

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



**TITULACION DE ANTICUERPOS Y SU DURACION
CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN
POLLOS DE ENGORDA VACUNADOS POR DI-
VERSAS VIAS UTILIZADAS EN MEXICO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:**

**MARIA GUADALUPE ALEJANDRA AGUILERA RIVAS
ASESOR: M.V.Z. JOSE ORTEGA SANCHEZ DE TABLE**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

R E S U M E N

SE REALIZO UNA PRUEBA EN 200 POLLOS DE ENGORDA DIVIDIDOS EN SIETE LOTES DE 20 POLLOS CADA UNO TOMANDO EL RESTO DE ELLOS COMO TESTIGOS Y SE UTILIZARON LAS VIAS, OCULAR, ORAL, AEROGENA, INTRAMUSCULAR Y SUBCUTANEA; DE VACUNACION CONTRA LA ENFERMEDAD DE, NEWCASTLE, CON VIRUS VACUNAL CEPA "LA SOTA", EFECTUANDOSE UNA SOLA APLICACION DURANTE TODA LA VIDA DEL AVE; CON EL OBJETO DE EVALUAR LA EFECTIVIDAD DE CADA UNA DE ESTAS VIAS, ENCONTRANDOSE, QUE AL APLICAR LA VACUNA POR VIA AEROGENA Y POR VIA OCULAR SE OBTIENEN LOS MEJORES RESULTADOS. DE LA MISMA MANERA SE ENCONTRO QUE COMBINANDO VIRUS VIVO, CON VIRUS MUERTO LA PROTECCION CONFERIDA ES MAS EFECTIVA Y DURADERA QUE AL APLICAR VIRUS VIVO UNICAMENTE.

I N D I C E

I.-	INTRODUCCION	PAGINAS
	1.- Aspectos generales de la enfermedad	1-3
	2.- Características del agente etiológico	4-5
	3.- Transmisión	5-6
	4.- Manifestaciones clínicas	6-7
	5.- Diagnóstico serológico	7
	6.- Inmunidad	8-9
	7.- Inmunoprofilaxis	9-13
II.-	OBJETIVO	14
III.-	MATERIAL Y METODOS	
	1.- Vías de Inoculación	15
	a).- Material	15
	b).- Métodos	16-17
	2.- Inhibición de la hemoaglutinación	
	a).- Material	18
	b).- Equipo	18
	c).- Procedimiento	18-19
	3.- Obtención del antígeno	
	a).- Material	20
	b).- Equipo	20
	c).- Procedimiento	21
	4.- Titulación de la vacuna	
	a).- Material	22
	b).- Equipo	22
	c).- Procedimiento	22-23

	PAGINAS
5.- Preparación de los globulos rojos	24
a).- Material	
b).- Procedimiento	
6.- Preparación de la Solución Salina Fosfatada (P.B.S.)	25
a).- Material	
IV.- RESULTADOS	26-42
V.- DISCUSION	43-46
VI.- CONCLUSIONES	47-48
VII.- BIBLIOGRAFIA	49

I I N T R O D U C C I O N

1.- ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD

La Enfermedad de Newcastle ha sido y es uno de los problemas de salud de mayor importancia en la industria avícola mexicana.

El Newcastle es una enfermedad infecciosa, altamente transmisible y destructiva que afecta principalmente al pollo, gallina y guajolote, además son susceptibles en mayor o menor grado otras aves domésticas y silvestres, así como ciertos mamíferos incluyendo al hombre (en el que puede provocar afecciones oculares y cefalea intensa).

(12,16,19,23,30)

Fue reportada por primera vez en 1926 por Kraneveld, el cual dio noticias de una infección altamente difusible y mortal. En 1927 Doyle -- observó una enfermedad semejante en Newcastle-Inglaterra y demostró -- que se trataba de un padecimiento distinto a la Peste Aviar.

