

COMPARACION DE CUATRO TECNICAS DE DIAGNOSTICO PARA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE*

Omar Hincapié N.
Elvia Vélez de Upegui*

1. INTRODUCCION

En Colombia la industria avícola continúa creciendo en forma acelerada. Cada año el número de aves existentes en el país aumenta considerablemente. El consumo de carne de pollo es mayor cada día, debido al alto precio de la carne de bovino.

Con el crecimiento de la población avícola también se incrementan las dificultades para mantener un plantel libre de enfermedades. La investigación cada vez trata de buscar nuevos métodos para dar un diagnóstico rápido de las enfermedades y aplicar las medidas sanitarias necesarias para controlar el problema.

La enfermedad de NewCastle es una de las entidades patológicas que más pérdidas produce a la avicultura y el grado de protección suministrado por las vacunas existentes en el mercado es reducido.

El avicultor se ve abocado a seguir un calendario estricto de vacunación, ya que de lo contrario corre el riesgo que un brote de NewCastle le produzca grandes pérdidas no sólo por muerte de sus animales sino por descenso de la producción en huevos.

Cuando en un plantel avícola se presenta un brote de NewCastle es necesario obtener un diagnóstico rápido y seguro con el fin de evitar fuertes pérdidas debidas a la enfermedad. Las lesiones que se encuentran a la necropsia pueden ser una base para el diagnóstico, pero algunas veces éstas no aparecen lo que hace necesario recurrir a técnicas de laboratorio para su confirmación.

El sistema más usado en el laboratorio ha sido el aislamiento del virus por inoculación en huevos embrionados. Algunos laboratorios usan la prueba de la hemoaglutinación con suspensión de tejido pulmonar, inhibición de la hemoaglutinación en coágulo sanguíneo para el diagnóstico.

El objetivo de este trabajo fue hacer un estudio comparativo de los resultados obtenidos con materiales de animales sospechosos de NewCastle, usando el sistema de aislamiento en huevos embrionados, la técnica de hemoaglutinación con suspensión de órganos, la inhibición de la hemoaglutinación con el mismo material, y la determinación de anticuerpos en el coágulo sanguíneo.

* Contribución del Programa Nacional de Microbiología (División de Ciencias Veterinarias) y del Servicio Nacional de Diagnóstico (División de Sanidad Animal).

** Respectivamente: Médico Veterinario, Jefe del Centro de Diagnóstico de Medellín, Apartado Aéreo 51764, Medellín; y Bacterióloga del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Antioquia, Medellín.

2. REVISION DE LITERATURA

La enfermedad de NewCastle entró a Colombia en 1951 y desde esa época son muchos los brotes que se han presentado y con diferentes formas clínicas de la misma. La patogenicidad de las cepas aisladas varía mucho; así, Hincapié y Yates (1968) encontraron que cepas aisladas en la Sabana de Bogotá eran más patógenas que varias cepas norteamericanas con las que fueron comparadas.

Las técnicas utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad de NewCastle pueden ser: la Hemoaglutinación, la Inhibición de la Hemoaglutinación, la Seroneutralización (Burnett, 1941 y Huerta, 1960).

También se utiliza la técnica de aislamiento por inoculación en huevos embrionados de 9 a 11 días de edad, inoculación que se hace en la cavidad alantoidea del mismo (Lancaster, 1963) y después de muerto éste o pasados cinco días de la inoculación se hacen pruebas de hemoaglutinación para detectar el virus. Las pruebas de hemoaglutinación se basan en el trabajo de Hirst (1941), quien demostró la capacidad que tiene el virus de la Influenza para aglutinar los glóbulos rojos.

Burnett (1941) demostró más tarde la afinidad del virus de NewCastle con el grupo de virus de Influenza, al detectar la capacidad de aglutinación de glóbulos rojos por este virus.

Asdell y Hanson (1960) han demostrado que cuando el virus de NewCastle es inoculado en aves susceptibles, se extiende rápidamente desde el sitio de la inoculación, pudiéndose detectar en casi todos los tejidos 48 horas después y en todos ellos a las 72.

Hofstad (1951) demostró que los títulos más altos de virus se encontraban en el pulmón y en la tráquea, y Miller y Miller (1950) encontraron que además del pulmón también había títulos altos en el bazo.

