

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



**DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PATOGENICIDAD
INTRACEREBRAL DE CEPAS DE LA ENFERMEDAD DE
NEWCASTLE AISLADAS EN EL LABORATORIO DE
REFERENCIA REGIONAL DE SANIDAD ANIMAL
(LARRSA) FMVZ/USAC**

LESTER ENMANUEL POCÓN CABRERA

Médico Veterinario

GUATEMALA, ABRIL DE 2,016

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



**DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PATOGENICIDAD
INTRACEREBRAL DE CEPAS DE LA ENFERMEDAD DE
NEWCASTLE AISLADAS EN EL LABORATORIO DE REFERENCIA
REGIONAL DE SANIDAD ANIMAL (LARRSA) FMVZ/USAC**

TRABAJO DE GRADUACION

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD

POR

LESTER ENMANUEL POCÓN CABRERA

Al conferírsele el título profesional de

Médico Veterinario

En el grado de Licenciado

GUATEMALA, ABRIL DE 2,016

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

DECANO:	M.Sc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
SECRETARIA:	M.V. Blanca Josefina Zelaya Pineda
VOCAL I:	M.Sc. Juan José Prem González
VOCAL II:	Lic. Zoot. Edgar Amílcar García Pimentel
VOCAL III:	M.V. Carlos Alberto Sánchez Flamenco
VOCAL IV:	Br. Marylin Eliza ReyesValenzuela
VOCAL V:	Br. Javier Augusto Castro Vásquez

ASESORES

M.Sc. LUCERO SERRANO ARRIAZA DE GAITÁN

M.V. JULIO CORDÓN Y CORDÓN

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PATOGENICIDAD INTRACEREBRAL DE CEPAS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE AISLADAS EN EL LABORATORIO DE REFERENCIA REGIONAL DE SANIDAD ANIMAL (LARRSA) FMVZ/USAC

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar al título profesional de:

MÉDICO VETERINARIO

ACTO QUE DEDICO

- A DIOS:** Mi padre creador que me dio día a día la fuerza para poder culminar esta meta.
- A LA VIRGEN MARIA:** Madre santa que me conforta durante mis momentos de angustia y soledad.
- A MIS PADRES:** Darío por todo el esfuerzo que has hecho para que yo pudiera cumplir este sueño. Verónica de Pocón por demostrarme el verdadero amor y dedicación incondicional que solo una madre puede dar.
- A MIS HERMANOS:** Mis amigos y confidentes incondicionales de toda la vida, que siempre han estado en los momentos difíciles a lo largo de este camino que hoy se culmina.
- A MIS CATEDRÁTICOS:** Por su paciencia, dedicación, vocación de enseñanza a todos mis catedráticos desde la primaria hasta la licenciatura, pero en especial a la MSc. Lucero Serrano muchas gracias por todas sus enseñanzas, paciencia y al Dr. Juan Pablo Del Águila por los conocimientos compartidos, paciencia y confianza, al Dr. Hugo Barahona por apoyarme en mi formación como profesional.
- A MIS AMIGOS:** Más que amigos hermanos, gracias por alegrar y hacer más agradable este largo camino, nunca voy a olvidar los chistes, risas, enojos, estrés, tristezas y pero sobre todo mucha alegría que vivimos juntos, Erick, Luis, Ro-

drigo, Sergio, Hans, Chan, Ligia, Aurora, Eliot, Manolo y
Dulia.

A MI FAMILIA:

Por su cariño incondicional durante todo este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

- A DIOS:** Por darme el don más preciado que es la vida, por proveerme los recursos necesarios en los momentos de escases y darme fuerza para nunca desmayar y culminar esta meta.
- A LA VIRGEN MARIA:** Gracias madre santísima por cuidarme y protegerme de todo mal a lo largo de toda mi vida, hasta el día de hoy.
- A MI PADRE:** Dario Pocón, sin tu apoyo el día de hoy no pudiera estar parado acá, y poder decir esta meta está cumplida. Siempre has sido un apoyo fundamental a lo largo de mi vida, un claro ejemplo de dedicación y perseverancia, me enseñaste que el trabajo duro siempre es bien recompensado y que de la mano de Dios todo el posible.
- A MI MADRE:** Verónica de Pocón, nunca dejaste de creer en mí, siempre me alentaste a seguir creciendo a nunca desmayar por más difícil que fueran los obstáculos. Gracias por esa dedicación y amor que solo tu como madre puede tener.
- A MIS HERMANOS:** Emerson, Ludwin y Ludman mis primeros amigos, gracias por hacerme sonreír y por tener una sonrisa siempre para mí, los quiero mucho.

A MIS ASESORES: MSc. Lucero Serrano gracias por todas sus enseñanzas, paciencia y confianza, pero sobre todo por su amistad, Dr. Julio Cordón gracias por su apoyo y tiempo.

A DR. JUAN PABLO DEL AGUILA: Muchas gracias por su apoyo incondicional, enseñanzas, consejos y lo más importante por creer en mí trabajo.

A MIS CATEDRÁTICOS: Por transmitirme su conocimiento a lo largo de estos años, por enseñarme que más que una profesión es una forma de vida.

A MI FAMILIA: Por sus apoyo y cariño que siempre me han brindado.

A MIS AMIGOS: A todos y cada uno de ustedes que estuvo a lo largo de estos años, compartiendo anécdotas, enseñanzas y consejos. Por inspirarme a creer y siempre continuar.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. HIPÓTESIS.....	3
III. OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo General.....	4
3.2 Objetivo Específico.....	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
4.1 Enfermedad de Newcastle (ENC).....	5
4.2 Historia.....	5
4.3 Distribución geográfica.....	7
4.4 Situación actual en Guatemala.....	7
4.5 Otros estudios.....	8
4.6 Importancia económica.....	10
4.7 Agente etiológico.....	11
4.8 Cepas de la enfermedad de Newcastle.....	12
4.9 Organización del genoma viral.....	13
4.10 Clasificación por genotipos.....	15
4.11 Susceptibilidad.....	16
4.12 Transmisión.....	17
4.13 Período de incubación.....	17
4.14 Propiedades biológicas.....	18
4.14.1 Actividad de hemaglutinación.....	18
4.14.2 Actividad hemolítica.....	19
4.14.3 Hemólisis y fusión celular.....	19
4.14.4 Actividad de neuraminidasa.....	19
4.15 Multiplicación viral.....	20
4.16 Patogenicidad.....	21
4.17 Base moleculares de la patogenicidad.....	25

4.18	Patogenesis e inmunidad.....	25
4.19	Características de la enfermedad.....	27
4.20	Sintomas.....	28
4.21	Impacto zoonótico.....	30
4.22	Diagnóstico.....	30
4.22.1	Lesiones.....	31
4.22.2	Viroológico.....	31
4.22.2.1	Detección de antígenos virales por inmunohistoquímica.....	31
4.22.2.2	Aislamiento e identificación viral.....	32
4.22.2.2.1	Índice de patogenicidad.....	34
4.22.2.2.2	Índice de ptogenicidad intercerebral (IPIIC).....	35
4.22.2.3	Molecular.....	36
4.22.2.4	Serológico.....	37
4.23	Control.....	38
4.24	Bioseguridad.....	39
4.25	Vacunación.....	40
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
5.1	Materiales.....	43
5.1.1	Recursos humanos.....	43
5.1.2	Recursos de laboratorio.....	43
5.1.3	Fase experimental.....	44
5.1.4	Centro de referencia.....	44
5.2	Metodología.....	45
5.2.1	Reactivación de las cepas.....	45
5.2.2	Determinación del índice de patogenicidad intracerebral.....	46
5.2.3	Análisis de datos.....	47
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
VII.	CONCLUSIONES.....	52

VIII. RECOMENDACIONES.....	53
IX. RESUMEN.....	54
SUMMARY.....	56
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
XI. ANEXOS.....	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.1

Características de las cepas de la ENC de acuerdo de los tres grupos de virus de la enfermedad, Guatemala 1965.....8

Cuadro No.2

Comparación de resultados entre pruebas “In vivo” e “In vitro”..... 24

Cuadro No. 3

Clasificación del patotipo de las cepas estudiadas de acuerdo a la clasificación European Food Safety Authority 2007.....48

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle (ENC) es producida por un virus de la familia *Paramixoviridae*. Es una enfermedad de denuncia obligatoria y notificable a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

La ENC causa una de las enfermedades más graves en la avicultura comercial y está inscrita en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) por esta razón es de declaración obligatoria. El virus ha sido aislado de una amplia variedad de especies de aves silvestres y domésticas en todo el mundo. Las diferentes cepas existentes inducen enorme variación en la severidad de la enfermedad. Las infecciones virales pueden variar desde signos inaparentes a severos dependiendo de factores propios del huésped y del virus. La forma usual es una infección respiratoria, pero también pueden aparecer signos como manifestaciones nerviosas o digestivas.

Basados en la severidad de la enfermedad en pollos puede dividirse en cinco patotipos y según pruebas de patogenicidad se clasifican en altamente patógenas o virulentas de presentación velogénica viscerotrópica y velogénica neurotrópica (Forma de Beach, neumoencefalitis aviar); de moderada virulencia o mesogénicas; apatógenas de baja virulencia, de presentación lentogénica o respiratoria (Forma de Hitchner) y asintomática-entérica.

La variación extrema de los aislamientos y el uso generalizado de vacunas vivas implica que la identificación de un aislamiento como Virus de la enfermedad de Newcastle (VEN) a partir de aves que muestren signos clínicos requiere una valoración de la virulencia. Hasta la fecha, esta valoración se basa habitualmente en una o más de las siguientes pruebas in vivo: Tiempo medio de muerte embrionaria, índice de patogenicidad intravenoso e índice de patogenicidad intracerebral.

Esta enfermedad afecta a las aves de avicultura tecnificada (reproductoras, postura y engorde) como también a las aves de traspatio debido a su alta susceptibilidad; es además una enfermedad limitante para el comercio internacional de aves, productos y subproductos.

El objetivo de este estudio es determinar el índice de patogenicidad intracerebral de los aislamientos virales correspondientes a la ENC realizados durante el año 2014 en el Laboratorio de Bioseguridad III (LARRSA) de la Universidad de San Carlos de Guatemala, el cual cuenta con todo el equipo y condiciones necesarias para determinar el Índice de patogenicidad intracerebral (IPIC).

II. HIPÓTESIS

El 100% de las cepas de la enfermedad Newcastle (ENC) aisladas en LARRSA de enero a agosto del año 2014 poseen un índice de patogenicidad 0.0.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Generar información acerca del índice de patogenicidad de las cepas de la enfermedad de Newcastle, aisladas en Laboratorio de Referencia Regional de Sanidad Animal (LARRSA), por medio de la técnica de inoculación intracerebral.

3.2 Objetivo Específico

Determinar el índice de patogenicidad intracerebral en pollos de un día de edad de cepas de la enfermedad de Newcastle aisladas en el Laboratorio Referencia Regional de Sanidad Animal (LARRSA).

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Enfermedad de Newcastle (ENC)

También conocida como Neumoencefalitis Aviar y Pseudopeste, es una enfermedad viral que puede producir signos respiratorios, digestivos y nerviosos en la mayoría de las aves de cualquier edad; en el hombre llega a producir conjuntivitis (Rojas, E. 2008).

4.2. Historia

En 1926, se reporta una enfermedad altamente contagiosa y mortal de las gallinas en dos lugares diferentes del mundo, las Islas de Java, Indonesia y en la localidad de Newcastle-on-Tyne, Inglaterra (Cuello, S., Vega, A., Noda, J. 2011).

Sin embargo, existían reportes de brotes de una enfermedad similar en Corea en 1924 y en Europa Central antes de 1926, aunque se desconocía el agente causal, Doyle pudo establecer la diferencia con la peste aviar mediante el empleo de pruebas de inmunidad y el virus recibió el nombre de virus de la enfermedad de Newcastle por el lugar donde se aisló (Cuello, S. et al., 2011).

