



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**COMPARACIÓN DE LA TITULACIÓN DE VACUNAS  
CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE (ENC) Y  
BRONQUITIS INFECCIOSA (BI) UTILIZANDO  
EMBRIÓN CONVENCIONAL Y EMBRIÓN ALPES®**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**GENOVEVA MOLINA FLORES**

Asesores:

Dra. Norma Leticia Calderón Apodaca  
MVZ. MC. Rubén Merino Guzmán

México, D. F. 2009.





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Comparación de la titulación de vacunas contra la Enfermedad de  
Newcastle (ENC) y Bronquitis Infecciosa (BI) utilizando embrión  
convencional y embrión ALPES®**

## **DEDICATORIA**

A mi madre María Eusebia Flores Reyes† por darme la vida y llenarme de felicidad fueron seis años de mi vida inolvidables, a mi Padre Sergio Molina Albarran por enseñarme a salir adelante y nunca rendirme, quien me apoya hoy y siempre.

A mi hermana Marisol por tu cariño, confianza, por creer en mi cuando nadie lo hizo y apoyarme incondicionalmente en toda mi carrera.

A mi hermano Víctor por ser un ejemplo a seguir por su tenacidad y entereza.

A Samuel que llenas mi vida de felicidad y amor, me das palabras de aliento cuando mas las necesito, gracias por estar a mi lado.

A Alene llegaste a la familia a llenarla de sonrisas.

A mis mascotas que día a día alegran mi vida con sus travesuras.

A Muffi† te recordare por siempre.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por mi formación profesional.

A mis asesores Dr. Rubén y Dra. Norma, por ofrecerme su confianza, conocimientos y apoyo para la elaboración de este trabajo.

A los miembros del jurado: Dra. Laura Patricia Noé, Dr. Alfredo Sahagún, Dr. Gary García y MVZ M. C. Marco Antonio Juárez, por sus comentarios y sugerencias.

A los miembros del Departamento de Producción Animal: Aves. MVZ M. C. Félix Sánchez Godoy por permitirme trabajar a su lado y participar en mi formación como profesionista. Al Dr. Néstor Ledesma por sus palabras de aliento. A José Gonzáles por su experiencia y ayuda en los experimentos.

A todos mis profesores de la licenciatura por brindarme su conocimiento y experiencia y tener la oportunidad de que dos de ellos ahora sean parte de mi jurado: Dra. Laura Patricia Noe y Dr. Gary García.

## CONTENIDO

	PÁGINAS
TÍTULO.....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
CONTENIDO.....	IV
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	9
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVOS.....	9
MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
RESULTADOS.....	14
DISCUSIÓN.....	15
CONCLUSIONES.....	20
REFERENCIAS.....	21
CUADROS.....	28
FIGURAS.....	31

## RESUMEN

**MOLINA FLORES GENOVEVA. Comparación de la titulación de vacunas contra la Enfermedad de Newcastle (ENC) y Bronquitis Infecciosa (BI) utilizando embrión convencional y embrión ALPES®. (Bajo la dirección de: Dra. Norma Calderón Apodaca y Dr. Rubén Merino Guzmán)**

La inmunización de animales con vacunas de calidad es la principal forma de prevenir o de controlar una gran proporción de enfermedades que afectan a los animales domésticos, con énfasis en las de origen viral. La administración confiable de vacunas inocuas, potentes y eficaces es imprescindible para el funcionamiento satisfactorio de los programas de salud animal. Por otro lado, en el pollo recién nacido una gran proporción de los anticuerpos transmitidos por la madre se encuentran en el saco vitelino, mientras que la titulación de los virus vacunales de la enfermedad de Newcastle y de la bronquitis infecciosa se efectúa por inoculación en la cavidad alantoidea en el embrión, en teoría existe poca probabilidad de contacto entre el virus vacunal y los anticuerpos del saco vitelino. Sin embargo, es conveniente comprobar que la titulación de estas vacunas no es afectada por los anticuerpos presentes en el saco vitelino. México sólo cuenta con una empresa dedicada a la producción de embriones libres de patógenos específicos (ALPES®), por lo cual el abastecimiento a los laboratorios que utilizan estos embriones puede llegar a no ser suficiente. Como previsión algunos laboratorios utilizan embriones convencionales para su trabajo rutinario. El objetivo del presente estudio fue comparar la titulación de virus de ENC y BI mediante la inoculación en embrión de pollo probablemente con anticuerpos (convencional) y embrión libre de patógenos específicos (ALPES®) de 9-11 días de edad. Los resultados mostraron que no hay diferencia significativa al hacer la titulación en el embrión de pollo convencional y el embrión ALPES®.

## INTRODUCCIÓN

La administración confiable de vacunas inocuas, potentes y eficaces es imprescindible para el mantenimiento de la salud animal y el funcionamiento satisfactorio de los programas de salud animal.<sup>1</sup> La inmunización de animales con vacunas de calidad es el principal medio de control de muchas enfermedades animales. En otros casos, las vacunas se emplean conjuntamente con el control nacional de enfermedades o los programas de erradicación.<sup>1</sup> El planteamiento para garantizar la calidad, inocuidad, potencia y eficacia de las vacunas veterinarias puede variar de un país a otro de acuerdo a las necesidades locales. Sin embargo, es imprescindible contar con estándares y controles de producción adecuados para asegurar la disponibilidad de productos con una uniformidad garantizada de calidad para el uso en programas de control y prevención en el área de la salud animal.<sup>1,2</sup>

Como la patogénesis y la epidemiología de cada enfermedad varía, el papel y el éxito de la vacunación como medio de control varía también de una enfermedad a otra. Algunas vacunas pueden ser eficaces, induciendo una inmunidad que no sólo previene los signos de la enfermedad, sino que también contribuye a reducir la replicación y diseminación del agente causal de la enfermedad. Otras vacunas pueden prevenir la enfermedad clínica, pero no la infección o el estado de portador sano. De esta forma, la decisión de recomendar la vacunación como parte de la estrategia de control de las enfermedades animales, requiere el conocimiento de las características del agente infeccioso y de su epidemiología, así como de las características y posibilidades de las diferentes vacunas disponibles.<sup>3</sup>

## **Tipos de vacunas**

Las vacunas se pueden preparar como productos activos o inactivados. Algunas vacunas a virus activo se preparan a partir de aislamientos de campo de baja virulencia o que son artificialmente modificados de un agente causante de una enfermedad. Cuando se administran por vía no natural o bajo otras condiciones, los virus pueden inmunizar en vez de causar la enfermedad.<sup>3, 4</sup> Otras vacunas activas se preparan a partir de aislamientos de agentes causantes de enfermedades que han sido seleccionados mediante su inoculación en animales de laboratorio, medios de cultivo, cultivos celulares o embriones aviares, ya que son sustancialmente diferentes al huésped natural con la finalidad de obtener una variante de virulencia reducida. El desarrollo en las técnicas de ADN recombinante han proporcionado oportunidades únicas para la producción de vacunas. En la actualidad, las vacunas activas pueden ser modificadas de forma específica mediante la eliminación de los genes relacionados con la virulencia de un virus. Otras vacunas se producen por la introducción de genes a partir de un virus causante de una enfermedad que codifican antígenos inmunizantes específicos, en un virus vector no virulento.<sup>4, 5</sup>

Los productos inactivados pueden contener: 1) Cultivos de virus que han sido inactivados por medios químicos o físicos 2) Subunidades que se han extraído de cultivos o que se han producido mediante procedimientos de ADN recombinante (ADNr).<sup>5</sup>