(23,30,40)

La presencia de la enfermedad de Newcastle en México, tiene sus orígenes en los primeros años de la década de los cuarenta (Olvera-Velázquez). (19,27,30,40)

El desarrollo acelerado de la Avicultura en México, ha sido constantemente interrumpido, debido a la elevada incidencia y severidad de los brotes de la Enfermedad de Newcastle. (9,12,19,30)

La importancia de esta enfermedad radica principalmente en las graves pérdidas económicas causadas por:

- a).- El deterioro en la calidad de los productos terminados.
- b).- Bajas en los promedios de postura y engorda.
- c).- La mortalidad y morbilidad tan elevada que causa este padecimiento.

(2,12,16,19)

Desde que la Enfermedad de Newcastle fue identificada, se ha intentado su control por dos métodos básicos:

- a).- Sacrificio de las aves afectadas y sospechosas con objeto de erradicar la enfermedad.
- b).- Por vacunación de las aves, con el fin de evitar la aparición de la enfermedad en los países en los que la erradicación por sacrificio no es posible, ya que éste solo se puede efectuar en aquellos países en los que la enfermedad es de reciente introducción el área afectada es limitada y las condiciones socio-económicas son favorables. (30,19)

Debido a esto la mayoría de los países donde la enfermedad de Newcastle es enzoótica como México, han adoptado la vacunación como el método básico para su control.

Se ha comprobado que existen multitud de factores que determinan la forma de presentación de la enfermedad, siendo los más importantes:

- 1o.- La cepa viral
- 2o.- El estado inmunológico de la parvada

30.- Stress

(29,16,30,40)

La enfermedad de Newcastle se presenta frecuentemente en nuestro país en los estados que tienen mayor densidad de población avícola como se puede apreciar en el siguiente cuadro:

DISTRIBUCION DE POLLO DE ENGORDA EN LA REPUBLICA MEXICANA

ZONA	E S T A D O S	NUMERO DE AVES (MILES)	%
VALLE DE MEXICO	MEXICO, MORELOS, D.F.	90,698	25.25
CENTRO	QUERETARO, MICHOACAN, HIDALGO, S.L.P.*, GUANAJUATO*, AGUASCALIENTES	55,670	15.50
NOROESTE	SONORA, SINALOA, CHIHUAHUA, B.C.N., B.C.S.	26,323	7.34
NORTE	NUEVO LEON, COAHUILA, DURANGO, TAMAULIPAS, ZACATECAS	53,018	14.76
CENTRO-SUR	PUEBLA, TLAXCALA	11,422	3.18
SURESTE	YUCATAN*, TABASCO, VERACRUZ*, CHIAPAS, OAXACA, CAMPECHE, QUINTANA ROO.	64,825	18.05
PACIFICO	JALISCO, GUERRERO, COLIMA, NAYARIT	57,192	15.92
	T O T A L	359,200	100.00

* ENTIDADES DONDE SE REGISTRARA EL MAYOR INCREMENTO DE PRODUCCION PARA 1982

FUENTE: UNION NACIONAL DE AVICULTORES 1982

2.- CARACTERISTICAS DEL AGENTE ETIOLOGICO

El agente infeccioso causal de la enfermedad es un virus clasificado dentro de los paramixovirus, de forma más o menos esferoidea. Las partículas típicas del virus tienen de 100 a 300 milimicrones de diámetro.

Es un virus envuelto y en su envoltura tiene la franja de mixovirus--compuesta de hemoaglutinina y proteína neuraminidásica; tiene por lo tanto actividad hemoaglutinante, aunque no aglutina los glóbulos rojos de todas las especies, esta actividad es inhibida por el suero de animales que han pasado la infección ó tenido contacto con el virus. Bajo las proyecciones sobre la envoltura tiene un estrato de lípidos-- y con el uso de solventes de lípidos se disuelve este estrato y se altera el virión.

La resistencia del agente etiológico a las bajas temperaturas es importante ya que se puede conservar infectante durante casi un año en aves congeladas a -20°C . Si animales como: perros, cerdos, gatos o ratas ingieren tales aves o sus despojos, eliminan el virus durante 2 o 3 días sin padecer la enfermedad pudiendo infectar a otras aves.