Posteriormente, la enfermedad se difundió con rapidez a Filipinas, China, Japón, Corea, Australia, España y parte de África. En 1935, llega a la costa norteamericana del Pacífico y después de 1940 se difunde al resto de América, Egipto y todos los países de Europa. A partir de este momento se notifica la presencia de brotes de la enfermedad en todos los continentes excepto Oceanía (Cuello, S. et al., 2011).

Se considera que se han presentado cuatro o más pandemias de la enferme-

dad, la primera, abarcó desde el brote inicial en 1926 hasta cerca de los años 60 y se originó en el sudeste asiático con una lenta diseminación hacia Europa. La segunda; a diferencia de la primera, tuvo una rápida diseminación y comenzó a finales de los años 60 hasta el año 1973. La difusión más rápida de la enfermedad en estos años estuvo influenciada por el mayor desarrollo de la industria avícola, con un considerable aumento en el comercio internacional. El virus responsable de esta panzootia estuvo asociado con la importación de patos, la cual provocó el desarrollo de vacunas y medidas para la protección de la industria avícola, entre las cuales se incluían nuevas regulaciones para la importación de aves exóticas (Cuello, S. et al., 2011).

La tercera panzootia se inició a finales de los años 70 en el medio Oriente, la especie de ave inicialmente afectada fue la paloma doméstica, lo que posibilitó una rápida diseminación de la ENC a Europa y otras partes del mundo debido al contacto entre aves de competencia, ornamentales y al gran comercio internacional de dichas aves. La diseminación de la enfermedad a los pollos produjo en Europa numerosos brotes como resultado de la comida contaminada por heces de palomas infectadas. En la actualidad, se reconoce que la enfermedad se mantiene controlada aunque de forma enzoótica en esta especie, en muchos de los países afectados (Cuello, S. et al., 2011).

La cuarta panzootia según varios autores inició desde finales del año 1996 hasta la actualidad. Debido que se han presentado numerosos brotes de la enfermedad en diversas partes del mundo, constituyendo elementos suficientes para que en conjunto se le considere la cuarta panzootia de Newcastle, la cual afectó además de muchos países, a Australia, país que era libre de la enfermedad desde los años 1930-1932 (Cuello, S. et al., 2011).

En el continente americano durante el último lustro se han reportado brotes de la enfermedad en la industria avícola comercial en México, Honduras, Colombia

Venezuela, en varios estados de los Estados Unidos y en Canadá (Cuello, S. et al., 2011).

Recientemente se ha reportado la presencia de un virus variante que circula entre palomas capaz de afectar gallinas (Woernle, H. 1994).

Existe siempre la amenaza de un nuevo brote de la enfermedad, como consecuencia del comercio avícola mundial y del ingreso de productos aviares congelados procedentes de países todavía afectados, así como por la importación de pájaros exóticos (Woernle, H. 1994).

4.3. Distribución geográfica

El amplio uso de la vacunación para el control de la ENC constituye una evidencia de la extensa difusión de la enfermedad a nivel mundial; esto unido a su forma de diseminación dificulta determinar su distribución geográfica, la cual depende también de las medidas tomadas por los diferentes países para el control y erradicación de la misma. La enfermedad está ampliamente diseminada en muchos países de Asia, África y América; solo algunos países de Oceanía parecen estar relativamente libres de la misma (Cuello, S. et al., 2011).

Actualmente se reporta en el continente euroasiático, africano, americano y en Australia donde ha ocasionado pérdidas considerables por la mortalidad que produce y por el sacrificio sanitario aplicado para evitar una mayor diseminación de la enfermedad, así como las restricciones en el comercio de aves (Cuello, S. et al., 2011).

4.4. Situación actual en Guatemala

Guatemala está libre de Newcastle velogénico, enfermedad de denuncia obli-

gatoria a la OIE, enfermedad limitante del comercio internacional de aves, productos y subproductos. (PROSA. 2014)

4.5 Otros estudios

En 1965 usando inoculación embrionaria y patogenicidad intracerebral Leiva, E. caracterizó cuatro cepas de virus aislados.

Cuadro No.1 Características de las cepas de la ENC de acuerdo a los tres grupos de virus de la enfermedad, Guatemala 1965

TIPO	LETOGÉNICA	MESOGÉNICA	VELOGÉNICA
CEPAS	G-C	G-B	G-A
TMM en Horas	96	72	64
IPIC (Pollo de 1 día)	0.62	1.0	0.85
Estabilidad de Hemoaglutinas a 56 C. (Tiempo en minutos)	30	30	30
Hemoaglutinación en eritrocitos de pollo	1/80	1/640	1/512
Hemoaglutinación eritrocitos de mamíferos	Bovinos	1/10	1/160
	Equinos	1/80	1/340

Fuente. Leiva, E. 1965

Leiva, E. reporta la presencia en ese entonces de virus de cepas lentogénicas, mesogénicas y velogénicas, así mismo coincide con que la severidad de cada brote es variable y se relaciona con el patotipo descrito. En el estudio reportado la Cepa G-C se manifestó en el campo como un brote severo, a pesar de corresponder a una lentogénica, debido a que las aves no habían sido vacunadas durante su vida (Leiva, E. 1965).

Otros de los aportes de este estudio es en relación a la termo estabilidad de las hemoaglutininas en las que reporta que la mayoría de las cepas del virus estudiado, es de 30 minutos, excepto en una de ellas que se establece a 60 minutos; mientras que la mayoría de las Cepas estadounidenses, no son estables a 15 minutos. (Leiva, E. 1965). En el caso de este estudio es importante mencionar que los parámetros para realizar la lectura eran más amplios con respecto a la actualidad y las cepas de reporte obligatorio eran las cepas con IPIC mayor al 1.5 a diferencia de la actualidad que la cepas de reporte obligatorio son las que tienen un IPIC mayor a 0.7. (Leiva, E. 1965).

En el año 2011 se publicó el estudio de anticuerpos circulantes contra Influenza Aviar y Newcastle en zanates (*Quiscalus mexicanus*) de la ciudad de Guatemala. Esta investigación generó información sobre el papel del zanate en la epizootiología de la Influenza Aviar (AI, *Orthomyxoviridae*) y Newcastle (ENC; *Paramixoviridae*; de las 71 muestras analizadas el 100% fueron negativas a IA, pero el 88.73% resultaron positivas a ENC utilizando la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH). El sitio de colecta, época, largo de cola, peso y sexo del ave no mostraron asociación o efecto sobre la presencia de titulación de anticuerpos contra ENC, lo que puede significar que el virus no afecta su eficiencia biológica. Los zanates pueden ser potenciales dispersores de la ENC por su amplia distribución que incluye áreas urbanas y rurales (Escobar, L. 2011).

En el 2002 De Noguera, C. et al. presentaron el estudio sobre “Aislamiento, patogenicidad y estudio de algunas propiedades biológicas de una cepa del virus de la Enfermedad de Newcastle” este estudio se realizó con la finalidad de evaluar la patogenicidad y algunas propiedades biológicas de una cepa del virus de la Enfermedad de Newcastle aislado de un lote de pollos de engorde.

Las pruebas realizadas fueron índice de patogenicidad intracerebral (IPIC), índice de patogenicidad intravenoso (IPIV) en aves libres de anticuerpos, el tiempo

medio de muerte embrionaria (TMM), la termo estabilidad de la hemoaglutinina y el tiempo de elusión. Los resultados mostraron un IPIC de 1,9 y un IPIV de 2,2. En el IPIC el 100% de las aves presentaron secreción mucosa en tráquea y hemorragia severa en cloaca, el 75% presentó hemorragia en proventrículo y 25% hemorragia y necrosis en el tracto intestinal. El TMM fue de 57,6 horas y la termo estabilidad de la hemoaglutinina fue de 15 minutos la cepa presentó un tiempo de elusión intermedio. Las pruebas de patogenicidad concuerdan con las descritas para las cepas velogénicas viscerotrópicas responsables de la forma Doyle's de la enfermedad, siendo las propiedades biológicas consideradas intrínsecas de cada cepa e independientes de la virulencia (De Noguera, C., León, A., Infante, D., de Rolo M., Sánchez, R., Herrera, A. 2002).

4.6 Importancia económica

Su importancia económica radica en ser una de las enfermedades, en su forma patógena, más importante y devastadora que afecta al pollo. La magnitud de este problema a nivel mundial varía debido a la presentación de brotes recurrentes de la ENC caracterizados por alta mortalidad y otros donde solo se observan infecciones respiratorias ligeras o en algunos casos sin evidencias clínicas de enfermedad (Cuello, S. et al., 2011).

Debido a su importancia en el mercado avícola internacional, la enfermedad de Newcastle altamente patógena está inscrita en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y es de declaración obligatoria a la OIE (Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE).(OIE, 2014); además la OIE cambió la definición de la enfermedad que ahora incluye en su reporte infecciones por virus de moderada y de alta virulencia, mientras que la definición anterior solo incluía las infecciones por cepas altamente patógenas(Cuello, S. et al., 2011).

4.7 Agente etiológico

El virus pertenece al Orden *Mononegavirales*, Familia *Paramixoviridae*, Subfamilia *Paramixovirinae* y Género *Rubulavirus*. Existen 9 serotipos de *Paramixovirus*, de estos el agente causal de la Enfermedad de Newcastle es el denominado *Paramixovirus aviar tipo 1* (PMV-1) (Hernandez, R. 2003).

Los virus que pertenecen a esta familia son envueltos y pleomórficos, generalmente, son redondeados y miden entre 100-150 nm de diámetro. La superficie de la partícula viral presenta proyecciones de aproximadamente 8 nm de longitud. Presenta alrededor de un 20-25% de lípidos derivados de la célula hospedero y cerca de un 6% de carbohidratos. El peso molecular de la partícula es de 500×10^6 daltons, con una densidad en gradiente de sacarosa de 1.18-1.20g/mL. La cápside tiene simetría helicoidal y el genoma es ácido ribonucleico (ARN) no segmentado, de simple cadena y polaridad negativa. Los *Paramyxovirus* aislados de las aves (APMV) han sido clasificados por inhibición de la hemaglutinación (IHA) en 9 serotipos, designados APMV-1 hasta el APMV-9. El Virus de la Enfermedad de Newcastle (VEN), aunque produce una variedad de signos clínicos en las aves, todas las cepas del virus forman un grupo antigénico homogéneo, que ha sido designado como APMV-1; sin embargo, el *Paramyxovirus tipo 1* que afecta a las palomas (PPMV) se diferencia antigénicamente de los APMV-1 clásicos por tener un patrón característico de reacción frente a anticuerpos monoclonales, lo que lo identifica como variante antigénica de APMV-1. (Cuello, S. et al., 2011).

La enfermedad es causada por un *Paramixovirus* cuya característica principal es la capacidad de aglutinar los glóbulos rojos de ciertas especies animales (hemoaglutinación). No presenta diferencias antigénicas, pero si en el grado de patogenicidad; con base en esto, las cepas se han clasificado, según el tiempo que tardan en matar al embrión de pollo en:

- Lentogénicas, en 96 horas o más.
- Mesogénicas, en 72 a 96 horas.
- Velogénicas, en 24 a 72 horas. Rojas, E. 2008

4.8 Cepas de la enfermedad de Newcastle

Las cepas del virus de Newcastle han sido agrupada en: Lentogénicas, Mesogénicas y Velogénicas.

- Cepas lentogénicas: El grupo de las cepas lentogénicas, están integradas por las cepas Hitchner BI, Clona 30, La sota y F que han sido ampliamente utilizadas como cepas vacunales. Además, las cepas ULSTER C2, MCIIIO y V4 aisladas recientemente son estables al calor, se replican en la mucosa intestinal y se consideran cepas asintomáticas.
- Cepas mesogénicas: Cepas de virulencia media, son la Roakin, Komarov, Meekteswar, H, además son utilizadas como cepas vacunales.
- Cepas velogénicas: Las cepas velogénicas o virulentas de campo que se han identificado son, la Milano, Hertz 33, NY, Parrot 70181 y ESSEX 70, que son vicerotropicas y la Texas GB neurotrópica, que han sido utilizadas como cepas de desafío.