Tanto las vacunas a virus activo como las inactivadas se pueden fabricar con adyuvantes diseñados para aumentar su eficacia. Los adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (simples o dobles), hechos con aceite mineral o vegetal y un agente emulsionante.<sup>6</sup> Se utilizan también otros adyuvantes como el gel de hidróxido de aluminio o la saponina. Adicionalmente se están elaborando vacunas que incluyen ingredientes que producen efectos inmunomoduladores en los animales hospedadores y sirven para aumentar la

eficacia del producto. Estos ingredientes pueden incluir componentes inmunogénicos de virus, como las bacterias muertas, que estimulan la respuesta inmune contra otras fracciones presentes en la vacuna o citocinas que se utilizan para regular aspectos específicos del sistema inmune. Estas pueden estar incluidas en constructos de ADNr donde se expresa con el antígeno.<sup>7,8</sup>

En la industria avícola se elaboran una gran variedad de vacunas, entre las cuales, una de las de mayor importancia son la vacuna contra la enfermedad de Newcastle (ENC) y la bronquitis infecciosa (BI).

### **Requisitos para las vacunas contra la enfermedad de Newcastle**

Las cepas del virus de la ENC empleadas en las vacunas comerciales de virus activo se agrupan en dos : vacuna de virus lentogénico tales como Hitchner-B1, La Sota, V4, NDW, I2 y F, y vacunas con virus mesogénico, tales como Roakin, Mukteswar y Haifa-Komarov.<sup>9, 10, 11</sup>. Las cepas de ambos grupos han sido seleccionadas y clonadas para satisfacer diferentes criterios en su producción y aplicación.<sup>12, 13</sup>

La mayoría de las vacunas con virus activo se replican en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de ave, pero algunas cepas mesogénicas se han adaptado a una variedad de sistema de cultivos de tejidos.<sup>9</sup>

Las vacunas a virus activo pueden administrarse a las aves a través del agua de bebida, en forma de aerosol con gota gruesa o mediante la instilación conjuntival o intranasal.<sup>10</sup> Algunas cepas mesogénicas se aplicaban por inoculación intradérmica en la membrana del ala. Se han probado vacunas que dan resultados mediante la aplicación de vías específicas.<sup>14</sup>

En general, las vacunas a virus activo son más inmunogénicas sin embargo es más probable que causen efectos secundarios adversos. Por ejemplo, la vacunación con la cepa La Sota causa problemas considerablemente mayores en aves jóvenes susceptibles que la cepa Hitchner-B1, aunque La Sota induce

una respuesta inmune más fuerte.<sup>15, 16, 17</sup>

Cuando se diseña un programa de vacunación, debe tenerse en consideración el tipo de vacuna utilizada, el estado inmune de las aves a vacunar y el nivel de protección requerido en relación a la zona donde se encuentran las aves.<sup>18</sup>

### **Requisitos para las vacunas contra la bronquitis infecciosa**

Todos los virus presentes en vacunas con virus activo deben ser modificados o ser naturalmente apatógenos. Muchos países sólo permiten vacunas activas que estén basadas en el patotipo Massachusetts.<sup>19</sup> Es improbable que la inoculación única de una vacuna inactivada para la BI confiera una protección completa hasta el final del ciclo de producción de huevo, a menos que esté precedida por una respuesta primaria, inducida generalmente por una vacuna a virus activo. Las vacunas inactivadas tienen que administrarse individualmente a las aves, mediante inyección intramuscular o subcutánea, mientras que las vacunas a virus activo se pueden dar en forma de aerosol, en el agua de bebida u ocular. Las vacunas a virus activo producen una mejor inmunidad local en el tracto respiratorio y pueden proteger frente a un espectro más amplio de cepas de campo<sup>19, 20.</sup>

Las vacunas a virus activo puede que no protejan durante todo el ciclo de producción de huevo, ya que el desafío con cepas de serotipos distintos es un hecho muy común en granjas con aves de edades múltiples, y el descenso en la producción es común por desafíos de campo hacia las 40 semanas de edad.<sup>21</sup> El uso de algunas vacunas a virus activo conlleva el riesgo de patogenicidad residual en la población asociada con el pase de la vacuna. Sin embargo, el empleo de técnicas apropiadas de distribución masiva (por ejemplo, aerosol o agua de bebida) para asegurar una cobertura y una distribución uniforme de la vacuna en la población y evitar el uso de dosis fraccionadas subóptimas de la vacuna tiene generalmente como resultado una aplicación segura de las vacunas a virus activo.<sup>22</sup>

Las vacunas inactivadas emulsionadas en aceite actuales son más eficaces, en

especial cuando están precedidas inmunológicamente por una vacuna con virus activo. También estimulan una respuesta de anticuerpos más persistente. Hay perspectivas del diseño de vacunas por medio de ingeniería genética, y actualmente se están desarrollando para la vacunación *in ovo*<sup>9</sup>.

Entre las vacunas contra la BI, existen diferencias importantes entre los diversos países con lo que respecta al virus de desafío que se emplea en las pruebas de potencia y validación. Tradicionalmente, se ha utilizado la cepa virulenta M-41 del tipo Massachusetts para pruebas de desafío, tanto para vacunas a virus activo como inactivadas. Aunque este tipo es todavía común, en muchos países a menudo no es el único o dominante, por lo cual es aconsejable preparar a partir de patotipos existentes. Establecer criterios para validar el virus de desafío puede ser más difícil para otros tipos que no sean Massachusetts esto debido a su menor virulencia. Normalmente, se piensa que las vacunas inactivadas protegen contra el descenso en la producción de huevos. El virus de desafío tradicional M-41, causa un descenso en la postura de huevo hasta del 67% en los testigos no vacunados, pero cuando se usan otros tipos, se pueden considerar satisfactorios descensos menores, lo cual depende de la evidencia publicada sobre los efectos de estas cepas bajo condiciones de campo.<sup>18, 19, 20, 21.</sup>

### **Producción de vacunas a virus activo.**

Para la producción de vacunas se utiliza al embrión de pollo como el huésped natural para la replicación, propagación y caracterización de los virus aviares.<sup>23</sup>

Los órganos del embrión tienen las células necesarias para la replicación de diferentes tipos de virus. El éxito en la propagación y aislamiento de los virus depende de:

1. Vía de inoculación
2. Edad del embrión

3. Tiempo de incubación
4. Volumen y dilución del inóculo utilizado
5. Temperatura de incubación
6. Humedad relativa
7. Volteo
8. El estado inmune de las aves reproductoras de la cual provienen los embriones.<sup>23, 24, 25.</sup>

Los embriones de pollo que se utilizan para la producción de vacunas deben ser libres de trastornos congénitos, enfermedades infecciosas y contaminaciones externas de cualquier tipo. Así mismo, para la producción de vacunas de virus activo, de cultivos celulares y para la propagación de la semilla maestra; se emplean embriones libres de patógenos específicos (LPE), con el fin de asegurar la calidad de las mismas.<sup>23, 24</sup>

Las inmunoglobulinas del suero de la madre se transfieren con facilidad al saco vitelino del huevo mientras aún está en el ovario. En consecuencia existe IgY en el saco vitelino, en concentraciones que varían dependiendo del agente, los investigadores reportan una transferencia de aproximadamente 30 %. Además, al pasar el huevo por el oviducto se agregan a la albumina IgM e IgA de las secreciones de esta porción. Conforme se desarrolla el embrión este absorbe parte de la IgY del saco vitelino, la cual aparece luego en la circulación. La IgM y la IgA maternas se difunden en el líquido amniótico, y el embrión las deglute, de modo que cuando el pollo emerge del cascarón cuenta con la IgY en el suero y con IgM e IgA en el intestino.<sup>26, 27, 28,</sup>