El período de supervivencia del virus es menor conforme aumentan las temperaturas y casi toda las variedades quedan totalmente inactivadas al cabo de 30 minutos de incubación a 60°C .

El virus se inactiva fácilmente con formalina, alcohol, merthiolate, solventes lipídicos y lisol. (1,10,12,17,23,32,40,45,46)

Se han diferenciado varios tipos de cepas:

A).- Velogénicas.- matan el embrión entre 12 y 48 horas

B).- Mesogénicas.- matan el embrión entre 48 y 96 horas

C).- Lentogénicas.- matan el embrión en 96 horas o no lo matan
(9,12,23,30)

3.- TRANSMISION

Hay condiciones que favorecen la presentación de la enfermedad de Newcastle como:

- a).- La existencia de varias granjas cercanas entre sí, sobre todo si en ellas hay deficiencias en su manejo.
- b).- Si tienen programas preventivos inadecuados.
- c).- Si utilizan sistemas de explotación rotacional

La enfermedad de Newcastle tiene un alto grado de diseminación y los vectores responsables de ella se pueden agrupar en agentes mecánicos y biológicos.

Biológicos:

Cadáveres contaminados, aves portadoras, pollitos de importación y toda clase de aves y productos avícolas como la harina de carne. Tráfico de animales vivos de áreas importadas, animales enfermos que los eliminen por medio de deyecciones, seresiones nasales y oculares etc.

Mecánicos:

Todos los objetos con los que hayan tenido contacto las aves enfermas deben considerarse como transmisores de la enfermedad de Newcastle, tales como: las jaulas de captura y transporte, los despojos de la matanza, las plumas, cartones, bandejas de huevo, vehículos, pienso y agua contaminada.

El hombre puede actuar como portador de la enfermedad con la ropa de trabajo, zapatos sucios de excretas, etc.

Se ha demostrado que el aire puede difundir la enfermedad tanto en -- explotaciones al aire libre como en explotaciones en ambiente cerrado (2,12,23,27).

4.- MANIFESTACIONES CLINICAS

La enfermedad tiene tres manifestaciones clínicas:

A).- Respiratoria

B).- Digestiva

C).- Nerviosa

Los trastornos que provoca son los siguientes, según la presentación de la enfermedad:

El tipo Hitchner.- Produce infecciones respiratorias suaves e inaparentes, las cepas lentogénicas forman parte de este tipo de virus y son utilizadas para producir vacunas de virus vivos, algunas de estas cepas son la "B₁", "La Sota" y "Clone 30".

El tipo Beaudette.- Produce infecciones respiratorias más severas que las del tipo Hitchner es letal en pollitos, dentro de este tipo de virus se encuentran las cepas vacunales mesogénicas como: la "Roakin" y la "MV-107", aunque en México han sido poco utilizadas.

El tipo Beach.- Provoca signos respiratorios y nerviosos en aves de cualquier edad, así como lesiones hemorrágicas en el proventrículo. Es producida por cepas velogénicas como la "GB", "Texas", y "California 1914", que con frecuencia son utilizadas para la producción de vacunas a virus muerto.

El tipo Boyle.- Es usualmente agudo y letal para cualquier edad, dentro de este tipo de virus se encuentran cepas velogénicas viscerotrópicas, de las cuales en México existen varias y algunas de ellas son la "Ixtapalapa", la "Querétaro", la "C.U." y la "Chimalhuacán".

(9,12,16,19,23,30,46)

5.- DIAGNOSTICO SEROLOGICO

Inhibición de la hemoaglutinación.- Esta prueba nos permite diagnosticar con rapidez una serie de enfermedades causadas por virus, las cuales debido al tamaño del antígeno no se pueden diagnosticar por aglutinación directa. La prueba se fundamenta en el fenómeno que demuestran varios virus de unirse a receptores en los glóbulos rojos y causar su aglutinación; este no es un fenómeno inmunológico, sino más bien representa una actividad enzimática por parte del microorganismo que permite su adherencia a las células lo que conduce posteriormente a su penetración (a este fenómeno se le denomina hemoaglutinación). - Los anticuerpos específicos contra estos microorganismos pueden impedir que esta reacción enzimática se lleve a cabo probablemente por que se unen a los sitios activos de la enzima o al sitio de producción de ésta en el microorganismo, (a este fenómeno se le denomina Inhibición de la Hemoaglutinación). Cabe señalar que el virus de Newcastle aglutina glóbulos rojos fácilmente y que se utilizó la prueba antes mencionada ya que a través de ella se puede conocer el título de anticuerpos rápidamente. (1,6,10,17,18,35,40,41,42).