Varios investigadores han realizado las pruebas de hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación con material fresco, con el fin de acelerar el diagnóstico y dicen que animales que muestren signos clínicos pueden tener virus suficiente en tejidos seleccionados, para dar una hemoaglutinación, lo que facilitaría el diagnóstico. El pulmón y el bazo eran tomados para preparar macerados y previo celentamiento de la suspensión han montado las pruebas antes dichas con buenos resultados (McClurkin *et al.*, 1954 y Sinha *et al.*, 1954).

Ramisse y Rakotondromary (1967) comparando los resultados obtenidos por hemoaglutinación con macerados de tejidos y la detección de anticuerpos en el coágulo sanguíneo, encontraron que las pruebas de hemoaglutinación en suspensión de tejidos no suministraron datos útiles para el diagnóstico, y los títulos de anticuerpos encontrados en el coágulo empezaban a detectarse 5 a 6 días después de la infección, y además los anticuerpos producidos por vacuna no podían ser diferenciados de los anticuerpos producidos por infección.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MUESTRAS UTILIZADAS

Los materiales usados para el trabajo fueron muestras de pulmón, tráquea, cerebro, bazo y coágulo sanguíneo del corazón, que fueron guardados en congelación al momento del uso. Se maceró aproximadamente un gramo de tejido en mortero estéril, con dos centímetros cúbicos de solución salina fisiológica. Esta mezcla se centrifugó a 1.500 revoluciones por minuto durante cinco minutos.

Con el sobrenadante se hicieron las pruebas de hemoaglutinación (HA) e Inhibición de la hemoaglutinación (IH). Para esta última se utilizó la cepa de virus 1972, aislada de un brote de NewCastle en una zona del Valle de Aburrá por este laboratorio. Las técnicas usadas para la Hemoaglutinación e Inhibición de la Hemoaglutinación son las descritas en "Methods for the Examination of Poultry Biologics" (1963). La prueba fue montada en bandejas para HA. El material restante era calentado por una hora a 56°C y centrifugado inmediatamente a 1.500 revoluciones por minuto durante cinco minutos. El sobrenadante era utilizado para nuevas pruebas de hemoaglutinación e inhibición de la aglutinación. Si las pruebas no eran hechas inmediatamente entonces el material era congelado hasta el momento de usarlo.

El coágulo sanguíneo obtenido del corazón, si no se usaba inmediatamente, era guardado en congelación hasta el momento de procesarlo. Este material se procesó en la siguiente forma: aproximadamente de uno a dos gramos de coágulo fueron macerados y montados en mortero estéril con dos a tres centímetros cúbicos de agua destilada estéril, luego se centrifugó a 1.500 revoluciones por minuto durante cinco minutos, el sobrenadante se recogió y luego fue utilizado para la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, con la misma cepa de virus que se dijo antes.

3.2. AISLAMIENTO DE VIRUS

Para el aislamiento de virus se tomaron porciones de pulmón, tráquea, bazo y cerebro y se maceraron en mortero estéril usando cinco centímetros cúbicos de caldo nutritivo. Este material se centrifugó a 1.500 revoluciones por minuto durante cinco minutos. Se tomó un centímetro cúbico de sobrenadante y se le agregó 20.000 unidades de Penicilina y 20 miligramos de Estreptomicina, se dejó media hora en nevera para que actuaran los antibióticos sobre las bacterias contaminantes. Los huevos utilizados en este trabajo fueron provenientes de un plantel comercial. Estos fueron incubados y utilizados cuando los embriones tenían entre 10 y 11 días de edad. Cada huevo embrionado era observado al ovoscopio previamente para detectar su viabilidad. Luego eran inoculados cinco embriones por muestra depositando 0.2 centímetros cúbicos en la cavidad alantoidea de cada embrión e incubados a 37°C.

Los embriones se observaron al ovoscopio a mañana y tarde y se descartaron aquellos que murieron en las primeras 24 horas. Después de este tiempo las muertas se consideraban como producidas por el virus. Cada embrión que moría se abrió asépticamente; se recolectaba el líquido alantoideo en tubos estériles y se hacía una prueba rápida de hemoaglutinación usando glóbulos rojos de ave. En caso de ser negativo a esta prueba, se hacía un pase con el material de todos los embriones y se incubaba nuevamente en huevos embrionados. Un material se daba como negativo después de cinco pasajes ciegos, en los que no se detectaba aglutinación de glóbulos rojos de ave con el líquido alantoideo.