La replicación del virus puede ser detectada por la presentación de lesiones que varían según el agente viral inoculado y pueden ser:

- a) Presencia de pústulas en la membrana corioalantoidea
- b) Hemorragias cutáneas
- c) Crecimiento anormal de los miembros
- d) Anormalidades en vísceras<sup>23, 25.</sup>

Entre los métodos de detección de replicación viral en los embriones se

incluyen:

- 1) La detección de hemaglutininas en el fluido alantoideo
- 2) El uso de técnicas serológicas como inhibición de la hemoaglutinación, ELISA, y aglutinación en placa, entre otras.
- 3) Técnicas moleculares como PCR y RFLP .<sup>23, 24</sup>

En Estados Unidos de Norteamérica, a través del memorándum 800.65 y 9CFR del USDA (United States Department of Agriculture), y en Europa, a través de la farmacopea europea, se propone el uso de embriones LPE para el diagnóstico y la investigación. Estos embriones provienen de parvadas que se someten a un riguroso programa de monitoreo y que han mostrado estar libres de los principales patógenos que afectan a la industria avícola, de manera que las parvadas deben mostrar serología negativa contra ciertos agentes específicos como: encefalomiélitis aviar, laringotraqueítis infecciosa, reovirus, *Salmonella* spp., entre otras.<sup>24, 30</sup>

En México hay disponibilidad de embriones provenientes de aves libres de patógenos específicos (ALPES®) los cuales se clasifican en dos tipos, de acuerdo con los agentes infecciosos de los que se asegura están libres y los niveles de anticuerpos que puedan tener en el saco vitelino. (ALPES® I y ALPES® II) Cuadro 1.<sup>24, 30</sup>

### **Titulación de vacunas de virus activo**

Uno de los usos que se da al embrión de pollo en los laboratorios es la titulación de vacunas y de suspensiones de virus. La titulación es una prueba de control de calidad para asegurar que el producto vacunal contiene la cantidad de antígeno establecido en la orden de producción y consiste en la medición cuantitativa de partículas virales<sup>4, 18</sup>, mediante la preparación de diluciones del virus vacunal para la determinación del punto final en la cual la

actividad biológica de la suspensión viral es detectada.<sup>31.</sup>

## **JUSTIFICACIÓN**

Los anticuerpos transmitidos de la madre al embrión se encuentran en el saco vitelino, mientras que la inoculación de los virus vacunales de la ENC y de la BI se realiza por cavidad alantoidea y en teoría hay poca probabilidad de contacto entre el virus vacunal y los anticuerpos del saco vitelino. Sin embargo, es conveniente comprobar que la titulación de vacunas no se altera por los anticuerpos presentes en el saco vitelino. México sólo cuenta con una empresa dedicada a la producción de embriones LPE, por lo cual el abastecimiento a los laboratorios que los utilizan está siempre en constante riesgo a un imprevisto además de la diferencia significativa de precio comparado con el costo de embriones provenientes de gallinas reproductoras con altos títulos de anticuerpos contra diferentes agentes infecciosos. En consecuencia algunos laboratorios utilizan embriones convencionales para su trabajo rutinario como lo es la titulación de vacunas a virus activo.

## **HIPÓTESIS**

Si los anticuerpos contra ENC y BI se encuentran en el saco vitelino y la inoculación se realiza por vía cavidad alantoidea, entonces estos no interfieren con la titulación de los virus inoculados.

## **OBJETIVO GENERAL:**

- Comparar la titulación de virus de ENC y BI, mediante la inoculación en embrión convencional con anticuerpos contra esos agentes y embrión ALPES® o libre de anticuerpos, para probar que la titulación no se ve afectada al utilizar cualquiera de estos embriones.

**Objetivos específicos:**

- Titular vacunas comerciales contra ENC y BI en embriones que presenten en el saco vitelino anticuerpos contra estos agentes y en embriones sin anticuerpos
- Detectar y cuantificar anticuerpos contra ENC y BI en el saco vitelino de los huevos embrionados usados para la titulación de las vacunas, mediante la prueba serológica ELISA

## **MATERIAL Y MÉTODOS:**

**Instalaciones:** Laboratorio de virología y serología del Departamento de Producción Animal: Aves (DPAA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

**Embriones para experimentación:** Se utilizaron 600 embriones de 9-11 días de edad con anticuerpos contra los virus de ENC y BI, obtenidos del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv) perteneciente a la FMVZ-UNAM; también 600 embriones sin anticuerpos de 9-11 días de edad obtenidos de Aves Libres de Patógenos Específicos (ALPES I® Tehuacán, Puebla, México).

### **Vacunas**

I.-Contra la enfermedad de Newcastle: Se utilizó virus activo de vacunas comerciales.

1. Cepa La sota. Lote LS-108
2. Cepa B1. Lote 81-108
3. Cepa La sota. Lote LS-103
4. Cepa B1. Lote 81-103
5. Cepa B1. Lote 81-104

II.-Contra la bronquitis infecciosa: Se utilizó virus activo modificado cepa Massachusetts de vacunas comerciales de diferentes lotes.

- A. Lote 1047168A.
- B. Lote 1057168A.
- C. Lote 1107168A.
- D. Lote 1037170A
- E. Lote 1047170A

### **Diseño experimental**

Cada vacuna se tituló por duplicado en grupos de 25 embriones convencionales y en embrión ALPES®.

## **Procedimiento para la titulación de los virus**

### **Vacuna contra la ENC**

La vacuna se reconstituyó con 30 ml de diluyente para vacuna de 1000 dosis.<sup>32</sup> Se agitó por 30 segundos y permaneció en refrigeración por 15 minutos para permitir la disgregación del virus, después se hicieron diluciones décuples seriadas a partir de la concentración inicial hasta la dilución  $10^{-9}$  para ello se mezclaron 0.5 mL de la vacuna más 4.5 mL de PBS con 1 % de antibiótico y antimicótico (1000 unidades de penicilina G sódica, 1 mg de sulfato de estreptomina y 25 µg de anfotericina B al 0.85 %), se usó una pipeta por cada dilución, se mezcló la dilución antes de proceder al siguiente tubo, los tubos con las diluciones se conservaron en inmersión en hielo.<sup>28 30.</sup> Finalmente, se inocularon 5 embriones de 9-11 días de edad de la dilución  $10^{-5}$  hasta  $10^{-9}$  por cavidad alantoidea con 0.2 mL por dilución.<sup>18, 31, 32, 33,</sup>

Se incubaron los embriones a 37.7 C°, diariamente se verificó la supervivencia por observación con un ovoscopio, la mortalidad de las 24 horas se consideró como inespecífica<sup>18, 23, 24, 31.</sup>

Los embriones se sacrificaron por refrigeración a 4 °C por 2 horas<sup>33, 34</sup> al sexto día postinoculación y posteriormente se realizó la prueba de hemoaglutinación en placa tomando 50 – 100 µL de líquido alantoideo de cada embrión inoculado y de cada dilución, confrontándolo con eritrocitos de ave diluidos al 3 %, de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-052-ZOO-1994 en su apéndice A, la hemoaglutinación se consideró positiva en aquellos embriones en los cuales la reacción de hemoaglutinación directa fue evidente y también se tomaron como positivos los embriones muertos después de las 68-72 horas, que produjeron hemoaglutinación.<sup>18</sup>