Otras cepas como la Ca 1083 y Largo son aislamientos considerados como velogénicas viscerotropicas de Newcastle, que son utilizados también en condiciones de laboratorio con sistemas de alta bioseguridad, para hacer pruebas de desafío y comprobar la eficiencia de las vacunas. Las cepas mexicanas Chimalhuapan, Queretaro e Iztapalapa se consideran en este grupo (Moreno, R. 1994)

4.9 Organización del genoma viral

El ARN de aproximadamente 15 a 186 nucleótidos tiene 6 genes, NP, P, M, F, HN, L, en el orden 3'-5', que codifican a su vez para las proteínas estructurales y no estructurales: la nucleoproteína (NP), la proteína fosforilada (P), la ARN polimerasa ARN dependiente (L), la proteína de la matrix (M) no glicosilada, que forma la capa interna de la envoltura manteniendo su estructura e integridad, la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) (Cuello, S. et al., 2011).

El gen L tiene 6 regiones altamente conservadas esenciales para la actividad enzimática de la polimerasa, es el más conservado de los genes virales y es el último que se transcribe del genoma. Su producto, la proteína L es la menos abundante en la partícula viral y en asociación con la proteína P constituyen la polimerasa viral activa (Cuello, S. et al., 2011).

La nucleoproteína (NP), codificada por el gen NP, es esencial para la replicación viral y las diferencias encontradas entre las proteínas NP de distintos aislamientos del virus pudieran tener un papel importante en la virulencia individual de las cepas. Este gen es bien conservado dentro de todos los APMV-1 y es el primero y que más se transcribe durante el ciclo de multiplicación viral. Su proteína es la que se encuentra en mayor cantidad en la partícula viral y está estrechamente asociada con el ARN genómico formando la nucleocapside. Así mismo también están asociadas a la NP, la proteína fosforilada (P), y la ARN polimerasa ARN dependiente (L) y juntas forman la ribonucleoproteína. A partir del gen P por el uso alternativo de diferentes marcos de lectura, el VEN transcribe tres ARN mensajeros (ARNm) que codifican para las proteínas P, V y W. La versatilidad funcional de las proteínas V y W ha sido investigada recientemente y se ha demostrado su participación en la transcripción, síntesis, ensamblaje y propagación viral. También se ha confirmado que la proteína V es indispensable para la replicación

viral y está relacionada con la patogenicidad debido a que afecta la respuesta del interferón y apoptosis en la célula infectada. Además, sus niveles de expresión están directamente relacionados con la virulencia del VEN para el embrión de pollo y al mismo tiempo, está relacionada con el rango de hospedero que afecta este virus, restringiéndolo solamente a las células aviares debido a que la actividad antagonista del interferón es especie específica (Cuello, S. et al., 2011).

Las proteínas HN y F están expuestas como protuberancias en la superficie de la envoltura del virión y son esenciales para iniciar la infección viral. La HN es la más grande de las moléculas glucoproteicas y tiene actividad hemaglutinante y de elusión. Esta proteína es la responsable de la unión de las partículas virales a los receptores del ácido siálico de la célula hospedero, actúa como neuraminidasa removiendo los receptores del ácido siálico de la progenie viral para prevenir la aglutinación de las mismas y desempeña un papel importante en la patogenicidad de este virus (Cuello, S. et al., 2011).

Estudios realizados en la secuencia de nucleótidos del gen de la HN de diferentes aislamientos del VEN demostraron que pueden producirse tres genotipos diferentes de HN de acuerdo a la posición del codón de parada dentro del marco de lectura de esta proteína. De acuerdo con esto, durante la traducción se produce una proteína de 616, 577 o 571 aminoácidos. Mientras que la proteína de 616 aminoácidos se sintetiza como un precursor que necesita para activarse biológicamente de un procesamiento proteolítico, las de 577 o 571 aminoácidos no requieren ser segmentadas para ser funcionales y están presentes en la mayoría de las cepas del VEN, incluyendo cepas lentogénicas, mesogénicas y velogénicas. Sin embargo, resulta interesante destacar que la HN de 571 aminoácidos se ha encontrado solamente en las cepas velogénicas (Cuello, S. et al., 2011).

La proteína F es la responsable de la fusión de las membranas celulares y virales durante la penetración. Esta proteína es el principal determinante de la

patogenicidad de VEN, su actividad es independiente del pH y como resultado de ello las células infectadas que expresan esta proteína viral en su superficie se fusionan con las células adyacentes formando células gigantes multinucleadas, efecto característico de este virus cuando se multiplica en cultivos celulares (Cuello, S. et al., 2011).

Otros estudios han demostrado que el sitio de escisión en la proteína de fusión viral, también es determinante en la virulencia del virus, como se ha demostrado consistentemente, los estudios con VEN recombinantes generados por medio de genética inversa mostraron que la virulencia aumento significativamente cuando el sitio de escisión de una cepa lentogénica se convirtió en la de una cepa velogénica (Dortmans, J., Koch, G., Rottier, P., Peeters, B. 2011).

En otros estudios la observación de que el valor IPIC de virus de origen lentógeno que contiene un sitio de escisión velogénica artificial no es tan alta como la de las cepas velogénicas de los que procede el sitio de escisión; entonces debe haber otros factores que contribuyen a la virulencia y en la medida de la enfermedad clínica (Dortmans, J. et al., 2011).

4.10 Clasificación por genotipos

En años recientes han surgido muchos estudios del genoma del virus de la ENC dando lugar a varias clasificaciones, una de las cuales divide a estos virus en dos clases: I y II. La clase I contiene 9 genotipos y la II, 10 genotipos. En la clase I todos son lentogénicos y propios de aves acuáticas. La clase II, con sus 10 genotipos contiene todos los virus lentogénicos, mesogénicos y velogénicos conocidos de las aves comerciales (Mosqueda, A. 2012).

No obstante la diversidad de genotipos, se admite la existencia de un solo

serotipo, por lo cual ha sido posible el uso de vacunas elaboradas con virus de un genotipo para la protección de los demás genotipos. Las vacunas lentogénicas La Sota y varias otras pertenecen al genotipo II, por ejemplo, mientras que una cepa de VNC altamente patógena como la Chimalhuacán (de México) pertenece al genotipo II (Mosqueda, A. 2012)

Una de las inquietudes actuales es la comprobación de que un virus lentogénico puede, bajo circunstancias y periodos indeterminados mutar hacia una mayor virulencia, y se piensa que la abundante circulación entre las aves puede facilitar este fenómeno. Existen teorías interesantes sobre la forma en que en la naturaleza surgen nuevos genotipos, o nuevas formas de virulencia entre cepas nuevas o ya existentes (Mosqueda, A. 2012)

4.11 Susceptibilidad

Son afectadas naturalmente las gallinas y pavos, así como otras especies de aves: Faisanes, patos, gansos, palomas, codornices, perdices, gorriones y otras aves silvestre. Son susceptibles a la infección las aves de todas las edades.

La infección en seres humanos sólo se ha manifestado como una afección relativamente moderada, parecida al ojo rosado, contraída por las personas que manejan aves enfermas o muertas, o por el personal de laboratorio o que trabaja con el virus (Barger, E., Card. L., Pomeroy. B. 1959). No es una enfermedad en la que peligre la vida; sin embargo, podría ser posible que APMV-1 cause neumonía grave en personas inmunodeprimidas (Center for Food Security and Public Health, 2011)

El virus de la enfermedad de Newcastle se ha considerado, como específico para especies aviares; sin embargo en el año 2012 Yuan, X., Wang, Y. reportan el aislamiento de un *Paramixovirus* denominado “Xiny 10” en un cerdo enfermo con

síntomas clínicos de pérdida progresiva de peso, fiebre y diarrea, determinándose por medio de la homología de aminoácido que corresponde con la vacuna La Sota, además, “Xiny10” y La Sota poseían los mismos 12 residuos de cisteína conservados y 6 posibles sitios de glicosilación. Los datos anteriores sugieren que el virus porcino pudo haberse generado a partir de la cepa La Sota, ya que ha sido ampliamente utilizado como virus vivo vacunal en China (Yuan, X., Wang, Y., Yang, J. 2012)

4.12 Trasmisión

La vía principal de transmisión de ENCes, sin duda alguna la aerógena, lo cual explica su alta contagiosidad. Pero recientemente se ha demostrado mediante la preparación y la administración cuidadosa de cápsulas de gelatinaportadoras del virus que también es posible la transmisión por la vía enteral; sin embargo la cantidad de virus que para ello se requiere es considerablemente superior a la que exige las vías parenterales y aerógena. En el periodo de máxima eliminación vírica de los animales enfermos bastaría 25 mg de heces fecales para infectar a los pollitos por vía alimentaria (Fritzche, K., E, Gerriets.1962).

4.13 Periodo de incubación

Varía de dos a quince días, con un promedio de cinco a seis días y depende de:

- Tipo de cepa.
- Cantidad de virus
- Edad del animal
- Susceptibilidad de la especie (Rojas, E. 2008).

A efectos del Código sanitario de los animales terrestre de la OIE, el período de incubación de la enfermedad de Newcastle es de 21 días (OIE. 2014).

4.14 Propiedades biológicas

La infectividad del virus puede ser eliminada por tratamientos físicos y químicos tales como el calor, radiaciones, procesos de oxidación, efectos de pH, solventes lipídicos y varios compuestos químicos. La velocidad a la cual es destruida la misma depende de la cepa de virus, el tiempo de exposición, concentración viral, la naturaleza del medio de suspensión y las interacciones entre los tratamientos (Cuello, S. et al., 2011).

En la médula ósea y músculos de pollos la infectividad de las partículas virales puede ser preservada por más de 6 meses en congelación y por más de 134 días a 4°C. En la piel el virus persiste infectivo por un período de alrededor de 60 días, en restos de animales muertos a temperatura entre los 40-43°C y con una humedad relativa entre el 20-30% la infectividad del virus persiste por al menos 4 semanas (Cuello, S. et al., 2011).

Varias actividades biológicas están asociadas con los *Paramyxovirus*, pero las principales y que caracterizan a este virus se relacionan con:

4.14.1 Actividad de hemaglutinación

La capacidad del VEN de aglutinar eritrocitos es debida a la unión de la proteína HN a los receptores presentes en la superficie de los mismos (Cuello, S. et al., 2011). Se comprobó que el virus de la EN posee actividad hemoaglutinante (HA) para los eritrocitos de las gallinas, parecida a la que ejerce el virus de la influenza. De igual manera, la HA del virus de la enfermedad de Newcastle es específicamente inhibida o neutralizada por el suero de animales que han pasado la infección o tenido contacto con el virus (Biester, H., Schwart, L. 1964).

El virus de la EN no aglutinan los eritrocitos de todas las especies y esta

actividad diferencial permite distinguirlo del virus de la peste de las gallinas, sin embargo, no todas las cepas poseen igual actividad contra los eritrocitos de la gallina ni tampoco contra los de otras especies. Se necesitan concentraciones mínimas de 20 millones de LD₅₀ para el embrión por mililitro, de varias cepas altamente patógenas, para producir hemoaglutinación (Biester, H., Schwart, L. 1964).

4.14.2 Actividad hemolítica

Las propiedades que tiene el virus de EN de hemolizar los eritrocitos “in vitro” fue descubierta y estudiada con dos cepas. La actividad hemolítica es más intensa contra los eritrocitos de las gallinas que contra los del hombre y el carnero, y es neutralizada por el suero inmune contra EN (Biester, H., Schwart, L. 1964).

4.14.3 Hemólisis y fusión celular

El VEN puede causar la hemólisis de eritrocito-saviares y mamíferos, aunque esta característica no se usa en el diagnóstico puede ser empleada para diferenciar aislados virulentos y avirulentos. También puede producir la fusión de varias células y resultar en la formación de sincitios o células gigantes (Cuello, S. et al., 2011).

4.14.4 Actividad de neuraminidasa

Es producida por el mucopolisacárido N-acetilneuramínico presente en las partículas del VEN. Después de la unión a los eritrocitos, la neuraminidasa destruye el receptor del ácido siálico y produce la elusión de los mismos. Su función en la replicación viral no se conoce hasta el momento y no se han encontrado variaciones antigénicas entre las neuraminidasa de las diferentes

cepas del VEN, por lo tanto no son de interés en el diagnóstico serológico (Cuello, S. et al., 2011).