6.- INMUNIDAD

La medicina preventiva maneja procedimientos inespecíficos y específicos tendientes a evitar las enfermedades o a reducir su severidad. -- La vacunación es un recurso específico preventivo del cual podemos -- disponer en forma exitosa para proteger a las aves contra la Enfermedad de Newcastle.

La vacunación es la inoculación de una sustancia biológica específica (antígeno) que provoca una respuesta de inmunidad en un ser vivo estimulando la formación de anticuerpos específicos a un agente infeccioso determinado, aumentando así su resistencia a la enfermedad y reduciendo grandemente los riesgos de contraerla. (18,35,51,34,42).

La inmunidad de las aves contra la enfermedad de Newcastle, lograda a través de la vacunación previene contra pérdidas en la producción que son provocadas por este padecimiento.

Para lograr una inmunidad óptima por medio de la vacunación se deben tener en consideración factores relacionados con el huésped (que en este caso son las aves) como son: la densidad de población, la alimentación, las condiciones de higiene en las casetas, etc. Además de -- factores relacionados con la vacuna como el manejo adecuado de la misma, que evite su contaminación o su inactivación, la vigencia de su actividad, la dosificación adecuada etc.; factores todos que contribuyen a lograr un resultado benéfico en la protección buscada para las aves contra la Enfermedad de Newcastle.

Rara vez se llenan estas condiciones, pero a pesar de ello se puede obtener resultados positivos (16,34,49)

Trabajos previos al presente sugieren que la edad de vacunación es -- un factor importante para obtener una buena respuesta inmunológica. Al medir los títulos de anticuerpos, se obtuvo mayor respuesta cuando las aves tenían menor nivel de anticuerpos maternos. Al evaluar la -- protección materna de las aves contra la enfermedad de Newcastle se -- ha demostrado que pueden tener anticuerpos hasta los 21 días de edad -- e inclusive se pueden encontrar hasta los 42 días de edad cuando -- provienen de progenitoras que tienen un elevado nivel inmunológico. (2,21,37,40).

7.-INMUNOPROFILAXIS

Las vías más comunmente empleadas en México de vacunación contra la -- Enfermedad de Newcastle son:

- 1.- Respiratoria con aerosoles (por aspersión)
- 2.- Intramuscular (parenteral)
- 3.- Ocular e intranasal (por instilación)
- 4.- Oral (enteral por el agua de bebida)
- 5.- Subcutánea emulsionada (parenteral).

Vacunación por aspersión

Ventajas:

Confiere máxima protección

Sencilla y rápida de aplicar

Bajo costo de vacunación

Reducción de la dosis vacunal.

Puede ser empleada en diversos tipos de explotación.

Puede ser empleada a diferentes edades después de haber utilizado otra vía

Confiere interferencia (es de gran utilidad para control de brotes).

Puede vacunarse rápidamente utilizando poco personal.

Reduce el stress por vacunación. (ya que evita el manejo individual, amontonamientos, muertes por asfixia).

Utiliza una vía de entrada natural del virus.

Desventajas:

Reacciones post-vacunales más enérgicas.

En presencia de otros problemas respiratorios no protege e incluso -- puede agravarlos

Solo mediante una correcta aplicación de la vacuna se puede contar un elevado porcentaje de aves inmunizadas.

Requiere de un muy cuidadoso manejo ya que es fácilmente contaminable

No es controlable con exactitud su distribución ya que las dosis que los animales reciben no son exactamente iguales por lo que se observan reacciones anormales en los que reciben dosis insuficientes.