## Vacuna contra la BI

La vacuna se reconstituyó con 30 ml de diluyente para vacuna de 1000 dosis<sup>32</sup>. Se agitó por 30 segundos y permaneció en refrigeración por 15 minutos para permitir la disgregación del virus, después se hicieron diluciones décuples seriadas de la concentración inicial hasta  $10^{-6}$  para ello se mezclaron 0.5 mL de la vacuna mas 4.5 mL de PBS con 1% de antibiótico y antimicótico (1000 unidades penicilina G sódica, 1 mg sulfato de estreptomicina y 25 µg anfotericina B al 0.85 %), se usó una pipeta por cada dilución, se mezcló la dilución antes de proceder al siguiente tubo, los tubos con las diluciones se conservaron en inmersión en hielo.<sup>31</sup> Finalmente se inocularon 5 embriones de 9-11 días de edad de la dilución  $10^{-2}$  hasta  $10^{-6}$  por cavidad alantoidea con 0.2 mL por dilución.<sup>30, 31, 32.</sup>

Se incubaron los embriones a 37.7 C° y diariamente se verificó su supervivencia por observación con un ovoscopio, la mortalidad de las 24 horas se consideró como inespecífica<sup>18, 23, 24, 31.</sup>

Los embriones se sacrificaron al sexto día postinoculación por refrigeración a 4 °C por 2 horas<sup>33, 34</sup> y posteriormente se evaluaron en busca de lesiones evidentes como:

- Embrión enroscado en forma esférica (Figura 1) con las patas deformadas y comprimidas sobre la cabeza, con el amnios engrosado y adherido a ésta.<sup>25, 29</sup>
- Mesonefro pletórico de uratos (Figura 2).<sup>25, 29</sup>

## Cálculo de los títulos para las vacunas contra ENC y BI

Se determinó el punto final de la titulación, que es la dilución más alta en la cual el virus produce un efecto detectable en el 50% de los embriones. Los títulos se determinaron mediante el método descrito por Reed y Munch.<sup>18, 31,</sup> Se obtuvo el promedio del título de las dos titulaciones realizadas en cada tipo de embrión.

En el presente estudio la titulación de las vacunas en cada tipo de embrión se

realizó por duplicado, para obtener el título promedio se estableció como máximo una diferencia de 0.5 Log<sub>10</sub> entre el resultado de ambas titulaciones, para considerar válida la titulación. Después se compararon los títulos promedio obtenidos en embriones con o sin anticuerpos específicos contra cada virus, y se aplicó el mismo criterio de diferencia de 0.5 Log<sub>10</sub> para determinar si existe diferencia en el título, además de la comparación de medias por la prueba estadística de Tukey.

### **Estudio Serológico**

El saco vitelino de todos los embriones inoculados fue muestreado el día de su muerte o después del sacrificio a los 6 días postinoculación para la detección de anticuerpos.

### **Toma de muestras del saco vitelino**

Para la toma de muestra del saco vitelino se quitó el cascarón alrededor de la cámara de aire, se retiró el embrión, dejando en el cascarón sólo el saco vitelino y con una micropipeta se tomaron 100 µL de líquido vitelino, el cual fue procesado como una muestra de suero, de acuerdo con las indicaciones del fabricante de la prueba ELISA comercial.<sup>35</sup>

### **Prueba ELISA**

Se realizó la prueba ELISA técnica indirecta para ENC y BI usando los kits ProFLOK® NDV y ProFLOK® IBV (Synbiotics Corporation, San Diego, CA, USA), respectivamente.<sup>35</sup> El título ELISA corresponde a la media geométrica del título (MGT) ± el error estándar de la media, entre paréntesis se muestra el coeficiente de variación (CV). Los títulos de anticuerpos se calcularon con el uso del software ProFILE 2.02 (Synbiotics Corporation, San Diego, CA, USA)

## **Análisis estadístico**

El título promedio de las vacunas en cada tipo de embrión se analizó por comparación de medias entre grupos mediante análisis de la varianza y la prueba de Tukey. A los resultados de la prueba ELISA, se les realizó análisis de la varianza. En ambos casos la significancia estadística se fijó con  $p < 0.05$ .<sup>36</sup>

## RESULTADOS

- **Titulación de las vacunas contra la ENC**

Los títulos máximos se obtuvieron en los embriones ALPES® sin embargo, no hubo diferencia significativa con los obtenidos en los embriones convencionales (Cuadro 2).

El título máximo en los dos tipos de embriones fue de la vacuna 5, ( $10^{9.62}$ ) y el título mínimo de la vacuna 4 ( $10^{6.59}$ ). (Cuadro 2).

- **Titulación de las vacunas contra BI**

Para la vacuna de BI los títulos máximos fueron los obtenidos con la vacuna E ( $10^{5.8}$ ) en los embriones ALPES® y la vacuna D ( $10^{5.62}$ ) en los embriones convencionales; los títulos mínimos fueron de la vacuna C ( $10^{5.11}$ ) en ambos tipos de embriones. No hubo diferencia significativa entre los títulos promedio obtenidos de cada vacuna con ambos tipos de embriones (Cuadro 3).

## Niveles de anticuerpos encontrados en saco vitelino a través de la técnica ELISA.

### ENC

Para los embriones ALPES® la MGT fue de  $1,273 \pm 358$  (37%CV) y para los embriones convencionales fue de  $8,224 \pm 307$  (6.2%CV) respectivamente. (Figura 3)

### BI

Para los embriones ALPES® la MGT fue  $511 \pm 93$  (30% CV) y para los embriones convencionales de  $9,213 \pm 3,366$  (58% CV). (Figura 4)

## DISCUSIÓN

Las vacunas contra la ENC obtuvieron los títulos mayores en embriones ALPES® excepto la vacuna 4, sin embargo al comparar las medias de los títulos entre los dos tipos de embriones no hay diferencia estadística, resultados similares se encontraron en un estudio realizado por Moreno<sup>37</sup> *et al.*,

donde replicaron el virus de la ENC y no encontraron relación entre el nivel de anticuerpos del saco vitelino y el título viral obtenido en grupos de embriones con distintos niveles de anticuerpos contra el virus.

El título de la vacuna 4 de ENC en los embriones ALPES® fue de 0.6 Log10 aparentemente mayor que en los embriones convencionales. El título en embriones ALPES® ( $10^{7.19}$  DIEP<sub>50</sub>/ml) se interpreta como adecuado para una vacuna que será utilizada en una parvada comercial, mientras que el título obtenido en embriones convencionales ( $10^{6.59}$  DIEP<sub>50</sub>/ml) debe interpretarse como inadecuado si es que desea usarse esta vacuna en aves comerciales, de acuerdo con la NOM-052-ZOO-1995.<sup>18</sup>

Los títulos mas altos de las vacunas contra BI se presentaron en los embriones ALPES® excepto en la vacuna D ( $10^{5.18}$ ), sin embargo, al comparar las medias de los títulos entre los dos tipos de embriones no se encontró diferencia estadística. Lo que indica que las vacunas contra BI pueden titularse en embriones que presenten en el saco vitelino anticuerpos contra éste agente, sin riesgo de que el resultado se vea afectado.