4. RESULTADOS

Se probaron un total de 196 muestras de las cuales 88 no dieron ningún resultado tanto para la hemoaglutinación como para inhibición de la hemoaglutinación y el aislamiento, considerándose como negativas. Las muestras restantes se dividieron en dos grupos. El primero integrado por 56 especímenes en los que se aisló virus por inoculación en embriones de pollo y el otro grupo que está compuesto por 52 muestras que fueron negativas al aislamiento.

Se encontraron 35 muestras que no dieron hemoaglutinación tanto en la prueba normal como después de calentadas a 50°C pero de las que sí se aisló virus. Hubo otras 16 muestras que dieron inhibición de la hemoaglutinación con títulos que varían de 1:50 a 1:1600 habiéndose también aislado virus de ellas. Resultaron tres muestras en las que hubo hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación con aislamiento del virus.

Los títulos hemoaglutinantes varían desde 1:50 hasta más de 1:1600. En todos aquellos que fueron positivos a esta prueba a excepción de tres, los títulos fueron muy similares, pero en general fueron más altos después de calentados. Tanto en el material sin calentar como en el calentado. Estas tres muestras fueron negativas con el material normal pero fueron positivas después de calentadas a 50°C. En una muestra (1599-73) sucedió el fenómeno contrario, es decir, el material sin calentar, dió un título de 1:200 y el título desapareció después del calentamiento.

Los resultados obtenidos por la inhibición de la hemoaglutinación son muy similares a las de la hemoaglutinación. En la Tabla 1 se puede ver que hubo valores desde 1:50 hasta 1:600. Los valores mayores de 1:1600 se obtuvieron en los materiales sin calentar y a pesar de presentar títulos tan altos, de estas muestras se aisló virus. Estos mismos materiales fueron calentados a 50°C pero ya en la prueba de HI los resultados no fueron los mismos, ya que en la mayoría de ellos descendieron o desaparecieron completamente.

TABLA 1. Resultados de la hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación de los materiales positivos a aislamiento de virus de Newcastle.

Muestra No.	Hemoag.	Hemoag. Calent.	Inhibic. Hemoag.	Inhibic. Hem. Cal.	Coágulo Sanguín.	Aislamientos Positivos
691	0	0	0	0	0	+
760	0	0	0	0	0	+
781	1600	1600	0	0	0	+
857	0	0	0	0	0	+
863	0	0	0	0	0	+
1402	0	0	400	400	0	+
1418	0	0	0	0	0	+
1460	0	0	0	0	0	+
1568	200	200	0	0	0	+
1602	50	50	0	0	0	+
1606	0	0	800	800	0	+
1638	0	0	0	0	0	+
1706	400	400	0	0	0	+
1746	0	0	0	0	0	+
1751	0	0	100	100	0	+
1801	400	400	0	0	0	+
1809	400	400	0	0	0	+
1812	0	0	1600	200	0	+
1818	0	0	1600	100	0	+
1899	0	0	0	0	0	+
2004	0	0	0	0	0	+
2018	200	200	0	0	0	+
2020	0	0	400	0	0	+
2025	0	0	0	0	0	+
2212	0	0	0	0	0	+
2245	0	0	0	0	0	+
2264	0	0	800	400	200	+
2274	0	0	0	0	0	+
28-73	0	0	0	0	0	+
175-73	200	200	0	0	0	+
177-73	0	0	400	400	0	+
197-73	0	0	0	0	100	+
203-73	0	0	400	400	1600	+
372-73	0	0	200	50	0	+
393-73	0	0	200	0	0	+
485-73	0	0	0	0	0	+
545-73	0	0	200	0	0	+
604-73	0	0	400	100	0	+
643-73	400	400	0	0	0	+
727-73	0	0	100	50	0	+
784-73	200	400	0	0	0	+
831-73	400	800	0	0	0	+
893-73	800	1600	0	0	0	+
1082-73	200	400	0	0	0	+
1107-73	400	1600	0	0	0	+
1138-73	0	1600	0	0	0	+
1157-73	400	0	0	0	0	+
1159-73	400	800	0	0	0	+
1161-73	0	400	50	0	0	+
1244-73	400	200	0	0	0	+
1599-73	200	0	0	0	0	+
1765-73	0	1600	50	0	0	+
1780-73	1600	400	1600	0	0	+
1864-73	0	200	0	0	0	+

Los resultados obtenidos con las mismas pruebas pero con los materiales de los cuales no se aisló virus, son diferentes a los que fueron positivos al aislamiento. En la Tabla 2 se observa que los datos obtenidos para inhibición de la hemoaglutinación con el material normal son muy similares a los producidos por los materiales calentados. Se puede ver que si no hubo aumento del título después de calentado, éste permaneció igual al obtenido antes de ser sometido a la temperatura de 50°C y sólo en muy pocas bajó o desapareció el título después de calentado. Los resultados obtenidos para la inhibición de la hemoaglutinación usando el coágulo sanguíneo son muy inciertos ya que fueron muy pocas las muestras que dieron títulos, los cuales fueron en general bajos. Los demás materiales dieron resultados negativos a esta prueba, como puede observarse en las Tablas 1 y 2.