El tiempo de elusión de las partículas virales a 4°C o 37°C y la destrucción de la actividad hemoaglutinante a 56°C es utilizado en la caracterización de las cepas y quienes son reconocidas como marcadores fenotípicos del VEN, que no están relacionadas con la patogenicidad o virulencia de las cepas (Cuello, S. et al., 2011).

4.15 Multiplicación viral

La replicación del virus ocurre completamente en el citoplasma. Luego de la unión del virus a la célula por medio de los receptores glicolipídicos, se produce la fusión de las membranas virales y celulares a pH fisiológico y la nucleocápsida penetra dentro de la célula, donde permanece intacta con sus tres proteínas asociadas, seguidamente se activa la ARN polimerasa ARN dependiente para producir varios ARN complementarios de polaridad positiva, que actúan como ARN mensajeros y utilizan los mecanismos celulares para la producción de proteínas virales (Cuello, S. et al., 2011).

Al mismo tiempo, se sintetiza un ARN completo de polaridad positiva que sirve como molde para la replicación del genoma viral de polaridad negativa que se asocia con la nucleoproteína y la transcriptasa para formar la nucleocápsida. La maduración del virión involucra en primer lugar la incorporación en la membrana de la célula hospedero de las proteínas virales de la envoltura sintetizadas, seguido de la asociación de la proteína M y otras proteínas no glicosiladas con la membrana celular modificada. Posteriormente, se ubica la nucleocápsida bajo la proteína M y ocurre la formación y liberación de los viriones maduros por exocitosis (Cuello, S. et al., 2011).

Las cepas del VEN se multiplican bien en huevos embrionados de gallina y debido a esta propiedad y a los altos títulos virales que se alcanzan en ellos, son utilizados para el aislamiento y propagación del mismo. Las cepas virulentas se diseminan rápidamente por el embrión y producen mortalidad en corto tiempo, mientras que las cepas avirulentas no provocan mortalidad y si la producen, ocurre en un lapso mayor de tiempo después de la inoculación. No obstante, este comportamiento puede variar en función de la vía de inoculación, pues cepas que no producen mortalidad embrionaria al ser inoculadas por la cavidad alantoidea provocan la muerte del embrión al ser inoculadas vía saco vitelino. El tiempo que demora un aislado en producir mortalidad en el embrión de pollo está directamente relacionado con su patogenicidad para el pollo. (Cuello, S. et al., 2011).

Cultivos celulares de origen aviar y de mamíferos también son utilizados para la multiplicación de las cepas del VEN, pero los bajos títulos virales obtenidos en la mayoría de los sistemas celulares hace que no sean utilizados generalmente. La replicación en cultivos celulares está relacionada con la virulencia de las cepas para los pollos y el efecto citopático (ECP). La formación de placas en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) es característico de las cepas velogénicas. Las cepas mesogénicas y lentogénicas forman placas sólo cuando iones magnesio y dietilaminoetil DEAE o tripsina son añadidos al medio. (Cuello, S. et al., 2011).

4.16 Patogenicidad

La patogenicidad de las cepas del VEN varía de acuerdo con el hospedero. En los pollos la enfermedad causada por las diferentes cepas del virus puede variar desde muerte súbita con un 100% de mortalidad hasta una infección subclínica. La influencia de la especie hospedero en la infección viral puede ser también marcada, por ejemplo, cepas de virus que provocan enfermedad severa

en pollos y pavos pueden causar signos leves de enfermedad en patos y gansos (Cuello, S. et al., 2011).

En los pollos, la patogenicidad de las cepas del VEN está determinada también por la cepa de virus, aunque la dosis, vía de inoculación, edad de los pollos y las condiciones ambientales influyen en la severidad de la enfermedad. Por lo general, los animales más jóvenes sufren la enfermedad más aguda. Las aves infectadas por las vías naturales (nasal, ocular y oral) desarrollan la infección respiratoria, mientras que la infección por las vías intramuscular, intravenosa e intracerebral favorece la presencia de signos neurológicos (Cuello, S. et al., 2011).

Una de las propiedades más características de las distintas cepas del VEN es su enorme variación respecto a la patogenicidad en los pollos. Las cepas del VEN se agrupan en cinco patotipos con base en los signos clínicos observados en los pollos infectados, estos son: (OIE, 2014)

- **Velogénico viscerotrópico:** Es una forma muy patógena en la que se observan frecuentemente lesiones intestinales hemorrágicas.
- **Velogénico neurotrópico:** Se presenta con mortalidad elevada, habitualmente después de signos respiratorios y nerviosos.
- **Mesogénico:** Se presenta con signos respiratorios y signos nerviosos ocasionales pero baja mortalidad.
- **Lentogénico o respiratorio:** Se presenta con una infección respiratoria leve o subclínica.
- **Entérico asintomático:** Normalmente consiste en una infección entérica subclínica (OIE, 2014).

Las agrupaciones en patotipos casi nunca están claramente definidas, e incluso en infecciones de aves libres de patógenos específicos (SPF) se puede apreciar un considerable solapamiento. Además, puede tener lugar una exacerbación de los signos clínicos inducida por las cepas más benignas si se superponen infecciones por otros microorganismos o en caso de condiciones medio ambientales adversas. Como los signos de la enfermedad clínica en pollos varían ampliamente y el diagnóstico puede complicarse posteriormente por las respuestas diferentes a la infección en los distintos hospedadores, los signos clínicos por sí solos no son fiables para el diagnóstico de la ENC. Sin embargo, los signos clínicos y las lesiones asociadas con los patotipos virulentos proporcionarán una fuerte sospecha de enfermedad (OIE, 2014).

La determinación de la virulencia de los aislados del VEN, según la actual definición de la enfermedad, se realiza tanto por la secuenciación nucleotídica y deducción de la secuencia de aminoácidos de la región del péptido conectante de la proteína F como por pruebas de laboratorio “in vivo”. En la actualidad se recomienda realizar ambas pruebas pues se ha visto que aislados del VEN procedentes de otras especies de aves, como la paloma, muestran resultados discordantes cuando se les realiza la caracterización patogénica (Cuello, S. et al., 2011).

La prueba “in vivo” recomendada es el índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) en pollitos de 1 día de edad. Sin embargo, otras pruebas como el tiempo promedio de muerte embrionaria (TPM), y el índice de patogenicidad intravenoso (IPIV) en pollos de 6-8 semanas de edad también son empleadas. Estas pruebas de acuerdo con sus resultados (Cuadro No. 2) permiten clasificar las cepas o aislados en cepas de baja virulencia conocidas como lentogénicas, cepas de virulencia intermedia, conocidas como mesógenicas y las cepas altamente virulentas denominadas velogénicas, que a su vez se dividen en viscerotrópica y neurotrópica (Cuello, S. et al., 2011).

Además existen pruebas “in vitro” como lo es la formación de placas en fibroblastos y la termo estabilidad. La capacidad de APMV-1 para formar placas se investigó en células de fibroblastos primarios de embrión de pollo, en cultivos de pulmón o de células renales. Tamaño de la placa, la morfología y el color parece estar relacionado con la virulencia. Las cepas lentogénicas requieren la adición de polímeros catiónicos como dietilaminoetil DEAE y los iones de magnesio o tripsina para la formación de placas (European Food Safety Authority, 2007).

Termo estabilidad la inactivación por calor (56 ° C durante 5 minutos) de diferentes cepas APMV-1, esto reveló que hay dos tipos de virus lentógenos; la hemaglutinina de los virus de la vacuna clásica La Sota, B1 puede ser inactivado mien tras que otros virus lentogénicos aislados típicamente de las aves silvestres y todas las cepas mesogénicas y velogénicas permanecen infecciosas después del tratamiento(European Food Safety Authority, 2007).

Cuadro No. 2 Comparación de resultados entre Pruebas “In vivo” e “In vitro”

Patotipos	IPIC	IPIV	TMM	Formación de Placas	Termo estabilidad
Velogénica	> 1,5	> 2.5	< 60 Horas	Si	Si
Mesogénica	0,7 - 1,5	0,0	60 -72 Horas	Si	Si
LentegénicaAvirulenta	< 0,7	0,0	> 90 Horas	No	Si/No

Fuente: European Food Safety Authority, 2007

Algunas modificaciones de estas pruebas (IPIV) han sido realizadas con propósitos específicos, como la inoculación intracloacal en pollos de 6-8 semanas de edad para diferenciar cepas velogénicas viscerotrópicas de otras velogénicas (Cuello, S. et al., 2011).

4.17 Base moleculares de la patogenicidad

La base molecular de la patogenicidad del virus de la enfermedad de Newcastle esta determinada principalmente por la secuencia de aminoácidos presente en la región del péptido conectante o sitio de escisión de la proteína F, que proporciona una clara indicación de la virulencia del virus y por ello ha sido incorporada en la definición de la enfermedad. Esta proteína durante la replicación es sintetizada como un precursor F0, que es activado por un proceso proteolítico post-transcripcional entre los aminoácidos 116 y 117, dando lugar a los fragmentos F1 y F2 para que la progenie viral sea infecciosa (Cuello, S. et al., 2011).

4.18 Patogénesis e inmunidad

Inicialmente el virus se replica en las mucosas del tracto respiratorio e intestinal. La diseminación de la infección en la tráquea ocurre por la acción de los cilios y por la infección célula a célula. La subsiguiente diseminación del virus depende en gran medida de la virulencia de la cepa, mientras que las cepas lentogénicas circulan con bajos títulos, las mesogénicas afectan los riñones, pulmones, bazo y la bolsa de Fabricio y las velogénicas se encuentran dentro de las 12-24 horas pos infección (pi) prácticamente en todos los tejidos, con altos títulos en el timo y más bajos en los músculos y el cerebro (Cuello, S. et al., 2011).

Después de la multiplicación inicial en el sitio de entrada, las cepas velogénicas se difunden al bazo, hígado, riñones y pulmones donde se interrumpe la multiplicación por 12-24 horas hasta las 36 horas pi y los títulos virales disminuyen. El virus infecta el cerebro antes de que circulen cantidades suficientes de anticuerpos y después que la multiplicación en los tejidos no nerviosos ha cesado (alrededor de las 60horas pi) y las aves están moribundas. Durante la segunda multiplicación, después de la interrupción, el virus es nuevamente liberado al flujo

sanguíneo, lo cual está asociado con la aparición de los signos generales de la enfermedad y la excreción de virus. En algunas cepas de virus que afectan rápidamente órganos vitales como el riñón y el hígado, las aves pueden morir antes que los signos sean evidentes (Cuello, S. et al., 2011).

La secuencia en la cual son infectados los tejidos explica porque los signos nerviosos aparecen después de la presencia de los signos respiratorios, intestinales y generales de la enfermedad; sin embargo, en las cepas velogénicas neurotrópicas el virus puede estar presente al mismo tiempo en el sistema nervioso central, en el tracto intestinal y respiratorio (Cuello, S. et al., 2011).

La respuesta inmune inicial a la infección con el VEN es mediada por células y puede ser detectada tan temprano como 2-3 días pos vacunación con vacuna viva lo que explica la temprana protección al desafío en aves vacunadas antes de que puedan ser detectados anticuerpos y evidencia la importancia de esta inmunidad en la respuesta a la vacunación. Sin embargo, se ha demostrado que esta inmunidad sola no protege contra el desafío de las cepas virulentas y los anticuerpos neutralizantes son necesarios para la protección, con un efecto cooperativo de ambos tipos de respuestas inmunes que resulta en la prevalencia de los anticuerpos neutralizantes (Cuello, S. et al., 2011).

