



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

**ESTUDIO BACTERIOLOGICO DE VACUNAS AVIARIAS  
PREPARADAS CON VIRUS VIVO**

## **TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

*KARINA SANCHEZ REYES*



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.

## I N D I C E

	<i>Página.</i>
I.- RESUMEN.	1
II.- INTRODUCCION.	2
III.- MATERIAL Y METODOS.	5
IV.- RESULTADOS.	8
V.- DISCUSION Y CONCLUSIONES.	11
VI.- LITERATURA CITADA	13

## ESTUDIO BACTERIOLOGICO DE VACUNAS AVIARIAS PREPARADAS CON VIRUS VIVO.

Sánchez Reyes Karina.

Asesores: M.V.Z. Benjamín Lucio Martínez.  
Biol. Gloria Oralia Pacheco.

### I.- RESUMEN.

La tifoidea y la pulorosis de las aves, ocasionadas por el género Salmonella, re presentan un serio problema para la economía avícola mexicana. Una de las probables formas de transmisión es por medio de las vacunas a virus vivo preparadas en en bión de pollo, por lo cual se analizaron bacteriológicamente estas vacunas para de tectar la presencia de este gérmen, con resultados negativos.

Sin embargo, se aislaron otras bacterias: cocos Gram (+), cocos Gram (-), bacilos Gram (+) y bacterias de los siguientes géneros; Enterobacter, Pseudomonas, --- Klebsiella y Levaduras.

Por los resultados obtenidos se puede pensar que las vacunas son elaboradas bajo condiciones sanitarias deficientes.

En vista de los resultados obtenidos se observó que el método convencional aprobado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América es más sensible en relación con el método de filtración, ya que en el primero se logró detectar un 80% de contaminación en vacunas muestreadas y en el de filtración solo se detectó el 45% de contaminación.

## II.- INTRODUCCION.

En México la tifoidea aviaria y la pulorosis de la aves son dos de los problemas médicos de más urgente resolución, ya que las pérdidas económicas se calculan en --cientos de millones de pesos y reducen severamente la productividad de las gallinas (11).

En la década de los años 1960 a 1970, México alcanzó autosuficiencia nacional en la producción de huevo, pollo y reproductoras. Sin embargo, en los años de 1979, --1980 y 1981, tuvo que importar pollito y reproductoras, debido a los problemas de tifoidea aviaria y pulorosis. Estas enfermedades venían afectando tan seriamente a la avicultura nacional, que en el año de 1978, la Dirección General de Avicultura se vió en la necesidad de formar un comité para el control y erradicación de la pulorosis y la tifoidea aviaria; que apoyara la campaña de erradicación iniciada a ---principios de los años 70.

La pulorosis y la tifoidea aviaria son enfermedades sistémicas que afectan principalmente a los aparatos digestivos y reproductor de la aves, sin importar edad o sexo y ambas tienen un curso agudo o crónico, siendo este último el que con mayor frecuencia afecta a las aves adultas.

La pulorosis y la tifoidea aviaria son producidas por la Salmonella pulorum y la Salmonella gallinarum respectivamente.

Estas bacterias son bacilos Gram (-), anaerobios facultivos, inmóviles, de la familia Enterobacteriaceae, que crecen en agua verde brillante, agar dextrosa, agar sulfito de bismuto, caldo selenito, agar de Mac Conkey, etc., no fermentan la sacarosa, salicina, rafinosa y lactosa (10, 12).

+Comunicación personal del Dr. J.A. Quintana, 1982.

Los pollitos enfermos pueden no mostrar signos cuando han contraído la enfermedad a través del huevo y mueren en corto tiempo. En aquellos que sobreviven se observa somnolencia, pérdida de apetito, tendencia a aglomerarse bajo la criadora, - piar constante, diarrea blanca y aglutinación de excremento alrededor del ano, que con frecuencia impide la defecación.

En ponedoras hay baja de la postura, reducción de la fertilidad e incubabilidad y en el macho se efecta la espermatogénesis.

Las vaes pesadas, como son la Rhode Island tojas, Vantress, etc., son más susceptibles a la tifoidea aviaria y la pulorosis.

Ambas enfermedades se transmiten en forma vertical - a través del ovario -, o en forma horizontal; por medio de equipo, coma, agua y alimento contaminados (10, - 12).

Los huevos infectados tienen gran importancia en la transmisión de la enfermedad ya que infectan otros huevos por contaminación del cascarón al ocurrir explosiones en la incubadora, o bien contaminan el ambiente durante el nacimiento y así infectan al resto de los pollitos por vía respiratoria, así mismo tienen importancia ya que una gran cantidad de vacunas a virus vivo son producidas en embrión de pollo (6, 13).