El título de la vacuna D de BI en los embriones convencionales tiene una diferencia de 0.44 Log10 mayor que los embriones ALPES®, en las otras vacunas hay una diferencia en los embriones ALPES® con un rango de 0.04 a 0.4 Log10 mayor a los embriones convencionales. Con base en el criterio del DPAA para la interpretación del resultado de la titulación de suspensiones de virus, la repetibilidad de la titulación se considera válida, ya que no rebasa el 0.5 Log10 de ese criterio.

En el DPAA se ha usado 0.5 Log10 como diferencia máxima en el título obtenido en las repeticiones de la prueba, para aceptarla como válida, si se compara con el 0.1 Log10 recomendado por Payment *et al*<sup>38</sup>, es una diferencia muy flexible, mientras que si se compara con el límite establecido por Maramorosh *et al*<sup>39</sup> (1 Log10) la diferencia de 0.5 Log10 es más estricta.

Las vacunas contra la ENC mostraron títulos que se encuentran dentro de los rangos establecidos en la Norma Oficial Mexicana<sup>18</sup>, con un mínimo de  $10^7$

DIEP<sub>50%</sub> / ml; estos títulos han asegurado la protección de aves libres de patógenos específicos vacunadas y desafiadas con virus de la enfermedad de Newcastle velogénico viscerotrópico cuando se han efectuado las correspondientes pruebas de potencia<sup>40</sup>. El título del antígeno en las vacunas activas está relacionado con la intensidad de la protección de los animales ante desafíos experimentales o de campo, de acuerdo con los estudios realizados por Lancaster *et al*<sup>41</sup> una vacuna contra ENC de la cepa La Sota con título de 10<sup>5</sup> DIEP<sub>50%</sub>/mL indujo protección del 60% de las aves desafiadas con virus virulento, a partir del día 7 postvacunal, mientras que una vacuna con título de 10<sup>8</sup> DIEP<sub>50%</sub>/mL logró 100% de protección al 6º día postvacunal.

El título de la vacuna también está relacionado con la respuesta inmune humoral que resulta, y este a su vez con la protección ante el desafío con virus virulento. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Newcastle, Survashe y Desmukh<sup>42</sup> reportaron que títulos de anticuerpos en la prueba de inhibición de la hemaglutinación de 16 (2<sup>4</sup>) protegen al 90% de las aves contra la mortalidad, y títulos superiores a este protegen al 100% de los animales desafiados.

Las cinco vacunas de BI tuvieron títulos aceptables, esto con base en la Norma Oficial Mexicana<sup>32</sup>, cuyo título mínimo es 10<sup>4</sup> DIEP<sub>50%</sub> / ml; estos valores estiman una potencia adecuada de las vacunas procesadas, que tendría como resultado una apropiada inmunización de las aves. Al igual que en el caso de las vacunas contra ENC, el título de antígeno en el inmunógeno está relacionado con el grado de protección conferida, en el estudio realizado por Raggi y Lee<sup>43</sup>, una vacuna contra BI con título de 10<sup>3.5</sup> DIEP<sub>50%</sub>/mL indujo protección del 61.1% de las aves desafiadas con virus virulento a partir de la semana 7 postvacunal mientras que una vacuna con título de 10<sup>4.5</sup> DIEP<sub>50%</sub>/mL logro 100% de protección a la semana 7 postvacunal. Por otro lado, el trabajo de Galindo, et al.<sup>44</sup>, demuestra que la administración de media dosis de la vacuna contra BI al día de edad tiene efecto sobre la protección ante el desafío, ya que el re-aislamiento del virus de desafío fue de casi 92%, mientras que en aves vacunadas con media dosis y revacunadas al día 23 de

edad no se re-aisló el virus de desafío. La MGT de anticuerpos detectados por ELISA en los grupos fue 75 y 3,140, respectivamente, lo que demuestra que la carga antigénica de la vacuna, y su respectiva revacunación, influye directamente sobre la intensidad de la respuesta inmune humoral. En el presente estudio, los anticuerpos detectados en el saco vitelino de los embriones convencionales, provienen de las gallinas reproductoras presuntamente vacunadas contra estas enfermedades, por lo cual ocurre la transferencia de anticuerpos hacia la progenie. De acuerdo con Gharaibeh *et al.*<sup>28</sup> el porcentaje de transferencia de anticuerpos maternos en pollitos de un día de edad para ENC es 29.2 y de 38.6% para BI.

El nivel de los anticuerpos contra la ENC medidos por ELISA en los embriones convencionales tuvieron una MGT de 8224 y los embriones ALPES® de 1273. Moreno *et al.*<sup>37</sup> reportaron una MGT de 253 en embriones convencionales y una MGT <10 en embrión ALPES®, en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. Para comparar los resultados con Moreno *et al.*<sup>37</sup> se realizó una inferencia del título de anticuerpos que se obtendría al realizar inhibición de la hemoaglutinación mediante el estudio realizado por Merino *et al.*<sup>45</sup> en el cual determinaron la correlación HI-ELISA para la detección de anticuerpos contra la ENC. Al comparar los resultados con el presente estudio, los títulos para embriones ALPES® corresponderían a HI < 10 y los de embriones convencionales estarían en un rango de 160-320 que son muy similares a los informados por Moreno *et al.*<sup>37</sup>

Los niveles de anticuerpos contra BI encontrados en los embriones ALPES® tuvieron un coeficiente de variación de 50.3%, mientras en los embriones convencionales fue de 8.5%, la dispersión fue mayor en los embriones ALPES® ya que algunas muestras presentaron anticuerpos mientras la gran mayoría fueron negativos. En la búsqueda bibliográfica realizada para llevar a cabo este trabajo, no se encontró algún estudio que correlacione el título del virus de la BI y la concentración de anticuerpos en el saco vitelino de los embriones usados para tal fin. Los resultados de este trabajo indican que el

título de anticuerpos ELISA de 9,000 obtenidos por el sistema comercial aquí empleado, no tiene efecto significativo sobre la replicación del virus vacunal.

La presunta presencia de anticuerpos contra BI en los embriones ALPES® puede deberse a la técnica utilizada para la toma del saco vitelino, Keck *et al*<sup>46</sup> realizaron un estudio en el cual detectaron anticuerpos en muestras de suero y saco vitelino, por medio de sistemas comerciales de la prueba ELISA para la enfermedad de Newcastle, el virus de bronquitis infecciosa, el virus de la infección de la bolsa de Fabricio y para reovirus aviar. Ellos reportan que el nivel de anticuerpos en el saco vitelino puede verse afectado por el sitio en donde se obtiene la muestra y la mezcla apropiada de la misma, ya que los anticuerpos no se encuentran bien distribuidos en todo el saco vitelino, por lo cual recomiendan mezclar el saco vitelino con diferentes sustancias para llevar a cabo la eliminación de lípidos, de las cuales la mas utilizada es el cloroformo y su posterior centrifugación. Así mismo, Mohammed *et al*<sup>47</sup> compararon títulos de ELISA al procesar el saco vitelino con solución salina y con cloroformo, obtuvieron títulos mas altos con muestras procesadas con cloroformo debido a que los lípidos interfieren con la interacción antígeno-anticuerpo. También observaron falsos positivos en inhibición de la hemoaglutinación al utilizar una dilución baja (1:80), pero no en ELISA ya que utilizaron una dilución muy alta (1:800), la cual es suficiente para diluir los factores reactivos no específicos y permitir la diferenciación entre muestras positivas y negativas. En el presente estudio se realizó una dilución 1:100 lo cual pudo haber favorecido la presentación de falsos positivos en los embriones sin anticuerpos.