La producción de anticuerpos es rápida, tanto a nivel local como sistémica, en el tracto respiratorio superior se detectan anticuerpos de tipo IgA con pequeñas cantidades de IgG, similar a las reveladas en la glándula de Harder que no permiten la replicación viral en estos órganos. En la respuesta sistémica aparecen en una primera fase los anticuerpos de tipo IgM seguido por la IgG, los cuales son detectados entre los 4 a 6 días pi y persisten de 8 a 12 meses. El nivel de los títulos de anticuerpos dependen de la cepa de virus que produce la infección, pero generalmente el nivel máximo de la respuesta se alcanza alrededor de la tercera o cuarta semana pi, después de la cual los títulos comienzan a declinar si no se

realizan reinmunizaciones. Estos anticuerpos son transmitidos mediante el saco vitelino a la progenie y la protegen de la enfermedad en las primeras 3-4 semanas de vida sin interferir con el desarrollo de la respuesta local de anticuerpos (Cuello, S. et al., 2011).

4.19 Características de la enfermedad

El período de incubación de la enfermedad oscila de dos a quince días con un promedio entre cinco a seis días. La enfermedad de Newcastle (ENC) es una afección infecciosa vírica de las aves, muy contagiosa y de gran importancia económica. Curso, síntomas y efectos económicos dependen mucho de la virulencia y afinidad orgánica del agente causal. Las cepas velógenas viscerotropas originan una enfermedad general entre aguda y sobreaguda, de curso hemorrágico, con intensa participación intestinal y diarrea, y tasas de mortalidad hasta del 100% (de la Sota, M., Espinoza, C., 2004).

En los animales afectados, se observa generalmente disnea, cianosis de crestas y barbillas, espasmos musculares, pérdida de apetito, indiferencia, sed intensa, debilidad y somnolencia. A nivel del tracto digestivo, se puede observar, presencia de mucus espumoso y secreción fibrinosa en la faringe y diarrea verde-amarilla. Los signos nerviosos se expresan por parálisis de alas y patas, tortícolis, ataxia o movimientos circulares y convulsiones. En ponedoras ocurre una drástica disminución de la producción de huevos junto con despigmentación y pérdida de la cáscara y una reducción en la calidad de la albúmina (Cuello, S. et al., 2011).

Con cepas de virus muy virulentas la enfermedad puede aparecer súbitamente con alta mortalidad, precedida por lesiones hemorrágicas, signos respiratorios nerviosos, o en ausencia de signos clínicos. En brotes en pollos debido a virus velogénico viscerotrópico, los signos clínicos frecuentemente comienzan con apatía, aumento de la frecuencia respiratoria y debilidad, concluyendo con la pos-

tración y la muerte. También puede causar edema alrededor de los ojos, la cabeza y en las aves que no mueren tempranamente en la infección, puede observarse diarrea verde y antes de la muerte pueden presentarse temblores musculares, tortícolis, parálisis de patas, alas y opistótonos. La mortalidad frecuentemente alcanza el 100% en poblaciones de pollos susceptibles (Cuello, S. et al., 2011).

La enfermedad velogénica neurotrópica, reportada principalmente en los Estados Unidos, se presenta con la aparición brusca de enfermedad respiratoria severa seguida en los dos días posteriores por la aparición de signos neurológicos, una drástica disminución de la postura pero sin la presencia de diarrea generalmente. La morbilidad puede llegar al 100% pero la mortalidad es baja, aunque ha sido reportada hasta un 50% en aves adultas y un 90% en aves jóvenes (Cuello, S. et al., 2011).

Las cepas mesogénicas del VEN generalmente causan enfermedad respiratoria en condiciones de campo. En aves adultas puede provocar una disminución de la postura que dura varias semanas. Pueden presentarse signos nerviosos pero no son comunes. La mortalidad es generalmente baja, excepto en aves muy jóvenes susceptibles que pueden ser considerablemente afectadas por condiciones exacerbantes (Cuello, S. et al., 2011).

Las cepas lentogénicas pueden causar una infección media o subclínica en el tracto respiratorio o infecciones entéricas. En aves jóvenes susceptibles se pueden presentar serios problemas respiratorios con mortalidad cuando se producen infecciones mixtas (Cuello, S. et al., 2011).

4.20 Síntomas

El primer síntoma que puede observarse en las aves de poca edad es estornudos, bostezos y decaimiento, en esta fase de la enfermedad las manifesta-

ciones se parecen mucho a las de la bronquitis infecciosa. Al cabo de poco tiempo de haber aparecido los síntomas respiratorios aparecen manifestaciones nerviosas, que son de tres tipos: 1) falta de coordinación muscular, especialmente en el cuello y las patas, 2) temblores o sacudidas de todo el cuerpo y 3) parálisis parcial o total de una o de las dos patas. Las aves afectadas pueden presentar síntomas de cualquiera o de todas estas categorías, algunas aves son capaces de andar, comer y beber, se mueven de un modo peculiar, como andar hacia atrás o en círculos, con torcedura constante de la cabeza y del cuello. La cabeza se inclina hacia atrás sobre el cuerpo, hacia un lado o bajo el cuerpo (Barger, E., Card, L., Pomeroy B. 1959).

En las aves de mayor edad, el primer síntoma suele ser tos y ronquido, seguidos de la pérdida de apetito o de rápida reducción de la producción de huevo. Se observan huevos con cáscara blanda y huevos puestos en diferentes fases de desarrollo y en algunos casos se presenta una muda parcial. Algunos de los huevos puestos por gallinas infectadas no forman la cámara normal de aire y se encontraban burbujas que flotaban independientemente unas de otras. En los huevos puestos por gallinas afectadas una reducción de la calidad de la albúmina y la producción de cáscaras anormales. Se observa adicionalmente los huevos no se conservan bien durante el almacenamiento (Barger, E., et al., 1959).

Según estudios recientes, la virulencia del virus es variable y puede presentarse en un lote en forma tan moderada que no produce síntomas. El único modo de confirmar la infección es con pruebas de laboratorio (Barger, E. et al., 1959).

Los pavos y las aves acuáticas suelen mostrar manifestaciones patológicas poco marcadas a continuación de sufrir el contagio con virus de la enfermedad de Newcastle (Woernle, H. 1994).

4.21 Impacto zoonótico

Los virus de la enfermedad de Newcastle pueden causar conjuntivitis en humanos; podría presentarse neumonía en personas inmunosuprimidas (Center for Food Security and Public Health, 2011). La literatura refiere los siguientes casos en humanos.

En 2007, AMPV-1, posiblemente originada en palomas, fue aislada de un paciente con neumonía mortal. La enfermedad se presentó 18 días después de que el paciente recibiera un trasplante de célula madre de sangre periférica. La inmunosupresión derivada del procedimiento y las drogas recibidas para suprimir el rechazo al trasplante probablemente permitieron que ocurriera la infección. El APMV-1 pareció ser el único patógeno involucrado (Center for Food Security and Public Health, 2011).

4.22 Diagnóstico

En la ENC el objetivo del diagnóstico es decidir qué medidas de control deben realizarse para evitar la diseminación de la enfermedad, ninguno de los signos clínicos o lesiones producidos por el VEN son considerados patognomónicos y la amplia variación en las manifestaciones de la enfermedad solo sirven para sugerir que estamos en presencia de la misma, además, su demostración sin la identificación del aislado viral es raramente una causa adecuada para la toma de medidas de control debido a la presencia de cepas lentogénicas en las poblaciones avícolas en la mayoría de los países por el amplio uso de vacunas vivas. Así mismo, cuando ocurren epizootias devastadoras de la enfermedad que puedan afectar el comercio de los productos avícolas, las medidas de control son tomadas a nivel nacional e internacional (Cuello, S. et al., 2011).

El diagnóstico confirmativo de la enfermedad debe ser realizado sobre la ba-

se del aislamiento y la identificación viral y/o con el empleo de las técnicas moleculares que permitan la detección específica del virus, así como, la determinación de su potencial de virulencia (Cuello, S. et al., 2011).

4.22.1 Lesiones

En los pollos afectados por cepas virulentas del VEN se observan lesiones hemorrágicas de forma predominante en varias partes del tracto gastrointestinal, en particular en la mucosa que une el esófago con el proventrículo, el proventrículo con la molleja y en la mitad posterior del duodeno, ileon y yeyuno, además, hay inflamación en el tejido linfoide intestinal incluyendo las tonsilas cecales, en hígado, en riñones, en músculos cardíacos y en el bazo producto de la reacción general a la infección. El músculo pectoral se torna de color rojo oscuro y está seco por la deshidratación. Las hemorragias también están presentes en las meninges y a veces en la parte interior del cráneo. El contenido intestinal es de color verde grisáceo. Así mismo, se puede observar conjuntivitis catarral o serosa, rinitis, sinusitis y traqueítis caseosa. En casos muy severos, las hemorragias además están presentes en los músculos, laringe, tráquea, pulmones, sacos aéreos, membranas serosas, pericardio, miocardio y en los folículos del ovario de las ponedoras adultas, varias de estas lesiones fueron observadas también por otros autores en estudios de patogenicidad realizados con cepas velogénicas viscerotrópicas y aislados virulentos del VEN (Cuello, S. et al., 2011).

4.22.2 Viroológico

4.22.2.1 Detección de antígenos virales por inmunohistoquímica

Las técnicas inmunohistológicas son un método rápido para la demostración específica de la presencia de virus o antígenos virales en órganos y tejidos. La inmunofluorescencia y la inmunoperoxidasa en cortes o frotis de tráquea han sido

utilizadas en infecciones producidas por el VEN. Así mismo, Kommers y colaboradores utilizaron el complejo avidina-biotina para la detección de antígenos virales en muestras de corazón, tejidos linfoides, pulmones, tráquea, hígado, riñón y cerebro de pollos infectados experimentalmente con diferentes aislados del VEN (Cuello, S. et al., 2011).

4.22.2.2 Aislamiento e identificación viral

El aislamiento viral constituye un método inequívoco de diagnóstico de la ENC que permite la caracterización del aislado viral. Este método tiene el inconveniente de que los procedimientos utilizados generalmente son lentos pues requieren de múltiples pases, lo cual constituye una desventaja para el control de los brotes debido a la rapidez con que se diseminan las enfermedades virales y el corto tiempo de vida productiva de la mayoría de las aves comerciales (Cuello, S. et al., 2011).

Por otra parte, la presencia de cepas lentogénicas del VEN en las poblaciones avícolas y su uso como vacunas vivas, hacen que el aislamiento no sea suficiente y haya que realizar la posterior identificación y caracterización, utilizando pruebas de laboratorio que permitan determinar la patogenicidad del aislado, ya que su importancia e impacto está directamente relacionado con su virulencia (Cuello, S. et al., 2011).

Para realizar el aislamiento viral en casos de enfermedad severa con alta mortalidad se utilizan muestras procedentes de aves muertas, deben consistir en hisopos oronales, así como tejidos de pulmón, riñones, intestino (incluyendo contenido), amígdalas cecales, bazo, encéfalo, hígado y corazón. Pueden recogerse separadamente o combinadas, aunque, habitualmente, las muestras intestinales y las de encéfalo se procesan de forma separada de otras muestras (OIE, 2014).

Diferentes técnicas serológicas como la virus neutralización (VN), la inmunodifusión doble o agar gel difusión y ELISA se utilizan para la identificación de aislados del VEN, sin embargo el método convencional más utilizado es la inhibición de la hemaglutinación (IHA). La aplicación de esta técnica en la identificación de los aislamientos, se ve favorecida por el hecho de que los aislados de este virus pertenecen a un solo serotipo y por su facilidad y bajo costo (Cuello, S. et al., 2011).

La identificación del aislado se realiza frente a los 16 antisueros de los subtipos de hemaglutinina del virus de la Influenza aviar como diagnóstico diferencial y frente a los 9 antisueros de los serotipos de los APMV, entre los que se han reportado reacciones cruzadas entre el APMV-1 y el APMV-3, particularmente cuando este último es aislado de psitácidas, de aves en cautiverio o exóticas, así como, con el APMV-7 aislado de avestruces, pavos y palomas (Cuello, S. et al., 2011).

La actividad HA detectada en líquidos bacteriológicamente estériles recogidos a partir de huevos inoculados puede deberse a la presencia de cualquiera de los 16 subtipos de hemoaglutininas de los virus de la gripe A o de los ocho restantes serotipos de paramixovirus. (El líquido no estéril podría contener actividad HA bacteriana). El VEN puede confirmarse empleando antisuero específico en una prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI). Habitualmente se utiliza el antisuero de pollo preparado contra una de las cepas del VEN (OIE, 2014).