Esta vacunación tiene que hacerse bajo condiciones controladas de temperatura, de humedad atmosférica y de movimiento del aire, factores -- todos que modifican el tamaño de la gota de aspersión y que limitan -- su uso. (1,14,15,17,26,35,37,39)

Vacunación Intramuscular.

Ventajas:

Individual (dosis completas y adecuadas).

Da buenos títulos de inmunidad humoral.

Desventajas:

Mayor tiempo de aplicación

La duración de la inmunidad es corta

Implica un mayor manejo a las aves (aumento de stress)

Tiene poca estabilidad termo físico-química.

Puede contaminarse fácilmente con otros agentes.

Hay reducción de consumo de agua y alimento por el manejo.

Costo de operarios

(1,8,17,26,39)

Vacunación Ocular e Intranasal

Ventajas:

Fácil aplicación

Mayor seguridad por aplicación individual cuando se hace correctamente

Interferencia al virus de campo. (eleva rápidamente los títulos).

Es una vía de entrada natural.

Desventajas:

Produce reacciones post-vacunales (aunque no muy enérgicas).

Contaminación frecuente de las vacunas.

Poca estabilidad termo físico-química.

En presencia de problemas respiratorios no protege adecuadamente

Aumento de stress por mayor manejo

Reducción de consumos de alimento y agua

Predisposición a otras enfermedades.

(1,2,14,15,17,28,35)

Vacunación oral

Ventajas:

Es fácil y rápida en su aplicación (resulta más económico vacunar así ya que se requiere de mínimo personal).

Reacción post-vacunal moderada.

Reducción de stress.

No se afectan los consumos de alimento en forma significativa.

Desventajas:

Hay riesgo de que no todas las aves consuman la dosis adecuada.

Se inactiva la vacuna en corto tiempo si no es consumida.

En bebederos de bote el ión zinc bloquea la neuraminidasa del virus - imposibilitando su adsorción a la célula.

Se requiere tener cuidado de manejo en su aplicación como cambio de bebederos, y adición de protectores virales (leche).

El virus, es inactivado por los desinfectantes, impurezas del agua y los iones que neutralizan su actividad.

El tracto digestivo no es la ruta adecuada para la administración de la vacuna ya que al ser consumida con celeridad después del ayuno de agua, esta es destruida en parte por los ácidos en el preentrículo - y por las sales biliares en el intestino.

(1,4,17,22,24,26,37,43).

Vacunación Subcutánea

Vacuna inactivada emulsionada con aceites minerales.

Ventajas:

Produce alta protección humoral.

Disminuye la posibilidad de contaminantes que pueden producir problemas por estar adicionada con inactivantes y preservativos.

Su aplicación aún con problemas respiratorios de otra índole da buenos resultados.

Da más confiabilidad en la homogénea inmunidad de la parvada por ser individual.

Al estar emulsionada nos da una protección del antígeno vacunal más eficaz ya que los macrófagos y anticuerpos no neutralizan en un corto lapso de tiempo toda la masa antigénica de la dosis.

Desventajas:

Dificultad en su aplicación (viscosidad)

Mayor costo de obra. (1,14,17,22,26,28,37,44).

I I OBJETIVO

LA FINALIDAD DEL PRESENTE TRABAJO ES DETERMINAR -
CUAL DE LAS DIFERENTES VIAS DE VACUNACION, UTILI-
ZADAS CON MAYOR FRECUENCIA EN MEXICO, PROPORCIO--
NAN AL AVE UNA INMUNIDAD MAS ELEVADA Y DURADERA;--
CONSIDERANDO LAS VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE CADA -
UNA DE LAS VIAS UTILIZADAS. TOMANDO COMO BASE LA
TECNICA DE TITULACION DE ANTICUERPOS.