En los estudios realizados por Gorrie (4), se demostró la presencia de Salmonella pullorum en una vacuna contra laringotraqueítis aviaria, por lo que debe considerarse a las vacunas a virus vivo como un medio de difusión potencial de la enfermedad.

Por otro lado, se ha visto que aves sanas inmunizadas con vacunas contaminadas con bacterias antigénicamente similares con la Salmonella pullorum y Salmonella gallinarum, pueden desarrollar reacciones cruzadas en las pruebas serológicas que se utilizan para la detección de anticuerpos contra la pulorosis y la tifoidea aviaria (13).

La cantidad de microorganismos contables en una vacuna no debe ser mayor de 10 colonias por dosis/ave, y debe estar totalmente libre de organismos patógenos, las vacunas por lo tanto, deben estar libres de Salmonella pullorum y Salmonella gallinarum u otro germen patógeno, para evitar que las gallinas enfermen o desarrollen -- reacciones serológicas cruzadas (13).

Un buen número de los brotes de tifoidea que se han presentado en México no tienen una explicación convincente en cuanto a su transmisión, por lo que debe de investigarse las diferentes posibilidades (7).

En la actualidad, en México se producen vacunas a virus vivo en embriones de parvadas que no se ha certificado que estén libres de Salmonella pullorum o Salmonella gallinarum.

Si la Salmonella pullorum y la Salmonella gallinarum se transmiten a través del huevo, se pueden pensar que las vacunas representan un alto riesgo potencial para las parvadas de gallinas, especialmente las progenitoras y las reproductoras.

En México, para la determinación de contaminación bacteriana de vacunas, se emplea la técnica descrita por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos -- (DAEU), (2, 9).

Este estudio tuvo por objeto determinar si algunas de las vacunas comerciales -- contra la enfermedad de Newcastle, viruela aviar, laringotraqueítis infecciosa y -- bronquitis infecciosa, elaboradas en huevos embrionados, están contaminadas con los agentes casuales de la tifoidea aviaria y la pulorosis.

Al usar la técnica del DAEU existe, sin embargo; el riesgo de que el antibiótico que se añade a las vacunas pueda interferir con el aislamiento de los gérmenes -- patógenos, particularmente salmonelas, por lo que se propuso examinar el contenido bacteriológico de algunas vacunas producidas en México, usando la Técnica de filtración (5, 6, 8), que reduce el riesgo de que el antibiótico inhiba el crecimiento -- bacteriano.

### III.- MATERIAL Y METODOS.

Se estudiaron un total de ciento veinte vacunas preparadas con virus vivo: cincuenta y cuatro contra la enfermedad de Newcastle, cincuenta y dos contra bronquitis infecciosa, cinco contra viruela aviar, y nueve contra laringotraqueítis infecciosa, todas ellas de diferentes marcas comerciales y de diferentes lotes. Las vacunas fueron obtenidas tanto en establecimientos comerciales como en laboratorios de producción. Cien de estas vacunas fueron analizadas usando la técnica del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (2), y veinte se estudiaron usando el método de filtración descrito por Hejl, J. y Fabrer, J. (6).

No. de vacunas	tipo de vacuna	técnica utilizada	total
43	E.N.C.	A	43
11	E.N.C	B	11
44	B.I.	A	44
8	B.I.	B	8
5	V.A.	A	5
8	L.T.	A	8
1	L.T.	B	1
120			120

Las técnicas utilizadas en el estudio bacteriológico fueron dos : .

Técnica A.- Departamento de Agricultura de los E.U.A. (2).

Técnica B.- Filtración (6).



#### Técnica A:

- 1) Se reconstituyó la vacuna (1000 dosis) en 30 ml de agua destilada estéril.
- 2) Se inoculó una caja de Petri estéril con 0.3 ml de la muestra previamente reconstituida.
- 3) Se vertieron 20 ml de agar infusión cerebro-corazón a 45 °C; se mezcló perfectamente con movimientos rotatorios y se dejó solidificar el medio.
- 4) Se incubó en posición invertida a 37 °C durante 4-6 días.
- 5) De la muestra reconstituida, se tomó 1 ml y se sembró en 5 ml de caldo selenito.
- 6) Se incubó a 37 °C durante 24 horas.