Las reacciones cruzadas en las pruebas HI entre el VEN y algunos otros APMV, especialmente los virus de los serotipos APMV-3 y APMV-7 pueden causar algunos problemas que pueden resolverse empleando controles adecuados de antígeno y antisuero (OIE, 2014).

Los anticuerpos monoclonales han sido utilizados en la caracterización de los aislamientos virales de VEN, lo cual a permitido determinar la diversidad antigénica ante los APMV-1 (OIE, 2014). La utilidad de esta diversidad en el diagnóstico y epidemiología de los brotes de la ENC depende en gran medida de lo estrechamente relacionada que estén la diversidad antigénica con las propiedades biológicas del virus y el mantenimiento de esta antigenicidad durante una epizootia. (Cuello, S. et al., 2011). Su empleo ha permitido realizar una serotipificación altamente específica y diferenciar virus vacunales de aislados de campo, así como, establecer la especificidad de la variante paloma del VEN y su distribución a nivel mundial (Cuello, S. et al., 2011).

La caracterización patogénica de los aislados del VEN se realiza, de acuerdo con lo reportado en la OIE, por el Índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) en pollitos SPF de 1 día de edad y por la determinación de la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión del péptido conectante de la proteína F (Cuello, S. et al., 2011).

4.22.2.2.1 Índice de patogenicidad

La variación extrema en la virulencia de las distintas cepas del VEN y el uso generalizado de vacunas vivas implica que la identificación de una cepa como PMV-1 a partir de aves que presenten signos clínicos no confirma un diagnóstico de ENC, por lo que también se requiere una valoración de la virulencia de la cepa utilizando pruebas como el promedio de muerte en huevos, la prueba de la patogenicidad intravenosa, y variaciones de esas pruebas, pero por acuerdo internacional, se utiliza la prueba del índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) para la valoración de la virulencia del virus. (OIE, 2014)

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) también reconoce los avan-

ces en los conocimientos sobre las bases moleculares de la patogenicidad y permite una confirmación de la virulencia, aunque no de la ausencia de virulencia, mediante pruebas *in vitro* para determinar la secuencia de aminoácidos en el punto de escisión de la proteína F0 (OIE, 2014).

Dada la severidad del procedimiento, el IPIC solo debe emplearse cuando esté claramente justificado por las circunstancias epidemiológicas, por ejemplo, en la primera cepa aislada de un brote. No sería adecuado emplear el IPIC para cepas detectadas en la vigilancia (OIE, 2014).

Las pruebas *in vivo* de cepas aisladas en especies diferentes al pollo (como palomas) presentan ciertas dificultades, mismas que son subsanadas cuando se realizan en huevos de pollo embrionados, en un número estadísticamente significativo >10 de aves jóvenes y adultas con una dosis estándar de virus (por ejemplo 10^5 DIH 50) administrada por vías naturales (como la oro-nasal) (OIE, 2014)

4.22.2.2.2 Índice de patogenicidad intracerebral (IPIC)

La prueba más sensible y ampliamente utilizado para la medición de la virulencia es la IPIC en pollos de un día. (European Food Safety Authority, 2007) La OIE recomienda realizar el procedimiento de IPIC de la siguiente forma:

- Se diluye líquido alantoideo infectivo y fresco con un título HA $>2^4$ ($>1/16$) a $1/10$ en solución salina isotónica estéril sin aditivos, tales como antibióticos.
- Se inyectan por vía intracerebral 0,05 ml del virus diluido en diez polluelos procedentes de huevos de un grupo de aves SPF. En el momento de la inoculación, estos polluelos deben tener más de 24 y menos de 40 horas de vida.

- Las aves se examinan cada 24 horas durante 8 días.
- En cada observación, las aves se puntúan: 0 si es normal, 1 si está enferma y 2 si está muerta. Las aves que están vivas pero son incapaces de comer o beber deben sacrificarse por métodos humanitarios y ser contabilizadas como muertas en la observación posterior. (Los individuos muertos deben puntuarse como 2 en cada una de las observaciones diarias siguientes a la muerte) (OIE, 2014).
- El índice de patogenicidad intracerebral (IPIIC) es la puntuación media por ave y por observación durante el periodo de 8 días. Los virus más virulentos presentarán índices que se aproximan a la puntuación máxima de 2,0, mientras que las cepas entéricas lentogénicas y asintomáticas presentarán valores próximos a 0,0 (OIE, 2014).

4.22.2.3 Molecular

La introducción de las técnicas moleculares como prueba aceptada para el diagnóstico, identificación y caracterización del VEN por la OIE ha posibilitado realizar el diagnóstico de una forma rápida, segura, sensible y específica que permita tomar las medidas de control adecuadas para prevenir la posterior diseminación y minimizar las pérdidas ocasionadas por la enfermedad (Cuello, S. et al., 2011).

La detección del ácido nucleico viral en muestras de tejidos empleando las técnicas moleculares ha sido reportado el uso de la hibridación “in situ” para detectar la extensión de la replicación viral en muestras de tejidos de pollos infectados con cepas velogénicas, mesogénicas y lentogénicas del VEN (Cuello, S. et al., 2011).

Normalmente se han utilizado sistemas de RT-PCR para amplificar una porción específica del genoma que tiene un valor añadido; por ejemplo, amplificando parte del gen F que contiene el punto de escisión del FO de manera que el producto pueda utilizarse para valorar la virulencia. El principal inconveniente de la utilización de la RT-PCR para el diagnóstico estriba en la necesidad del procesamiento que sigue a la amplificación debido a la contaminación potencial del laboratorio y la contaminación cruzada de las muestras (OIE, 2014).

Una de las estrategias que se siguen para no tener que realizar el procesamiento post-amplificación consiste en la utilización de las técnicas de la RT-PCR (rRT-PCR) en tiempo real. La ventaja de estas pruebas es que la rRT-PCR basada en el uso de sondas de hidrólisis fluorogénica o de tinciones fluorescentes hace innecesaria la fase de procesamiento post-amplificación y se pueden obtener los resultados en menos de 3 horas (OIE, 2014).

4.22.2.4 Serológico

La presencia de anticuerpos específicos al VEN en las aves ofrece poca información sobre la cepa de virus que infecta y por lo tanto tiene limitado valor diagnóstico (Calnek, B, 2000).

No obstante, en poblaciones de aves no vacunadas la demostración de anticuerpos indica que ha sucedido la infección lo que unido al cuadro clínico observado es suficiente para emitir el diagnóstico. Diferentes pruebas serológicas se han utilizado para la detección de anticuerpos al VEN, pero las más empleadas en la actualidad son la inhibición de la hemoaglutinación (IHA) y los ensayos inmunoenzimáticos. (Cuello, S. et al., 2011).

El VEN puede emplearse como un antígeno en una variedad amplia de pruebas serológicas, lo que permite que se utilicen las técnicas de neutralización o de enzimoimmunoensayo (ELISA) y HI para valorar el nivel de anticuerpos en las aves. En la actualidad, la prueba HI es la más ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos contra el VEN en las aves, aunque muchos productores de aves de corral utilizan kits de ELISA comerciales para valorar los niveles de anticuerpos tras la vacunación (OIE, 2014).

Las pruebas HI y ELISA pueden medir los anticuerpos contra diferentes antígenos; dependiendo del sistema utilizado, la prueba ELISA puede detectar anticuerpos contra más de un antígeno, mientras que el uso de la prueba HI probablemente se limita a los anticuerpos contra la proteína de la ENC. No obstante, algunos estudios de tipo comparativo han demostrado que los ELISA son reproducibles y tienen sensibilidad y especificidad altas; se ha demostrado que correlacionan bien con la prueba HI (OIE, 2014).

El diagnóstico serológico post-vacunal es utilizado para confirmar la aplicación exitosa de la vacuna y una adecuada respuesta inmune por el ave (Calnek, B, 2000). Además, este diagnóstico es de gran utilidad en la vigilancia epidemiológica de la enfermedad pues permite conocer si existe circulación viral en las poblaciones avícolas, determinado por un incremento de los títulos de anticuerpos comparado con el perfil que las aves vacunadas deben mostrar, aunque no muestren signos clínicos (Cuello, S. et al., 2011).

4.23 Control

Uno de los objetivos del control es proteger a las aves de la infección con el VEN y por otra parte reducir el número de aves susceptibles mediante la aplicación de la vacunación. Para el control, se tiene en cuenta como factor primordial la diseminación de la enfermedad y en consecuencia, se adoptan

disposiciones a nivel internacional que regulan el comercio de los productos avícolas, así como de aves vivas; sin embargo, los factores más importantes en prevenir la introducción de la enfermedad y su diseminación en presencia de un brote son las condiciones bajo las cuales las aves son criadas y el grado de bioseguridad practicado en las explotaciones avícolas (Cuello, S. et al., 2011).

4.24 Bioseguridad

La bioseguridad y la higiene constituyen dos elementos fundamentales para el control de la ENC y debido a su rápida diseminación entre las poblaciones avícolas, las precauciones sanitarias que se aplican para prevenir la difusión de las enfermedades deben ser rigurosamente utilizadas en este caso (Cuello, S. et al., 2011).

Una buena bioseguridad puede ayudar a prevenir la enfermedad de ENC en las bandadas de aves de corral; éstas no deben estar en contacto con aves de corral domésticas con estado de salud desconocido, cualquier ave doméstica, especialmente psitácidas; o aves silvestres. Siempre que sea posible, los trabajadores deben evitar el contacto con aves fuera de la granja. Las medidas de bioseguridad incluyen galpones protegidos de aves migratorias, suministro adecuado de alimento y agua, reducción al mínimo de los movimientos dentro y fuera de la instalación, y la desinfección de vehículos y equipos que entren a la granja. Las plagas de insectos y ratones también deben ser controlados. Si es posible, los empleados deben ducharse y ponerse ropa exclusiva de trabajo; es aconsejable la cría de todo dentro todo fuera, con desinfección entre grupos (Rovid, A., Roth, J., Galyon, J., Lofstedt, J., Lenardon, M., 2011).

Los brotes son erradicados mediante cuarentenas y controles de movimiento, despoblación de todas las aves afectadas y expuestas, limpieza profunda y desinfección de los locales. Los desinfectantes eficaces incluyen clorhexidina,

hipoclorito de sodio al 6%, fenólicos y agentes oxidantes. El APMV-1 también puede ser inactivado por calor a 56°C durante 3 horas o 60° durante 30 minutos, ácido pH 3, éter y formol; la eficacia del formol varía con la temperatura (Rovid, A. et al., 2011).

Las granjas en general, deben permanecer vacías durante unas semanas antes de la repoblación; el tiempo específico puede variar con el clima, la estación y otros factores (Rovid, A. et al., 2011).

Incluso las gallinas que parecen sanas pueden llevar consigo el virus, contribuyendo luego a su difusión. Tras la congelación de estos canales, el virus conserva durante años su capacidad de multiplicación (Woernle, H. 1994).

4.25 Vacunación

La vacunación constituye la herramienta profiláctica más efectiva y menos costosa para el control de las enfermedades infecciosas y el uso combinado de vacunas vivas atenuadas e inactivadas induce en las aves una mayor protección frente a los agentes infecciosos (Calnek, B, 2000).

La inmunización de las reproductoras reviste una especial importancia pues estas le confieren a la progenie una inmunidad pasiva que puede protegerla durante las primeras semanas de vida (Cuello, S. et al., 2011).

Como consecuencia de la amplia distribución de este virus que ocasiona pérdidas cuantiosas a la industria avícola en los países donde se presenta, diferentes estrategias de lucha se han utilizado en el control de la ENC, entre las cuales se encuentran:

- Vacunación para todas las finalidades zootécnicas

- La vacunación de reproductoras y ponedoras solamente.
- El uso de estrategias de vacunación combinadas con la erradicación, con la vacunación en anillo en caso de brote o la vacunación de toda la población combinada con la erradicación, entre otras. (Cuello, S. et al., 2011).

