
2	496	2
3	2402	5
4	0	0
5	621	2
6	472	2
7	1603	4
8	488	2
9	3021	7
10	682	2
11	0	0
12	2245	5
13	1266	3
14	1940	4
15	674	2
16	0	0
17	9821	14
18	2129	5
19	0	0
20	2402	5
21	464	2
22	1005	3
23	504	2
24	1097	3
25	1005	3
26	1903	4
27	3593	8
28	528	2
29	1066	3
30	755	3

Muestras: 30
 Media: 3156
 StDv: 2817
 %CV: 64.5

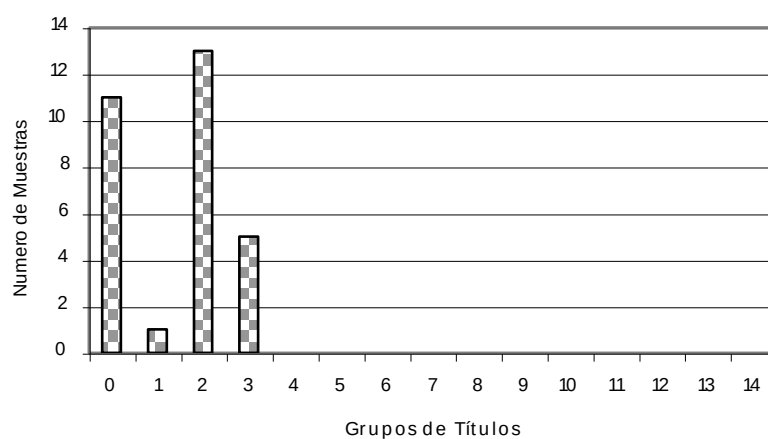
Lote 9 (38 días)



Número	Título	Grupo
1	3785	8
2	2697	6
3	0	0
4	487	2
5	1221	3
6	445	2
7	5905	12
8	389	2
9	4670	10
10	11650	14
11	1187	3
12	1772	4
13	0	0
14	1099	3
15	3721	8
16	4413	9
17	582	2
18	3834	8
19	2697	6
20	6111	13
21	1266	3
22	2371	5
23	1278	3
24	5574	12
25	5556	12
26	950	3
27	1045	3
28	4481	9
29	8572	14
30	6915	14

Muestras: 30
 Media: 380
 StDv: 333
 %CV: 38.8

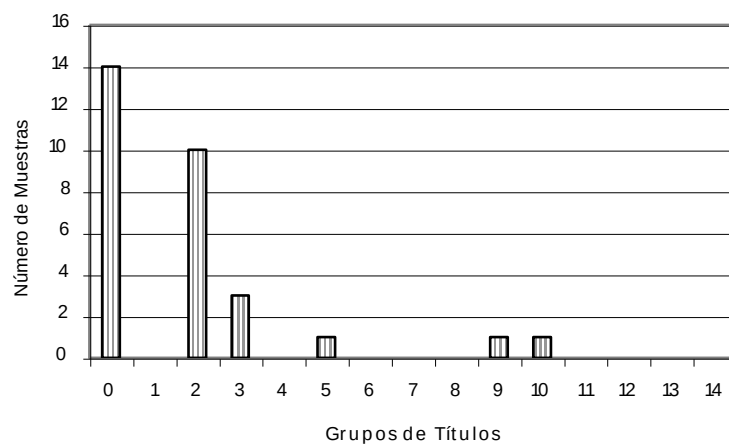
Lote 10 (45 días)



Número	Título	Grupo
1	396	2
2	0	0
3	0	0
4	356	2
5	473	2
6	883	3
7	689	2
8	640	2
9	780	3
10	0	0
11	1000	3
12	0	0
13	473	2
14	0	0
15	417	2
16	848	3
17	814	3
18	738	2
19	0	0
20	532	2
21	0	0
22	0	0
23	0	0
24	632	2
25	473	2
26	369	2
27	349	1
28	0	0
29	0	0
30	540	2

Lote 11 (46 días)

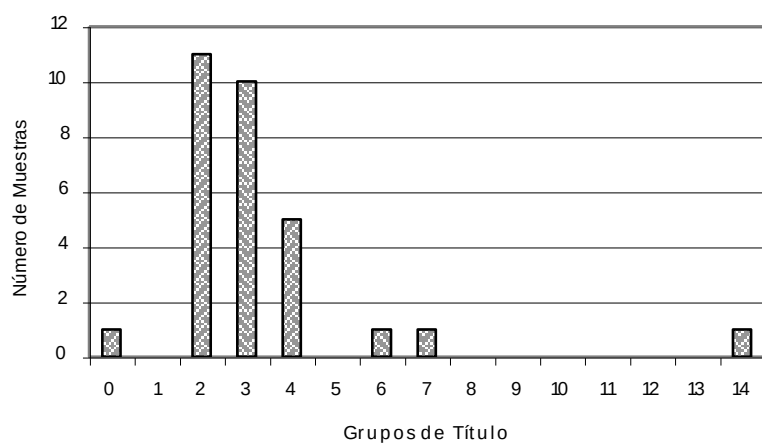
Muestras: 30
Media: 666
StDv: 1162
%CV: 93.9



Número	Título	Grupo
1	584	2
2	0	0
3	0	0
4	4766	10
5	522	2
6	0	0
7	4096	9
8	602	2
9	2419	5
10	1291	3
11	0	0
12	0	0
13	0	0
14	0	0
15	361	2
16	0	0
17	895	3
18	602	2
19	0	0
20	0	0
21	0	0
22	0	0
23	458	2
24	420	2
25	0	0
26	384	2
27	0	0
28	658	2
29	1379	3
30	548	2