#### Técnica B:

- 1) La vacuna liofilizada fue reconstituida en 30 ml de agua destilada estéril.
- 2) Los 30 ml de vacuna fueron filtrados, usando vacío, a través de un filtro de membrana de celulosa (Millipore Co., Bedford Mass.) de 25 mm de diámetro con poros de 450 nm de diámetro.
- 3) Después de pasar la vacuna, se hicieron pasar a través de la membrana 250 ml de agua destilada estéril.
- 4) La membrana de celulosa se sembró por contacto en agar de Mac Conkey y agar infusión cerebro-corazón.
- 5) Se colocó la membrana de celulosa en 5 ml de caldo selenito.
- 6) Las placas de agar se incubaron a 37 °C durante 5 días, y el caldo selenito durante 48 horas.
- 7) Las muestras inoculadas en medios líquidos y sólidos se revisaron cada 24 horas.
- 8) Cuando se observó turbidez en los medios líquidos, se resembraron en agar de Mac Conkey y agar infusión cerebro-corazón.

9) En el caso en que fue observado crecimiento en agar de Mac Conkey y agar infu-  
sión cerebro-corazón, se procedió a identificar los gérmenes por medio de ---  
pruebas metabólicas (caldo urea, caldo rojo de fenol y sacarosa, medio de ---  
S.I.M. , agar de Kligler, agar de hierro y lisina) (3). Además se realizaron  
pruebas serológicas con aquellos aislamientos con características que indica-  
ba la posible presencia de una bacteria del género Salmonella.

#### IV.- RESULTADOS.

##### *Vacunas analizadas mediante la técnica A.*

En el cuadro I se observa que las vacunas contra la enfermedad de Newcastle (E.-N.C.) fueron las más frecuentemente contaminadas (33/43) y los contaminantes más comunes fueron cocos Gram (+), seguidos por cocos Gram (-), bacilos Gram (+) y en menor grado Pseudomonas y Enterobacter.

Se encontró que de las vacunas contra bronquitis infecciosa (B.I.), 35/44 estaban contaminadas, aislandose con mayor incidencia cocos Gram (+), cocos Gram (-) y bacilos Gram (+) y en menor grado Levaduras y Klebsiella (cuadro I).

De todas las vacunas analizadas, las de laringotraqueítis infecciosa (L.T.) mostraron el menos grado de contaminación, siendo el más frecuente cocos Gram (+) y en menor grado Klebsiella, y la que presentó el mínimo grado de contaminación fue viruela aviar (V.A.), siendo el único contaminante encontrado cocos Gram (+), (cuadro I).

##### *Vacunas analizadas mediante la técnica B.*

En el cuadro II se puede observar que las vacunas contra la enfermedad de Newcastle se encontraron más frecuentemente contaminadas con cocos Gram (+).

De las vacunas analizadas contra bronquitis infecciosa el mayor contaminante fue Enterobacter, seguido por cocos Gram (+), no habiendo crecimiento bacteriano en la vacuna contra laringotraqueítis infecciosa (cuadro II).

CUADRO 1

ATSLAMIENTOS BACTERIANOS DE VACUNAS A VIRUS VIVO USANDO LA TECNICA DE LA SECRETARIA DE AGRICULTURA DE LOS ESTADOS UNIDOS (2).

tipo de vacuna	laboratorio productor	BACTERIAS AISLADAS							
		<u>Klebsiella</u>	cocas:		<u>Pseudomonas</u>	<u>Enterobacter</u>	Bacilos Gram (+)	Levaduras	Total
			Gram (+)	Gram (-)					
E.N.C.	A	0/10	5*/10	0/10	4/10	1/10	0/10	0/10	10/10
	B	0/10	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10
	C	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3
	D	0/20	0/20	10/20	0/20	0/20	10/20	0/20	10*/20
B.I.	A	0/10	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10/20
	B	1/9	6/9	0/9	0/9	0/9	0/9	2/9	9/9
	C	0/8	5/8	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8	6/8
	D	0/17	0/17	10/17	0/17	0/17	10/17	0/17	10*/17
L.T.	B	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2
	D	0/6	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6
V.A.	B	0/5	4/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	4/5
<b>Total</b>		3/100	49/100	20/100	4/100	1/100	20/100	3/100	80/100

\* Número contaminado/número trabajado.

\*\* Se aislaron dos bacterias diferentes de la misma vacuna.

E.N.C. (enfermedad de Newcastle)-, 33/43.

B.I. (bronquitis infecciosa)-, 35/44.

L.T. (laringotraqueitis infecciosa)-, 8/8.

V.A. (viruela aviar)-, 4/5.

CUADRO 2

ASLAMIENOS BACTERIANOS DE VACUNAS A VIRUS VIVO USANDO LA TECNICA DE FILTRACION,  
(6).

Tipo de vacuna	laboratorio productor	Klebsiella *****	cocos		Pseudomonas *****	Enterobacter *****	Bacilos Gram (+)	Levaduras	Total
			Gram (+)	Gram (-)					
E.N.C.	A	0/5	2*/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5
	B	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
B.I.	A	0/4	3/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4
	B	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	4/4
L.T.	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Total		0/20	5/20	0/20	0/20	4/20	0/20	0/20	9/20

\* Número contaminado/número trabajando.