La toma de saco vitelino demuestra ser una técnica confiable para medir anticuerpos, como ha sido descrito en varios estudios considerando la eliminación apropiada de lípidos y la dilución adecuada del saco vitelino<sup>46, 47, 48, 49, 50, 51, 52</sup>, además de que se pueden extrapolar los niveles de anticuerpos presentes en las aves reproductoras. El saco vitelino, es decir los embriones, tienen la ventaja de que son relativamente fáciles de transportar, no requieren de refrigeración (en periodos cortos), la recolección es más sencilla, evita el

manejo, finalmente puede conocerse el estado de infección/vacunación de las reproductoras.<sup>48</sup> De acuerdo con estos resultados, la utilización del saco vitelino sin tratamiento alguno es recomendable para medir la respuesta a la vacunación de las gallinas reproductoras o la transferencia de inmunidad pasiva a la progenie. Si lo que se desea es determinar el estado de infección en las gallinas reproductoras o la ausencia de anticuerpos en el saco vitelino, entonces se puede requerir dar tratamiento con cloroformo u otros agentes a el saco vitelino esto con la finalidad de evitar el riesgo de obtener falsos positivos.

## CONCLUSIONES

- ❖ La titulación de las vacunas contra la ENC y BI no se ve afectada por los anticuerpos que están presentes en los embriones procedentes de gallinas reproductoras vacunadas o infectadas con estos agentes; por lo cual la prueba se puede llevar a cabo en ambos tipos de embriones. Como los embriones ALPES® tienen un mayor costo y potencialmente menor disponibilidad, una alternativa es utilizar los embriones convencionales que tienen un menor costo y mayor disponibilidad.
- ❖ Dado que las vacunas contra la enfermedad de Newcastle y la bronquitis infecciosa son biológicos regulados por Normas Oficiales Mexicanas, se debe dar importancia a la interpretación del resultado dado que estos valores estiman una potencia adecuada de las vacunas procesadas, tendría como resultado una apropiada inmunización de las aves.
- ❖ Se puede llevar a cabo la titulación de vacunas contra ENC con embriones que presenten anticuerpos con un título ELISA de hasta 9,000.
- ❖ Se puede llevar a cabo la titulación de vacunas contra BI con embriones que presenten anticuerpos con un título ELISA de hasta 7,400.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Brunner MR, Danner K, Jungback C, Lemke I, Moos M, Selbitz HJ et al. Vacunación de los animales domésticos. Ed. Acribia pp.4, 5, 137, 141. 2002.
2. Mosqueda TA. Criterios en la elaboración de programas de vacunación en aves. Memorias de XX Curso Avimex "Actualidades en vacunología aviar"; 2008 junio 27;. México (DF):Laboratorios Avimex, S.A. de C.V, 2008: 49-61
3. Zavala G. Inmunización y sistemas de vacunación. Memorias de XX Curso Avimex "Actualidades en vacunología aviar"; 2008 junio 27;. México (DF):Laboratorios Avimex, S.A. de C.V, 2008: 41-47
4. Oficina Internacional de Epizootias: Principios de producción de vacunas veterinarias. Manual de la Oficina Internacional de Epizootias sobre animales terrestres. OIE 2006.
5. Lara PJ. Vacunología: Métodos convencionales y Alternativos. Memorias de XX Curso Avimex "Actualidades en vacunología aviar"; 2008 junio 27; México (DF): Laboratorios Avimex, S.A. de C.V, 2008:27-40.
6. Jansen T, Marij PM, Hofmans, Marc JG, Theelen, Virgil EJ, *et al.* Structure–activity relations of water-in-oil vaccine formulations and induced antigen-specific antibody responses. *Vaccine* 2005; 23:1053–1060
7. Xiaofei Z, Xiaowen Z, Qian Y. Effect of compound mucosal immune adjuvant on mucosal and systemic immune responses in chicken orally vaccinated with attenuated Newcastle-disease vaccine. *Vaccine* 2007;25: 3254–3262
8. Linghua Z, Meirong Z, Jiaoqing L, Ting C, Xingshan T, Fengzhen Z. Enhancement of mucosal immune responses by intranasal co-delivery of Newcastle disease vaccine plus CpG oligonucleotide in SPF chickens in vivo. *Res Vet Sci* 2008;85:495–502

9. Gilad E, Gallili I, Nathan DB. Newcastle disease vaccines. *Biotechnol Adv* 1998; 16:349.
10. Oficina Internacional de Epizootias: Enfermedad de Newcastle. Manual de la Oficina Internacional de Epizootias sobre animales terrestres. OIE 2006.
11. Juárez EM. Evaluación de la respuesta serológica de tres vacunas emulsionadas del virus de la enfermedad de Newcastle en el campo y nivel de protección ante un desafío con una cepa de alta patogenicidad bajo condiciones controladas en pollo de engorda (tesis de licenciatura). D.F. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1995.
12. Alexander JD. Newcastle disease. In: Saif YM, Barnes HJ, Glison JR, Fadly AM, McDouald LR, Swayne. *Disease of poultry*. 11th edition. United States of America: Iowa State University Press, 2003: 68, 104,105.
13. Alders R, Spradbrow P. Controlling Newcastle Disease in Village Chickens, ACIAR Monograph 2001; 82: 112.
14. Degefa T, Dadi L , Yami A, mariam KG, Nassir M. Technical and Economic Evaluation of Different Methods of Newcastle Disease Vaccine Administration. *J. Vet. Med. A* 2004; 51:365–369.
15. Zavala G. Vacunación contra la enfermedad de Newcastle. *Memorias de XX Curso Avimex "Actualidades en vacunología aviar"*; 2008 junio 27; México (DF):Laboratorios Avimex, S.A. de C.V, 2008:67-71.
16. Miller PJ, King DJ, Afonso CL, Suarez DL. Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine* 2007; 25:7238.
17. Seal BS, King DJ, Sellers HS. The avian response to Newcastle disease virus. *Dev. Comp. Immunol.* 2000; 24:257-268

18. Norma Oficial Mexicana. NOM-052-ZOO-1995. Requisitos mínimos para las vacunas empleadas en la prevención y control de la enfermedad de Newcastle. Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación: Diario oficial de la Federación. México DF: 24 de abril, 1997.
19. Oficina Internacional de Epizootias: Bronquitis infecciosa aviar. Manual de la Oficina Internacional de Epizootias sobre animales terrestres. OIE 2006.
20. Lucio BM. Vacunación contra la bronquitis infecciosa. Memorias de XX Curso Avimex "Actualidades en vacunología aviar"; 2008 junio 27; México (DF):Laboratorios Avimex, S.A. de C.V, 2008:63-66.
21. Wang X, William M, Schnitzlein DN, Tripathy BT, Girshick, Mazhar I, Khan DE. Construction and Immunogenicity Studies of Recombinant Fowl Poxvirus Containing the S1 Gene of Massachusetts 41 Strain of Infectious Bronchitis Virus. Avian Dis. 2002; 46:831–838.
22. Gelb JJ, Ladman BS, Licata MJ, Shapiro MH., Campion LR. Evaluating Viral Interference Between Infectious Bronchitis Virus and Newcastle Disease Virus Vaccine Strains Using Quantitative Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction. Avian Dis. 2007; 51:924–934.
23. Hitchner SB. Virus propagation in embryonating eggs In: Isolation and identification of avian pathogens, 4th ed., Purchase H. G., Ch. Lawrence. H Arp. Ch H. Domermuth. J. Pearsons. Eds. The American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. pp. 235–240. 1998.
24. Valenzuela PA. Uso de Aves libres de patógenos específicos en la producción de biológicos aviares. Memorias Simposio Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.: "Utilización de huevo embrionado en docencia e investigación"; 2000 octubre 17-19; Puebla, México México (DF): Benemérita Universidad Autónoma de Puebla 2000:1-4.
25. United States Department of Agriculture Center for Veterinary Biologics Testing protocol supplemental assay method for the titration of