Las cepas víricas de la ENC empleadas en las vacunas comerciales de virus vivos se encuadran en dos grupos: vacunas lentogénicas tales como Hitchner-B, La Sota, V4, NDW, I2 y F, y vacunas mesogénicas, tales como Roakin, Mukteswar y Komarov. Las cepas de ambos grupos han sido seleccionadas y clonadas para satisfacer los diferentes criterios en su producción y aplicación (OIE, 2014).

Las vacunas de virus activo, casiapatógenas aplicadas por vía nasal, ocular o en agua de bebida, se replican en las células del epitelio mucoso traqueal y de los pasajes nasales, propiciando el establecimiento de la inmunidad tisular, justamente en los tejidos que son la puerta de entrada del virus virulento de campo estableciéndose así una barrera defensiva tisular contra el virus. Las vacunas de virus activo producen su máximo nivel de anticuerpos a 13-15 días después de su aplicación (Moreno, R., 1994).

Las vacunas de virus inactivado en emulsión oleosa, se aplican subcutáneamente, estimulan la formación de anticuerpos con base en su masa antigénica y al no replicarse en los tejidos del ave vacunada y ser aplicada por una vía distinta a la de la infección natural, no producen inmunidad tisular; sin embargo, estimulan la producción de altos niveles de anticuerpos humorales y sus máximos títulos se alcanzan las cuatro semanas después de su aplicación, con la ventaja de que se sostienen durante períodos relativamente largos (Moreno, R., 1994).

Cuando se diseña un programa de vacunación, debería tenerse en consideración el tipo de vacuna utilizada, el estado inmune y de enfermedad de las aves a vacunar y el nivel de protección requerido en relación a cualquier

posibilidad de infección con el virus de campo bajo las condiciones locales (OIE, 2014).

La elección de una u otra estrategia dependerá del área geográfica o país en cuestión, sus contactos con otras regiones que puedan favorecer la introducción de virus virulento y los riesgos de bloqueo del comercio en caso de brotes de la enfermedad. La vigilancia epizootiológica con la realización de los muestreos serológicos y los sistemas de reporte tanto nacionales como internacionales son esenciales para la eficiencia de estas medidas (Cuello, S. et al., 2011).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Referencia Regional Sanidad Animal LARRSA, ubicado en el campus central de la Universidad de San Carlos de Guatemala edificio M-10.

5.1 Materiales

5.1.1 Recursos humanos

- Estudiante investigador
- Dos profesionales asesores
- Técnicos del laboratorio

5.1.2 Recursos de laboratorio

- Líquido alantoideo infectivo.
- Solución salina isotónica estéril.
- Guantes.
- Incubadora a 37°C.
- Huevos fértiles precedentes de grupos de aves sin anticuerpo neutralizantes (SAN).
- Cuaderno de apuntes.
- Lapicero.
- Agar sangre de enriquecimiento y MacConkey
- Placas de microtitulación de 96 fosos de poliestireno.
- Pipetas de microtitulación de 100 µl.
- Glóbulos rojos al 1%.
- Solución salina buferada.

- Puntas de microtitulación de 100 µl.

5.1.3 Fase experimental

- Algodón
- Alcohol
- Concentrado iniciador
- Agua de bebida
- Comederos
- Bebederos
- Cámara de desafío
- Detergente
- Desinfectante
- Prensa
- Escoba
- Pala
- Jeringas de insulina
- Pollitos
- Marcadores
- Masking tape

5.1.4 Centro de referencia

- Biblioteca Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- LARRSA, FMVZ, USAC.
- Internet.

5.2 Metodología

5.2.1 Reactivación de las cepas

- Las tres cepas reactivadas fueron obtenidas los aislamientos realizados de la enfermedad de Newcastle en el período de enero a agosto del 2014, estas se inocularon en huevos embrionados de 9 días en cavidad alantoidea.
- Los huevos embrionados fueron observados diariamente para determinar su viabilidad.
- Los que murieron dentro de las primeras 24 horas después de ser inoculados fueron descartados.
- Los que murieron después de 24 horas fueron refrigerados
- Los que no murieron al cabo de 5 días fueron refrigerados.
- El líquido alantoideo fue cosechado y titulado utilizando la prueba de hemoaglutinación.
- Se diluye líquido alantoideo infectivo y fresco con un título HA $>2^4$ ($>1/16$) se diluyo 1/10 en solución salina isotónica estéril. Sin aditivos, tales como antibióticos.
- El control de esterilidad se realizó en Agar sangre y Agar MacConkey sembrando 0.02 ml de la suspensión viral.

5.2.2 Determinación del índice de patogenicidad intracerebral

- Se inoculó vía intracerebral 10 pollitos SAN, (> de 24 horas y < de 40 horas) con 0,05 ml de la suspensión viral de líquido alantoideo anteriormente titulado > 1:16 y diluido 1:10 con solución salina isotónica estéril. El punto de inoculación correspondió a la parte posterior del cráneo.
- Además, como control negativo se utilizaron 10 pollitos SAN sin inocular a los que se les inoculara 0.05 ml solución salina fisiológica.
- Las observaciones se realizaron diariamente, inspeccionando los pollitos a la misma hora de la inoculación inicial en búsqueda de la presencia o ausencia de signos clínicos o mortalidad por un período total de 8 días.
- Las observaciones fueron calificadas según la propuesta por la OIE en:
(Ver anexo No.1)
- 0: Normal, pollos despiertos que se mueven normalmente.
- 1: Enfermos, con síntomas y parálisis o están postrados, no entran en esta clasificación los que sólo están débiles.
- 2: Muertos
- Para el cálculo del índice de patogenicidad intracerebral, se registraron diariamente el número de pollos normales, enfermos o muertos. El resultado se presentó en forma acumulada, sumando las anotaciones correspondientes a cada categoría y multiplicándolas por un índice de ponderación que va de 0 para los normales, 1 para los enfermos y 2 para los muertos. Los valores resultantes se suman y dividen por el total de las anotaciones acumuladas.

- El IPIC se expresa como la media ponderada del número de observaciones realizadas, siendo 2 el máximo valor posible, lo que correspondería a un 100% de mortalidad en 24 horas.
- Esta metodología se utilizó para las 3 Cepas y los 3 grupos.

5.2.3 Análisis de datos

El índice de patogenicidad intracerebral se obtuvo según como lo indica la metodología de la OIE anteriormente descrita. (Ver anexo No.1)

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de las cepas estudiadas tras la realización del IPIC, fueron para la cepa A se obtuvo un IPIC de 0.00, para la cepa B un IPIC de 0.00 y para la cepa C un IPIC de 0.00. El índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) obtenido de las cepas de la Enfermedad de Newcastle estudiadas fue de 0.00 en el 100% de los casos, por lo cual ninguna de las aves de un día de edad inoculadas presentó síntomas clínicos de la enfermedad.

De acuerdo a la European Food Safety Authority. 2007, las cepas de la Enfermedad de Newcastle han sido clasificadas en tres patotipos. Ver cuadro 1.

Cuadro No. 3 Clasificación del patotipo de las cepas estudiadas de acuerdo a la clasificación European Food Safety Authority 2007

Patotipo de Cepa de Newcastle	IPIC	Patotipo de las cepas estudiadas
Velogénica	> 1.5 - 2	0%
Mesogénica	0.7 - 1.5	0%
Lentogénica	< 0.7	100%

Fuente: Elaboración propia

Al comparar las cepas aisladas en el periodo de estudio (enero a agosto del 2014) con el cuadro anterior, observamos que las mismas corresponden a cepas lentogénicas o apatógenas con resultados IPIC menores a 0.7 (IPIC 0.0 en el 100% de los casos), ya que las cepas mesogénicas se sitúan entre 0.7 y 1.5, y las velogénicas presentan un IPIC mayor a 1.5.

Existen dos posibles razones por las cuales el IPIC obtenido en las 3 cepas estudiadas presentan una puntuación media de 0.00, la primera; que la cepa aislada corresponda a una cepa vacunal, debido a que estas son ampliamente utiliza-

utilizadas como cepas vacunales y durante el periodo de replicación en el ave pueda diseminarse dentro de la población; (Moreno, R. 1944). Segundo las cepas aisladas podrían corresponder a cepas lentogénica, entéricas o asintomáticas, debido a que no hay una manera para diferenciarlas.

Debido a que estas cepas fueron remitidas al laboratorio de aves con cuadros sintomatológicos severos y elevadas mortalidades, se puede deducir que pudieron existir otros factores responsables tanto bacterianos como virales que coadyuvaron a la severidad de la infección; e incluso componentes inmunosupresores. Dentro de las causas de inmunosupresión se puede mencionar la enfermedad de Gumboro, ya que la misma es considerada una enfermedad endémica subclínica en nuestro país (PROSA. 2015). La cual predispone al apareamiento de otras enfermedades infecciosas debido al efecto que el virus ocasiona en la bursa de Fabricio, disminuyendo la cantidad de linfocitos disponibles, y si esto se produce en las 2 primeras semanas de vida puede llegar a una reducción significativa de la respuesta inmune humoral (OIE. 2008). Otras causas inmunosupresoras pueden ser las temperaturas extremas a las que están sujetas las aves jóvenes debido a las particularidades del manejo en explotaciones avícolas y en traspatio.

También se puede considerar el consumo de micotoxinas, ya que en niveles relativamente bajos suprimen las funciones inmunológicas y por ende disminuye la resistencia a enfermedades infecciosas, la Aflatoxina B1 es ampliamente conocida por sus efectos negativos sobre la inmunidad humoral y en los niveles de proteína sérica. (Yunus, A., J. Böhm. 2013). Según Branson, W. et al., 2011. La inmunosupresión debido a una reducción de alfa y beta globulinas se ha relacionado a la exposición con aflatoxinas.

También se señala que la patogenicidad de la enfermedad de Newcastle

está determinada adicionalmente de la cepa del virus, por la dosis infectante, la vía de administración, la edad del pollo y por las condiciones ambientales. En general, entre más jóvenes sean los animales es más aguda la enfermedad, con virus virulentos en el campo, los pollos jóvenes pueden presentar muertes repentinas sin grandes signos clínicos, mientras que las aves más viejas padecen la enfermedad más prolongada y con signos clínicos característicos. La raza o constitución genética parece tener muy poco efecto en la susceptibilidad de los pollos a la enfermedad. Las vías naturales de infección (nasal, oral, ocular) parecen destacar la naturaleza respiratoria de la enfermedad mientras que las vías intramuscular, intravenosa e intracerebral parecen aumentar los signos neurológicos (Calnek, B. 2000)

Leiva, E. en un estudio previo en Guatemala 1965 reporta 3 cepas de la enfermedad de Newcastle (G-C, G-B, G-D, G-A) con resultados de IPIC mayores a los obtenidos en este estudio; y una única cepa lentogénica con IPIC de 0.62; adicionalmente reporta dos cepas mesogénicas con IPIC 1.0 y 0.85 y una velogénica de 1.8 respectivamente, comparando los resultados de ambos estudios se puede inferir que la situación de la enfermedad en la actualidad en Guatemala puede haber variado (ausencia de cepas mesogénicas y velogénicas) por la implementación por parte del MAGA de programas de vacunación a nivel nacional.

Adicionalmente Leiva amplía que la severidad de cada brote es variable y se relaciona con el patotipo involucrado, aunque en su estudio la cepa G-C fue clasificada como cepa lentogénica, similar a los casos investigados en este estudio, correspondió a un brote severo de campo debido a que las aves no habían sido vacunadas durante su vida.

Otro estudio que fue realizado en Maracay, Venezuela, reporta que una cepa estudiada posee un IPIC de 1.9, en el cual el 100% de las aves presentaron

secreción mucosa en la tráquea y hemorragia severa en la cloaca, el 75% presentó hemorragia en proventrículos y el 25% hemorragia y necrosis en el tracto intestinal. Las pruebas de patogenicidad concuerdan con las descritas para las cepas velogénicas viscerotrópicas responsable de la forma Doyle's de la enfermedad.(De Noguera, et al. 2002),

En relación con los estudios anteriores, podemos determinar el patotipo involucrado basado en el IPIC obtenido y la presencia o ausencia de signos clínicos. En el estudio realizado por De Noguera, et al. se encontró la presencia de signos clínicos en sistema respiratorio y digestivo, con un IPIC de 1.9, determinando que fue una cepa velogénica viscerotrópica que incrementaron su morbilidad y mortalidad.