TABLA 2. Resultados de Hemoaglutinación e inhibición de hemoaglutinación de los materiales negativos a aislamiento de virus de NewCastle.

Muestra No.	Hemoag.	Hemoag. Calent.	Inhibic. Hemoag.	Inhibic. Hem. Cal.	Coágulo Inh. Hemo.	Aislamientos Negativos
597	0	0	200	400	0	—
723	200	200	0	0	0	—
800	0	0	1600	1600	0	—
844	100	100	0	0	0	—
847	200	200	0	0	0	—
1270	0	0	100	100	0	—
1430	200	200	0	0	0	—
1495	0	0	200	200	0	—
1500	0	0	200	200	0	—
1501	0	0	100	100	0	—
1509	0	0	1600	1600	0	—
1564	400	400	0	0	0	—
1588	0	0	400	400	0	—
1600	0	0	800	800	0	—
1668	0	0	800	800	0	—
1672	0	0	1600	1600	0	—
1677	0	0	1600	1600	0	—
2075	0	0	800	800	0	—
1945	100	100	0	0	0	—
1950	0	0	1600	1600	0	—
2040	0	0	800	800	0	—
2077	0	0	100	100	0	—
2080	0	0	800	800	0	—
2092	0	0	1600	800	0	—
2142	100	50	0	0	50	—
2149	0	0	1600	1600	80	—
2074	0	0	800	800	0	—
2163	50	0	0	0	0	—
2184	0	0	1600	0	0	—
415-73	0	0	200	0	200	—
464-73	0	0	400	100	0	—
483-73	0	0	800	200	0	—
490-73	0	0	200	0	0	—
519-73	0	0	100	100	0	—
545-73	0	0	200	0	0	—
604-73	0	0	400	100	0	—
606-73	0	0	200	0	0	—
653-73	0	0	100	100	0	—
669-73	0	0	400	800	0	—
675-73	0	0	800	800	0	—
689-73	0	200	0	0	0	—
719-73	50	100	0	0	0	—
737-73	0	0	100	100	0	—
980-73	0	0	100	0	0	—
986-73	200	0	0	0	0	—
1143-73	0	100	0	0	0	—
1150-73	0	0	400	200	0	—
1310-73	400	200	0	0	0	—
1347-73	0	50	0	0	0	—
1520-73	800	200	0	0	0	—
1700-73	0	0	800	0	0	—
1815-73	0	100	0	0	0	—

5. DISCUSION

Los resultados indican que la inoculación en embriones de pollo es el método más seguro para diagnosticar la enfermedad de NewCastle, ya que la ausencia de Hemoaglutinación no elimina la posibilidad de aislar el virus, como puede verse en las Tablas 1 y 2. Es posible ver que los títulos hemoaglutinantes de aquellos materiales fueron bajos antes de someter la muestra a 50°C por una hora a excepción de una de ellas cuyo título fue de 1:1600.

Cuando el material se calienta, es posible obtener una liberación de virus que va a aumentar el título hemoaglutinante y así se observó que varias muestras aumentaron los títulos hasta cuatro veces el obtenido con material sin calentar, en cambio, en otras muestras se observó el fenómeno contrario, o sea, hubo descenso de los valores, pero en general, fueron muy pocas las que presentaron esta característica.

Casi el 50% de las muestras de las cuales se obtuvo aislamiento de virus, dieron resultados positivos a la hemoaglutinación ya sea con el material sin calentar o después de calentado; en cambio, de los 56 materiales que fueron negativos al aislamiento de virus, 14 o sea un 26% dieron hemoaglutinación, valores que fueron bajos a excepción de una que dió 1:800, pero que bajó hasta 1:200 cuando se calentó a 50°C.