E.N.C. (enfermedad de Newcastle)-, 2/11.

B.I. (bronquitis infecciosa)-, 7/8.

L.T. (laringotraqueitis infecciosa)-, 0/1.

#### V.- DISCUSION Y CONCLUSIONES.

El principal objetivo de este estudio: demostrar la presencia de Salmonella gallinarum o Salmonella pullorum en vacunas producidas en embrión de pollo, no se aisló. Esto puede deberse a que las vacunas efectivamente están libres de esos gérmenes, o bien que los métodos empleados no fueron lo suficiente sensibles para el aislamiento de Salmonella gallinarum o Salmonella pullorum, aún cuando se emplearon las técnicas recomendadas para el aislamiento de bacterias contaminantes en vacunas de virus vivo. Es factible que las bacterias contaminantes inhiban el crecimiento de Salmonella gallinarum o Salmonella pullorum, pasando así desapercibida su presencia (8).

La posibilidad de que el antibiótico presente en la vacuna inhiba el crecimiento de Salmonella gallinarum y Salmonella pullorum fue reducida al emplear el método de filtración, el cual elimina el antibiótico presente en la vacuna (6), sin dejar la posibilidad de estar presentes otros microorganismos aunque se tiene que aceptar que el número de vacunas trabajadas por este método, no fue suficiente para tener seguridad razonable de que las vacunas estén libres de Salmonella gallinarum y Salmonella pullorum.

Aún cuando no se demostró la patogenicidad de las bacterias contaminantes, su sola presencia revela un cierto grado, el descuido en los sistemas de producción nacional, y debe ser un acicate para mejorar las técnicas empleadas.

Aún cuando no se comparó una misma cantidad de vacunas por los dos métodos empleados, cuando se usó el método de la Secretaría de los E.U. (2), resultó en un 80% de vacunas contaminadas. En cambio, usando el sistema de filtración, sólo se encontró contaminación en el 45%, lo que puede indicar una menor sensibilidad de este método en la detección de contaminantes.

Se sugiere que este trabajo, en la proximidad, sea comparando ambos métodos con la misma vacuna a trabajar, de preferencia con testigos contaminados artificialmente con Salmonella gallinarum y Salmonella pullorum, para determinar la sensibilidad de los métodos bacteriológicos.

VI.- LITERATURA CITADA.

- 1.- Amoinnon, J.: *Physico-chemical contamination. Societe Usifroid-Boulogne-Brillancourt. Meeting of freeze drying.*: 445-460: Lion, France, 1975.
- 2.- Anónimo, : *Diferential test procedure for detecting Salmonella contaminants in poultry vaccines of chick embryo origin. United States Department of agriculture* 14-0 - 14-9, 1960.
- 3.- Edwards, P.C. and Ewing, W.H.: *Identification of enterobacteriaceae*, 3th. ed. --- Burgess Publishing Company, 1972.
- 4.- Gorrie, C.J.: *Infectious laryngotracheitis vaccination in relation to the transmission of pullorum disease. J. Aus. Vet.*, 20: 343-344 (1944).
- 5.- Harrigan, W.F. and Mc Cance, M.E.: *Métodos de laboratorio en microbiología*, Academia, León, España, 1968.
- 6.- Hejl, J.M. and Faber, J.E.: *Detection of bacterial contaminants in live virus poultry vaccines. Avian Dis.*, 3: 41-50 (1959)
- 7.- Karger, S.B.: *Problems of contamination, exposure and pollution in freeze-drying biological products. International Symposium on Freeze-drying of biological products, Washington, D.S. 201-205, 1976.*
- 8.- Merchant, I.A. y Parker, R.A.: *Bacteriología y viriología veterinaria*, 3a ed., --- Acribia, Zaragoza España. 1970.
- 9.- *National Archive of United States. Publication for office of federal register --- national archive and record service. General Services Administration. 9 C.F.R. --- Code of Federal Regulations 113.27, 1980.*
- 10.- Pomeroy, B.S.: *Fowl typhoid. In Hofstad, M.S.: Diseases of poultry*, 6th ed. The --- Iowa State University Press; Ames, Iowa, 1978.
- 11.- Rodríguez, H.C.: *Situación actual de la campaña contra la Salmonelosis Aviar. --- Aviaroma*, 11, 23: 54-55 (1981)



- 12.- Snoeyenbos, G.H.: Pullorum disease. In Hofstad, M.S.: Diseases of poultry, 7th ed.  
The Iowa State University Press Ames, Iowa, 1978.
- 13.- Williams, J.E.: Bacterial contaminants in poultry live virus vaccines of egg embryo origin. Avian Dis., 1: 105-109 (1957)