- Newcastle disease vaccine, infectious bronchitis vaccine, and combination Newcastle disease-infectious bronchitis vaccine in chicken embryos. EUA: USDA, 2005.
26. Tizard IR. *Inmunología veterinaria*. 5ª Ed. McGraw-Hill Interamericana.. España. 2002.
27. Loeken MR, Roth TF. Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. *Immunology* 1983;49:21.
28. Gharaibeh S, Mahmoud K, Al-Natour M. Field Evaluation of Maternal Antibody Transfer to a Group of Pathogens in Meat-Type Chickens Poult. *Sci.* 2008;87:1550.
29. Moreno CR. La bronquitis infecciosa de las aves y métodos de genética molecular usados en su diagnóstico. *Ciencia veterinaria* 1994; 23.
30. Aves libres de patógenos específicos, S.A. de C.V. (disponible en línea) 2009 (citado 3 octubre 2009); (1 página). Disponible en: URL <http://www.alpes.com.mx/>.
31. Villegas P. Titration of biological suspensions. In: Isolation and identification of avian pathogens, 4th ed., Eds. The American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. 1998;248–262.
32. Norma Oficial Mexicana. NOM-063-ZOO-1999. Especificaciones que deben cumplir los biólogos empleados en la prevención y control de enfermedades que afectan a los animales domésticos. Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo rural, pesca y alimentación: Diario oficial de la Federación. México DF: 2 junio, 2003.
33. Office of protection for human and animal subjects. Policy for use of avian embryos. University animal care and use committee San Francisco State University (serial on line) 2009 (citado 3 octubre 2009); (2 páginas). Disponible en: URL <http://www.sfsu.edu/~protocol/animal/policies/avian-embryo.html>
34. Institutional Animal care and Use Committee (IACUC). Policy for use of avian embryos. Case Western Reserve University. (serial online) 2008

- Julio (citado 2 octubre 2009); (2 páginas) Disponible en URL :  
<http://casemed.case.edu/ora/iacuc/forms/Policy%20for%20Use%20of%20Avian%20Embryos.pdf>
35. ProFLOK® NDV # catálogo 96-6547 y ProFLOK® IBV # catálogo 96-6506 (Synbiotics Corporation, 11011 Vía frontera, San Diego, California 92127 EUA).
  36. STATGRAPHICS® for windows® © Statistical Graphics Corporation and Manugistics Inc. Version 3.3. Hendon, VA, USA 20171, 1997.
  37. Moreno SH, Lucio DE, Barrón FL. Títulos obtenidos de embriones inoculados con el virus de la enfermedad de Newcastle conteniendo distintas cantidades de anticuerpos contra el mismo. Memorias de la XIX Convención Anual ANECA. Puerto Vallarta, Jalisco, México. 1994. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. México, D. F. 1994: 185.
  38. Payment P, Trudel M. Methods and Techniques in Virology. Ed. Merce Dekker Inc. New. York USA. 1988:32
  39. Maramorosh K, Hulari K. Methods in virology. Ed. Headame Press. EUA. 1967:162.
  40. Code of Federal Regulations. 9 CFR 113.329. Newcastle Disease Vaccine. United States Department of Agriculture. Estate United American Washington DC: December, 2005.
  41. Lancaster, JE. The control of Newcastle Disease. World's Poultry Science Journal. 1981: 37:1.
  42. Survashe BD, Desmukh SG. Newcastle disease prevention and control. Poultry international. 1998. February. 26-28.
  43. Raggi LG, Lee GG. Lack of correlation between infectivity, serologic response and challenge results in immunization with an avian infectious bronchitis vaccine. The journal of immunology. 1965: (96)4.538-543.
  44. Galindo MF, Escorcía M, Petrone VM, Fehervari T, Quintana LJ, Tellez IG, Evaluación de tres protocolos de vacunación de explotaciones de

- pollo de engorda en el altiplano mexicano, mediante detección de anticuerpos y protección ante un desafío controlado con el virus de bronquitis infecciosa. Vet Mex 2000, 31 (2):83-88
45. Merino R, Gutiérrez LY, Tejeda VJ. Correlación HI-ELISA para la detección de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle. Memorias de las VIII Jornadas Médico Avícolas. México, DF. Departamento de Producción Animal : Aves, FMVZ, UNAM 2002: 150-152.
46. Keck LD, Skeeles JK, Mcnew RW. Antibody detection in matched chicken sera and egg yolk samples by commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for Newcastle disease virus, infectious bronchitis virus, infectious bursal disease virus, and avian reovirus. Avian Dis. 1993;37: 825-828.
47. Mohammed HO, Yamamoto R, Carpenter TE, Ortmyer HB. Comparison of egg yolk and serum for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Dis. 1986; 30(2):398-407.
48. Monreal G, Bauer HJ, Wiegmann J. Comparison of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), haemagglutination inhibition test and agar gel precipitation test for detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus. Avian Pathol. 1985;14: 421-434.
49. Valenzuela RE. Titulación de anticuerpos neutralizantes en la enfermedad de Newcastle presentes en la yema de gallinas reproductoras (tesis de licenciatura), D.F. México: Universidad Nacional Autónoma de México. 1970.
50. Etcharren ML, Valladares JC, Rubio GM, López CC, Peñalba G. Evaluación de la transferencia de inmunidad materna para la infección de la bolsa de Fabricio y enfermedad de Newcastle. Memorias de la XIX Convención Anual ANECA. Puerto Vallarta, Jalisco, México. 1994. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. México, D. F. 1994: 83

51. Ekelijn TA, Bouma BA, Van Eerden EC, Wil JM, Landman D, Van Knapen FA, Stegeman AB, et al. Detection of egg yolk antibodies reflecting *Salmonella enteritidis* infections using a surface plasmon resonance biosensor. *J Immunol Methods* 2006;315: 68–74.
52. Trampel DW, Min ZE, Yoon KJ, Koehler KJ. Detection of antibodies in serum and egg yolk following infection of chickens with an H6N2 avian influenza virus. *J Vet Diagn Invest* 2006;18: 437-442.

Cuadro 1.- Clasificación de los embriones libres de patógenos específicos producidos en México (de acuerdo con el formato de control de calidad que se entrega con cada pedido).

ALPES® I	ALPES® II
Adenovirus grupos I	Síndrome de baja postura
Adenovirus grupos II (HEV)	Leucosis linfoide
Adenovirus grupos III (EDS)	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
Encefalomielitis aviar	<i>Mycoplasma sinoviae</i>
Influenza aviar, tipo A	<i>Salmonella pullorum</i>
Nefritis aviar	<i>Salmonella gallinarum</i>
Paramixovirus tipo 2	Enfermedad de Newcastle
Reovirus	Influenza Aviar
Rinotraqueitis	Bronquitis Infecciosa:Massachusetts
Rotavirus aviar	
Tuberculosis aviar	
Viruela aviar	
<i>Haemophilus paragallinarum</i>	
Bronquitis infecciosa: Arkansas	
Bronquitis infecciosa: Connecticut	
Bronquitis infecciosa: JMK	
Bronquitis infecciosa:Massachusetts	
Infección de la bolsa de Fabricio: Tipo I	
Infección de la bolsa de Fabricio: Tipo II	
Laringotraqueitis	
Leucosis linfoide: subgrupo A y B.	
Leucosis linfoide aviar virus J (ALV J)	
Virus de leucosis linfoide	
Enfermedad de Marek: serotipos 1, 2 y 3.	