Muestras: 30
 Media: 1310
 StDv: 1537
 %CV: 66

Lote 12 (42 días)



Número	Título	Grupo
1	724	2
2	3202	7
3	768	3
4	1681	4
5	352	2
6	713	2
7	378	2
8	812	3
9	352	2
10	1222	3
11	724	2
12	2711	6
13	801	3
14	0	0
15	557	2
16	1528	4
17	1825	4
18	1146	3
19	702	2
20	835	3
21	1957	4
22	1366	3
23	8579	14
24	1583	4
25	892	3
26	639	2
27	639	2
28	660	2
29	1035	3
30	927	3

XI BIBLIOGRAFÍA

1. **ACHA, P.; SZYFRES, B.** 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2 ed. OPS/OMS. EE.UU. p. 370-375.
2. **AGNOTES.** 1999. Newcastle disease. EE.UU. 1 p. Tomado de Internet: <http://www.nt.gov.au/dpif/pubcat/agnotes/agnotes.shtml>
3. **AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN PATHOLOGISTS.** 1989. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 3 ed. Kendall/Hunt. EE.UU. p. 114-120, 192-194, 201-206.
4. **APHIS – USDA.** 2001. Exotic newcastle disease. EE.UU. 4 p. Tomado de Internet: <http://www.aphis.usda.gov/oa/pubs/fsend/.html>
5. **AUSTRALIAN VETERINARY EMERGENCY PLAN (AUSVETPLAN).** 1996. Disease strategy, Newcastle disease. Australia. 21 p. Tomado de Internet: <http://www.brs.gov.au/aphb/aha/ausvet.htm>.
6. **BELL, J. et al.** s.f. An ELISA kit for antibodies against Newcastle disease virus. EE.UU. 9 p. Tomado de Internet. <http://www.fao.org/ag/Aga/AGAP/WAR/warall/u5700b/u5700b0p.htm>.
7. **CALNEK, B. et al.** 1995. Enfermedades de las Aves. Trad. por Jorge Mérito Jane. El Manual Moderno. 9 ed. México. p. 607-627.
8. **CASTELLO, J. et al.** 1989. Biología de la gallina. Real Escuela de Avicultura, España. p. 133.
9. **CONGRESO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA (XIV, 1995, Chile).** 1995. Enfermedad de Newcastle. Ed. por P. Villegas. p. 86-93
10. ----- (XVI, 1999, Perú). 1999. Propiedades antigénicas de las cepas la sota y VG/GA del virus de la enfermedad de Newcastle. Ed. por B. Santos. p. 298-301.
11. ----- (XVI, 1999, Perú). 1999. Enfermedad de Newcastle. Ed. por D. King. p. 56-61

12. **FAO.** s.f. Manual for the recognition of exotic diseases of livestock. EE.UU. 2 p. Tomado de Internet : <http://202.0157.4/RefStuff/Manual/Manual.html>
13. **GILLINHAM, S.** 1991. Diagnóstico serológico elisa. Tecnología Avípecuaria (Méx.) 36 (4):6-11
14. **KIRKEGAARD & PERRY LABORATORIES.** 1999. Manual de diagnóstico serológico para monitorear la salud avícola. AgroBioTek Laboratorios, Honduras. p. 8-9.
15. **JORNADA AVÍCOLA NACIONAL.** (6ª, 1998, Guatemala.). 1998. Sistema inmune. Ed. por R. Muñoz. Gua., s.n. p. 34-35.
16. **MAFF BSE.** 1999. The Elisa Test. Tomado de Internet: <http://www.maff.gov.uk/animalh/bse/animal-health/feedban-elisatest.html>
17. **MANITOBA AGRICULTURE AND FOOD.** 2001. Newcastle disease in laying hens. EE.UU. 3 p. Tomado de Internet: <http://www.gov.mb.ca/agriculture/livestock/poultry/newcastle.html>
18. **OIE.** 2000. Newcastle disease. EE.UU. 4 p. Tomado de Internet: http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_A160.htm.
19. **ROLDAN, H.** 1995. Estudio serológico por inhibición de la hemoaglutinación (HI) de la enfermedad de Newcastle en sanates (*Cassidix mexicanus*) merodeadores en una granja avícola del municipio de Fraijanes, Guatemala. Tesis Méd. Vet. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 50 p.
20. **SANTIZO CIFUENTES, C. B.** 1988. Determinación de anticuerpos circulantes contra la enfermedad de Newcastle en aves de patio (*Gallus gallus*) en el departamento de Solola. Tesis Méd. Vet. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 55 p.
21. **SEMINARIO INTERNACIONAL DE PATOLOGÍA AVIAR** (IX, 1998. E.E.U.U). 1998. Enfermedad de Newcastle. Ed. por P. Villegas. p. 476-479.
22. **TIZARD, I.** 1989. Inmunología Veterinaria. 3 ed. Trad. Carlos Eduardo Casacuberta Zaffaroni. México. p. 119-125.

23. **VILLEGAS, P.** 1996. Enfermedad de Newcastle. Industria Avícola. (E.E.U.U.) 43(2):16-20.
24. **VOLLER, A.; et al.** 1979. The enzyme linked immunosorbent assay. Dynatech Laboratories, Inc., EE.UU. p. 19.
25. **WHITEMAN, C.; BICKFORD, A.** 1988. Avian Disease Manual. 3 ed. American Association of Avian Pathologist, EE.UU. p. 49-53.