VII. CONCLUSIONES

- El índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) para las 3 cepas aisladas en el 2014 en LARRSA fue de 0.00.
- La información generada acerca del índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) de las cepas de la enfermedad de Newcastle aisladas en LARRSA en el 2014, nos indica que pueden corresponder a cepas lentogénicas asintomáticas o entéricas, según la literatura reportada por la OIE.
- Los resultados obtenidos en el IPIC para las 3 cepas estudiadas, pueden ser debido a que los aislamientos del virus de la enfermedad de Newcastle, corresponden a cepas vacunales o cepas lentogénicas de campo, y que pudieron haberse exacerbado con la presencia de otros factores bacterianos, virales e incluso inmunosupresores.
- A partir del IPIC obtenido en este estudio, se puede determinar que ninguno de los virus de la Enfermedad de Newcastle aislados en LARRSA, corresponden a cepas de declaración obligatoria de acuerdo a los parámetros técnicos científicos de la OIE, por lo que no representan ninguna barrera sanitaria para el comercio avícola de nuestro país.

VIII. RECOMENDACIONES

- Utilizar la prueba de IPIC como una herramienta para determinar la severidad de los brotes.
- Utilizar el índice de patogenicidad intracerebral en las zonas del país donde ha habido un mayor número de brotes de la enfermedad de Newcastle, para poder determinar el tipo de patotipo con la cual se está tratando.
- Realizar estudios de factores inmunosupresores asociados a brotes de la enfermedad de Newcastle.
- Los resultados obtenidos en este estudio son de importancia para continuar con los planes de vacunación contra la enfermedad de Newcastle en la avicultura comercial.

IX. RESUMEN

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Referencia Regional Sanidad Animal LARRSA, este se encuentra ubicado en el campus central de la Universidad de San Carlos de Guatemala edificio M-10. El objetivo de este estudio fue determinar el índice de patogenicidad intracerebral de los aislamientos virales correspondientes a la ENC realizados durante el año 2014 en el laboratorio de bioseguridad III (LARRSA).

Esta investigación se realizó por medio de la técnica de inoculación intracerebral, utilizándose la metodología de la OIE para la realización. Se utilizaron diez pollos de un día de edad por cada cepa evaluada.

Los resultados obtenidos de las cepas estudiadas tras la realización del IPIC, fueron para la cepa A un IPIC de 0.00, para la cepa B un IPIC de 0.00 y para la cepa C un IPIC de 0.00. El índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) obtenido de las cepas de la enfermedad de Newcastle estudiadas fue de 0.00 en el 100% de los casos, por lo cual ninguna de las aves de un día de edad inoculadas presentó síntomas clínicos de la enfermedad.

Existen dos posibles razones por las cuales el IPIC obtenido en las 3 cepas estudiadas presentaron una puntuación media de 0.00. La primera; que la cepa aislada corresponda a una cepa vacunal, debido a que estas son ampliamente utilizadas como cepas vacunales y durante el periodo de replicación en el ave pudo diseminarse dentro de la población y segundo las cepas aisladas podrían corresponder a cepas entéricas o asintomáticas, debido a que no hay una manera para diferenciarlas.

Los resultados obtenidos en el IPIC de 0.00 para las 3 cepas estudiadas, pueden ser debido a que corresponden a cepas vacunales o cepas lentogénicas

de campo que se pueden haber exacerbado con la presencia de otros factores bacterianos, virales e incluso inmunosupresores.

SUMMARY

This study was realized in the Regional Reference Laboratory of Animal Health (LARRSA), this laboratory is located on the central campus of the University San Carlos de Guatemala building M-10. The objective of this study was to determine the intracerebral pathogenicity rate of the virus isolates corresponding to the Newcastle disease realized on the year 2014 in the laboratory biosafety III (LARRSA).

This investigation was realized by the technique of intracerebral inoculation, using the methodology described by the OIE. Ten chickens of one day of age for each strain evaluated were used.

The results obtained of the studied strains after the realization of the IPIC, were: for the strain "A" an IPIC of 0.0 and for the strain "C" an IPIC of 0.0. The rate of intracerebral pathogenicity (IPIC) obtained from the strains of the Newcastle disease studied was 0.0 in all 100% of the cases, because of that any of the birds of one day of age inoculated presented clinic symptoms of the disease.

There exist two possible reasons for the IPIC obtained in the three strains studied that presented an average punctuation of 0.00. The first reason is that the isolated strain corresponds to a vaccine strain, because this are widely used as vaccine strains and during the replication period in the bird it might be spread in the population; and the second one is that the isolated strains might correspond to enteric or asymptomatic strains because there is no way to differentiate them.

The results obtained in the IPIC of 0.00 for the three studied strains could be due to corresponding vaccine strains or lentogenic field strains that might been exacerbated by the presence of other bacterial, viral or even immunosuppressive factors.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barger, E., Card, L, y Pomeroy B. (1964). *Enfermedades y Parásitos de las Aves*. Mexico D.F; UTEHA.
2. Biester, H, y Schwart, L. (1964) *Enfermedades de las aves*. México: Unión tipográfica editorial Hispano-America.
3. Babaahmady, E., Joa, R., Edisleydis, J., Alfonso, P., Pereira, C. (2002) Enfermedad infección de la bolsa: efecto inmunosupresor en pollos de engorde. Recuperado de: http://www.iia.cu/pdf/v26_129.pdf
4. Calnek, B. (2000). Enfermedades de las aves. Manual moderno. Recuperado de: [file:///C:/Users/ESCRITORIO/Downloads/Patolog%C3%Ada%20Calnek-%20Efermedades%20de%20las%20Aves%20\(1\)%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/ESCRITORIO/Downloads/Patolog%C3%Ada%20Calnek-%20Efermedades%20de%20las%20Aves%20(1)%20(1).pdf)
5. Center for Food Security and Public Health (2011). Módulo 18: Influenza Aviar y *enfermedad exótica de Newcastle*: Recuperado de http://www.csph.iastate.edu/pdf-library/Acreditacion-Veterinaria/NVAP-Mod-18-AI-END_Jun 2011.pdf:
6. Cuello, S., Vega, A., Noda, J. (2011). Actualización sobre la enfermedad de Newcastle. *REDVET*. Vol. 12, No. 6, pp. 95 – 125. Veterinaria organización. Recuperado de: <http://www.veterinaria.Org/revistas/redvet/>.
7. De Noguera, C., León, A., Infante, D., de Rolo M., Sánchez, R., Herrera, A. (2002). Aislamiento, patogenicidad y estudio de algunas propiedades biológicas de una cepa del virus de la Enfermedad de Newcastle.

Revista científica. Vol. 8, No. 1, pp. 60 – 63. Recuperado de: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27605/2/articulo11.pdf>

8. De la Sota, M., Espinoza, C. (2004). *Manual de Procedimientos Enfermedad de Newcastle*. Recuperado de: http://www.Aviculturaargentina.com.ar/sanidad/manual_newcastle.pdf.
9. Dortmans, J. Koch, G. Rottier, P. Peeters, B. (2011). Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far?. *VETERINARY RESEARCH*. 42 (122), doi:10.1186/1297-9716-42-122
10. Escobar, L. (2011). *Anticuerpos circulantes contra Influenza Aviar y Newcastle en zanates (Quiscalus mexicanus) de la ciudad de Guatemala*. (Tesis Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala.
11. European Food Safety Authority (2007) Regarding a request from the European Commission to review Newcastle disease focussing on vaccination worldwide in order to determine its optimal use for disease control purposes .*Annex to the EFSA Journal*. 477, 1-24
12. Fritzche, K., Gerriets, E. (1962). *Enfermedades de las aves*. Alemania. Editorial Acribia.
13. Hernández, R. (2003). *Caracterización de un aislado de campo de virus enfermedad de Newcastle (VENC), obtenido en la zona central de Chile*. (Tesis Licenciatura). Universidad Austral de Chile.
14. Leiva Santos, E. (1965). *Tipificación de cuatro cepas del virus de la enfermedad de Newcastle en Guatemala* (Tesis Licenciatura) Universidad de San Carlos de Guatemala.

15. Moreno, R. (1994). *La enfermedad de Newcastle y algunos avances recientes de diagnóstico*: Recuperado de http://www.Fmvz.unam.mx/fmvz/ciencia_vet/revistas/CVvol6/CVv6c3.pdf
16. Mosqueda, A. (2012). Epidemiología, impacto económico y manejo inmunosanitario de la enfermedad de Newcastle. XV seminario internacional de avicultura AMEVEA-E.
17. OIE. (2014). Enfermedad de Newcastle. OIE. *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2013*. 7ª edición p. 630 – 649. Paris, Francia. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. Recuperado de: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.03.14_Enfermedad_Newcastle.pdf
18. OIE. (2014). *Enfermedad de Newcastle*. Recuperado de http://www.oie.int/fileadmin/home/esp/media_center/docs/pdf/disease_cards/newcas-es.pdf.
19. OIE. (2014). Infección por virus de la Enfermedad de Newcastle. OIE. *Código Sanitario para los Animales Terrestres 2014*. Recuperado de: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2010/chapitre_
[nd.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2010/chapitre_)
20. PROSA. (2014). *Situación actual en Guatemala con respecto a Newcastle*. PROSA. Guatemala.
21. PROSA. (2015). *Situación actual en Guatemala con respecto a la enfermedad de Gumboro*. PROSA. Guatemala.
22. Ritchie, B., Harrison, G., Harrison, L. (2011) *Avian Medicine: Principles and Application*. Recuperado de: <http://www.ivis.org/advances/harrison2/chap>

23. Rojas, E. (2008). *Encefalitis de las aves*. Mexico: Editorial trilla.
24. Rovid, A., Roth, J., Galyon, J., Lofstedt, J., Lenardon, M. (2011). Enfermedades Emergentes y Exóticas de los Animales. Recuperado de: https://books.google.com.gt/books?id=s1R6wsyeT4IC&dq=bioseguridad+Newcastle&hl=es&source=gbs_navlinks_s.
25. Woernle, H. (1994) *Enfermedades de las aves*. Zaragoza (España): Editorial Acribia S.A.
26. Yuan, X., Wang, Y., Yang, J. (2012). Genetic and biological characterizations of a Newcastle disease virus from swine in china. *Virology Journal*, 9 (129),doi:10.1186/1743-422X-9-129
27. Yunus, A., Böhm J. (2013). Temporary modulation of responses to common vaccines and serum cation status in broilers during exposure to low doses of aflatoxin B1. Recuperado de: <http://ps.oxfordjournals.org/content/92/11/2899.full.pdf+html?sid=87a50987-eaeb-4804-94c6-4c4fb742ffe>

XI. ANEXOS

ANEXO No. 1 Tabla de evaluación de IPIC

EVALUACIÓN CLÍNICA DE LOS ANIMALES	DIAS DE OBSEVACIÓN								TOTAL	PUNTUACIÓN
	1	2	3	4	5	6	7	8		
SANOS										
ENFERMOS										
MUERTOS										
TOTAL										
									Índice de patogenicidad	
									Tipo de cepa	

Fuente: Elaboración propia

ANEXO NO. 2 Resultados del IPIC

RESULTADOS DEL IPIC	
CEPA	IPIC
Cepa A	0.00
Cepa B	0.00
Cepa C	0.00

Fuente: Elaboración propia

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PATOGENICIDAD
INTRACEREBRAL DE CEPAS DE LA ENFERMEDAD DE
NEWCASTLE AISLADAS EN EL LABORATORIO DE REFERENCIA
REGIONAL DE SANIDAD ANIMAL (LARRSA) FMVZ/USAC**

Lester Enmanuel Pocón Cabrera

f. _____
MSc. Lucero Serrano de Gaitán
ASESOR PRINCIPAL

f. _____
M.V. Julio Cordón y Cordón
ASESOR

f. _____
MSc. Mauro Francisco Escobar Serrano
EVALUADOR

IMPRÍMASE

f. _____
MSc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
DECANO