<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
<i>Mycoplasma synoviae</i>
Enfermedad de Newcastle
Reticuloendoteliosis
<i>Salmonella pullorum-gallinarum</i>

Para los agentes enlistados se obtuvieron resultados negativos en ALPES I mediante las siguientes pruebas: Precipitación en gel agar (AGP), observación clínica (CO), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), Inhibición de la hemoaglutinación (HI), aislamiento del agente (IA), prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA), microneutralización (MNT), postmortem (PM) y aglutinación en placa (SPA).<sup>1</sup>

Resultados positivos en ALPES II mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación para BI y ENC con una MG de 140 y 260 respectivamente.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> LABORATORIO INVESTIGACIÓN APLICADA S, A. DE C. V. 7 norte 602, Tehuacan, Puebla, México Tel:3-52-04

Cuadro 2. Resultados del promedio de la titulación del virus vacunal de ENC

Clave	Embriones ALPES®	Embriones convencionales
1	$10^{9.2}$	$10^{8.8}$
2	$10^{9.47}$	$10^{9.4}$
3	$10^{9.5}$	$10^{9.2}$
4	$10^{7.19}$	$10^{6.59}$
5	$10^{9.62}$	$10^{9.59}$

\*Valores de la titulación del virus vacunal mediante el método descrito por Reed y Münch expresados en Log10.

a.-p<0.05

Cuadro 3. Resultados del promedio de la titulación del virus vacunal de BI..

Clave	Embriones ALPES®	Embriones convencionales
A	$10^{5.39}$	$10^{5.35}$
B	$10^{5.48}$	$10^{5.08}$
C	$10^{5.11}$	$10^{5.06}$
D	$10^{5.18}$	$10^{5.62}$
E	$10^{5.8}$	$10^{5.61}$

\*Valores de la titulación del virus vacunal mediante el método descrito por Reed y Münch expresados en Log10.

a.-p<0.05

Figura 1.-Embrión de 15 días de incubación. Se observa enroscado en forma esférica debido a la inoculación del virus de bronquitis infecciosa cepa Massachusetts de vacunas comerciales



Figura 2.- Embrión de 15 días de incubación, inoculado con el virus de bronquitis infecciosa cepa Massachusetts al cual se le retiraron las vísceras para observar los riñones que tienen uratos en su superficie.

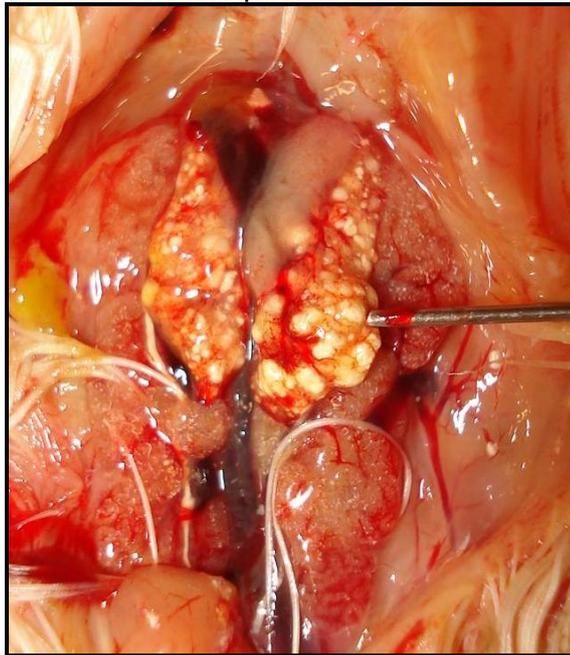


Figura 3.- Nivel de anticuerpos, máximo, mínimo y media geométrica en los embriones inoculados con el virus vacunal de ENC, medidos por la técnica ELISA.

Clave de la vacuna	Embriones Alpes®	Embriones convencionales
1	1660.8	7940.6
2	389.9	7288.6
3	2603.1	8226.0
4	1221.8	8735.7
5	1625.4	9046.0
CV %	37.0	6.2
MGT	1273.3	8224.1
Error estándar de la media	358.3	307.4

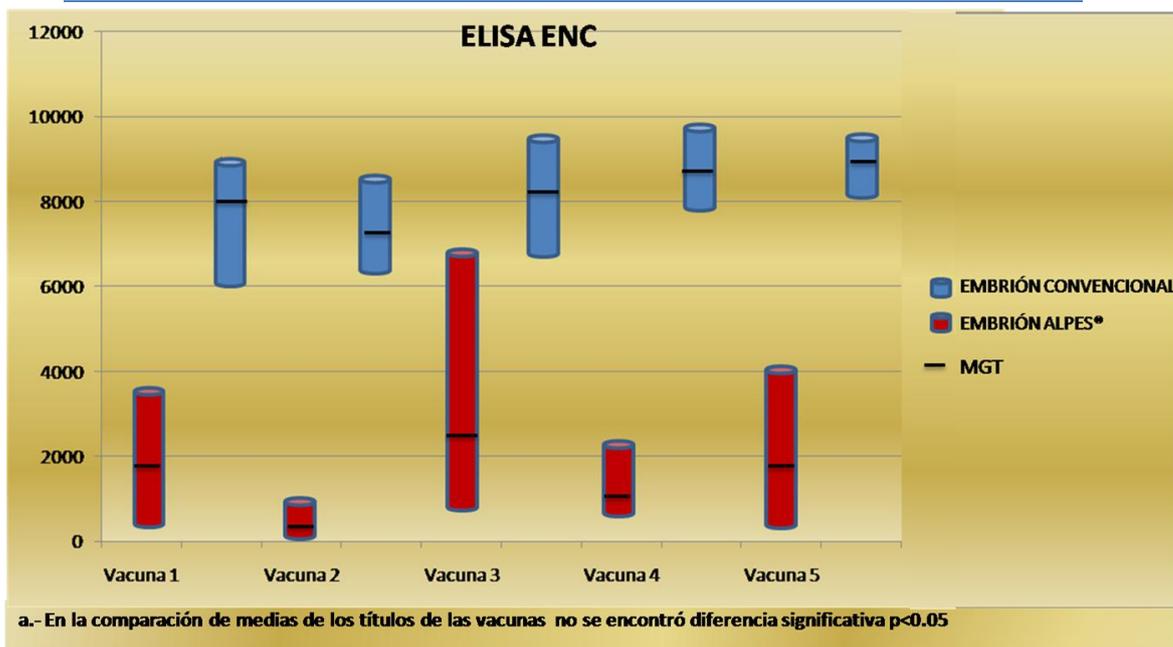


Figura 4.- Nivel de anticuerpos, máximo, mínimo y media geométrica en los embriones inoculados con el virus vacunal de BI, medidos por la técnica ELISA.

Clave de la vacuna	Embriones Alpes®	Embriones convencionales
A	822.0	5753.5
B	314.0	6871.6
C	661.2	6220.1
D	39.5	7430.6
E	439.6	7238.0
CV %	50.3	8.5
MGT	312.1	6672.5
Error estándar de la media	136.0	314.5