Las hemoaglutinaciones con los macerados de tejidos pueden ser de tipo inespecífico ya que como se demuestra en este trabajo, varias muestras dieron hemoaglutinación, pero no se recuperó virus de ellas, interrogante que se resolvería haciendo la inhibición de la hemoaglutinación con antisuero específico para NewCastle. Es de notar que suspensiones de tejidos que dan valores hemoaglutinantes mayores de 1:1600 se pueden considerar como positivos para la enfermedad, aquellos cuyos valores sean de 800 se pueden considerar como sospechosos y valores inferiores a este es necesario enfrentar el material a suero específico o inocular embriones de pollo.

Es bien conocido que para que suceda la hemoaglutinación se requieren al menos 10^4 partículas virales por centímetro cúbico. En los materiales cuyas pruebas para la hemoaglutinación fueron negativas pero fueron positivos al aislamiento del virus, es posible que la cantidad de partículas virales fuera inferior a las necesarias para reaccionar con los glóbulos rojos y producir la aglutinación de éstos, pero sin encontrarse en cantidad suficiente y multiplicarse en el huevo embrionado para luego ser detectado por la misma prueba. También es posible que las cepas virales presentes en los materiales calentados correspondan a virus cuya estabilidad de la hemoaglutinina es muy baja y ocurra la destrucción de ella cuando se somete a esta temperatura y por lo tanto descienda el título o desaparezca completamente.

En las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación en las 56 muestras que fueron positivas al aislamiento se encontraron 16 que dieron títulos inhibo-hemoaglutinantes tanto sin calentar como calentados, pero en general fueron títulos bajos o en el caso de los otros materiales no dieron título, lo que contribuye a aumentar las posibilidades de aislamiento. Los títulos inhibo-hemoaglutinantes observados pueden corresponder a anticuerpos que se formaron como consecuencia de la infección viral ya que está demostrado que éstos se encuentran cinco días después de penetrado el virus al organismo, pero que en estos casos fueron incapaces de controlar la multiplicación viral en el huesped.

Puede suceder como se observa en la Tabla 1 que en el mismo caso se encuentre hemoaglutinación positiva, lo que da una posibilidad de aislar virus, se encuentran anticuerpos inhibo-hemoaglutinantes y se comprueba la enfermedad por el aislamiento del virus. Estos datos confirman la imposibilidad de decir si un animal con síntomas clínicos de la enfermedad de NewCastle está protegido o no mediante el estudio de anticuerpos inhibo-hemoaglutinantes. Los datos obtenidos en esta forma sólo tienen valor cuando se trata de animales clínicamente sanos.

Los materiales que fueron negativos al aislamiento de virus (Tabla 2) se encuentra que sólo 16 muestras fueron negativas a la prueba de anticuerpos. Los que dieron títulos van desde 1:200 en adelante y permanecieron cuando se calentó éste. Sólo en cuatro de ellos bajó o desapareció el título inhibo hemoaglutinante. Podría pensarse teniendo en cuenta el alto porcentaje de muestras cuyos títulos inhibo hemoaglutinantes permanecieron después de calentado al material, que hay

una gran posibilidad de que un espécimen sea negativo para NewCastle si el título inhiho-hemoaglutinante persiste después de someterse a temperaturas de 50°C por una hora, pero debe además comprobarse por inoculación en huevos embrionados y por lesiones a la necropsia; pero en general el dato de la inhibición de la hemoaglutinación da una idea de la posible presencia de NewCastle.

En cuanto a la determinación de anticuerpos en el coágulo sanguíneo es de muy poco valor, siendo estos resultados diferentes a los encontrados por Ramisse y Rakotondromary (1967) quienes dicen que hallaron valores satisfactorios. Los datos obtenidos en este experimento no están de acuerdo a los antes citados debido a que es difícil detectar anticuerpos en los glóbulos rojos ya que ellos se encuentran en mayor abundancia en el suero y muy poco o nada en las células rojas.

6. RESUMEN

En un total de 196 muestras de aves sospechosas de padecer la enfermedad de NewCastle se hizo un estudio comparativo de la hemoaglutinación de suspensión de órganos normal y calentados a 50°C por una hora, la inhibición de la hemoaglutinación con los mismos extractos, el coágulo sanguíneo y la inoculación en huevos embrionados.

Varios materiales dieron hemoaglutinación sin calentar y el título aumentó al ser sometidos a 50°C por una hora y hubo aislamiento de virus, además de encontrarse anticuerpos inhibidores de la aglutinación. En otros especímenes no se detectó ni virus ni anticuerpos pero se aisló virus por inoculación.

Otras muestras dieron títulos hemoaglutinantes bajos pero no se aisló virus, lo que sugiere una hemoaglutinación inespecífica o virus muerto. El mismo grupo de materiales que fue positivo al aislamiento no dió títulos inhiho-hemoaglutinantes o fueron muy bajos, los que se consideran como respuesta a la infección viral. Los títulos inhiho-hemoaglutinantes en el grupo que fue negativo al aislamiento fueron en gran mayoría altos, lo que indica que en la suspensión de tejidos se pueden detectar anticuerpos contra la enfermedad de NewCastle, pudiendo ser un indicio de la enfermedad o si éste permanece estable después de calentado a 50°C. La detección de anticuerpos en el coágulo no tiene mucho valor, debido a que éstos son muy bajos o que en las células rojas no se encuentran.

7. SUMMARY

Comparison of four diagnostic techniques for Newcastle disease virus

One hundred ninety six samples from fowls were tested to compare four techniques to investigate NewCastle.

Techniques were the hemagglutination test with suspension of tissues unheated and heated to 50°C for one hour, hemagglutination inhibition test with the same suspension heated and unheated, the hemagglutination test with the clot and inoculation in chick embryos.

Fifty six samples were positive by virus isolation in chick embryo. Several gave high titers by hemagglutination with unheated material, some others increased the titer after heated to 50°C for one hour. The hemagglutination inhibition test were negative for almost all of them, some materials gave positive results to this test which may be due to antibodies produced after infection.

Fifty two samples were negative for virus isolation but were positive for hemagglutination or hemagglutination inhibition test. Those which were positive for HA may be due to nonspecific agglutination or the virus was dead, but the most of them were positive for Hemagglutination inhibition test with high titers, this means that antibody may be detected in tissue suspensions.

The blood clot is unsatisfactory to detect antibodies, because most of them are in the sera, so it is difficult by this technique to detect antibodies in the red blood cells or may be that they do not have this substances.

8. BIBLIOGRAFIA

1. ASDELL, M.K. and R.P. HANSON. 1960. Sequential changes in the titer of NewCastle disease virus in tissues. A measure of the defense mechanism of the chicken. *Am. J. Vet. Res.* **21**:128-132.
 2. BURNETT, F.M. 1941. Affinity of NewCastle virus to influenza group. *Aust. J. Exptl. Biol. and Med. Sci.* **20**:81-88.
 3. HINCAPIE, N.O. y V.J. YATES. 1968. La enfermedad de NewCastle. I Características de algunas cepas aisladas en la Sabana de Bogotá. *Rev. ICA* **3**:29-36.
 4. HOFSTAD, M.S. 1951. A quantitative study of NewCastle disease virus in tissues infected chickens. *Am. J. Vet. Res.* **12**: 334-339.
 5. HIRST, G.K. 1941. The agglutination of red cells by allantoic fluids of chicken embryos infected with influenza virus. *Sci.* **94**:22-23.
 6. HUERTA, H.M. 1960. Técnicas serológicas empleadas en el diagnóstico de la enfermedad de NewCastle. I Simposium de la enfermedad de NewCastle. México Folleto Misceláneo No. 11. pp. 47-55.
 7. LANCASTER, J.E. 1963. Diagnosis of NewCastle disease. *Vet. Bull.* **33**:347-360.
 8. McCLURKIN, A.W.; S.K. SINHA and R.P. HANSON. 1954. Rapid diagnosis of NewCastle disease using lung extract. *Am. J. Vet. Res.* **15**:314-315.
 9. METHODS FOR THE EXAMINATION OF POULTRY BIOLOGICS. 1963. *Natl. Acad. of Sci. Publ.* 1038.
 10. MILLER, B.R. and R.E. MILLER. 1950. Distribution of NewCastle disease virus in, and elimination from, intratracheally and intramuscularly inoculated birds. *J. Am. Vet. Ass.* **117**:229-233.
 11. RAMISE, J. et E. RAKOTONDROMARY. 1967. Possibilité de Diagnostic Serologique de la maladie de NewCastle sur le cadavre. *Rev. D'Élev. Méd. Vet. des pays Trop.* **20**: 205-213.
 12. SINHA, S.K.R. HANSON and C.A. BRANDLY. 1954. Aerosol transmission of NewCastle disease in chickens. *Am. J. Vet. Res.* **15**:887-892.
-