III MATERIAL Y METODOS

1.- VIAS DE INOCULACION

Las vías de vacunación que se utilizaron para este trabajo fueron las siguientes:

- a).- Ocular (instilación)
- b).- Oral (agua de bebida)
- c).- Aerosoles (aspersión)
- d).- Intramuscular
- e).- Subcutánea (Emulsionada)
- f).- Intramuscular simultánea con Ocular
- g).- Ocular simultánea con Subcutánea

A).- MATERIAL:

- a).- 200 pollos de engorda de una semana de edad.
- b).- Vacuna virus vivo, producto comercial liofilizado (preparado con virus de Newcastle cepa "La Sota") en huevos S.P.F. con un título de $10^{8.5}$ D_{IE} 50/ml.
- c).- Vacuna virus inactivado emulsionado en aceite (cepa "La Sota"),- producto comercial preparado en líquidos Amnio-Alantoideos de embriones de pollo conteniendo cepa "La Sota", inactivado con formalina y emulsionado con aceite mineral y Arlacel con un título de $10^{8.7}$ D_{IE} 50/ml.

b).- M E T O D O S :

Fase I: Se contó con un lote de 200 pollos, que se dividieron en secciones de 20 pollos cada una, en cada sección se utilizó una vía de vacunación diferente.

El lote quedó distribuido de la siguiente forma:

Ocular	(20)
Oral	(20)
Aerosol	(20)
Intramuscular	(20)
Subcutánea (emulsionada)	(20)
Intramuscular simultánea con la Ocular	(20)
Ocular simultánea con Subcutánea	(20)
Testigos	(60)

Fase 2: Se sangraron las aves al cumplir tres semanas de edad y se realizó la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación por el método Beta, para conocer cuantitativamente el grado de inmunidad materna que tenían las aves al inicio de la prueba; al día siguiente de tomada la muestra de sangre, se procedió a vacunar a las aves por secciones.

Después de la vacunación se tomaron muestras sanguíneas semanales, con el objeto de obtener suero para observar la producción de anticuerpos circulantes contra la enfermedad de Newcastle por medio de la Inhibición de la Hemoaglutinación hasta que las aves cumplieron nueve semanas de edad.

Se sangraron todas las aves incluyendo el lote testigo.

Fase 3.-Se procedió a realizar el análisis estadístico de los resultados utilizando las técnicas de Análisis de Varianza y D.M.S.- (Diferencia Mínima Significativa). Se le dió valor logarítmico a cada uno de los títulos de anticuerpos obtenidos.

Los títulos y sus equivalentes en logarítmicos son:

1/20 --- Log. 1

1/40 --- Log. 2

1/80 --- Log. 3

1/160 -- Log. 4

1/320 -- Log. 5

1/640 -- Log. 6

1/1280 - Log. 7

Nota: Para la realización del presente trabajo se trató de evaluar el nivel de anticuerpos conferido por la vacuna contra la enfermedad de Newcastle, aplicada por diferentes vías de inoculación - contando con aves libres de anticuerpos maternos (por lo que -- se trabajó a partir de que las aves cumplierón tres semanas de edad. Comprobando que carecían totalmente de anticuerpos),

2.- INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION

A).- MATERIAL:

- a).- Glóbulos rojos al .75%
- b).- Virus a 10 U hemoaglutinantes
- c).- Solución Salina Fosfatada
- d).- Suero sospechoso

B).- EQUIPO:

- a).- Placas con capacidad para doce sueros (Lab. Helena).
- b).- Quickpette calibrado a 50 microlitros (Lab. Helena).
- c).- Microtiter calibrado a .05 ml. (Lab. Cooke).
- d).- Microdiluters con capacidad de .5ml. (Lab. Cooke)
- e).- Mango multi microdilutor (Lab. Cooke).
- f).- Plate searlers (Lab. Cooke)
- g).- Puntas desechables para 50 a 250 microlitros (Lab. H.)
- h).- GO/ NO/ GO tester (Lab. Cooke)
- i).- Probetas
- j).- Pipetas
- k).- Vasos de precipitados

C).- PROCEDIMIENTO:

- a).- Colocar .05 ml. de suero en la línea número uno en la placa
- b).- Colocar .05 ml. de la 2a. línea a todas las demás.
- c).- Diluir partiendo de donde se colocó el suero
- d).- Dejar reposar por espacio de media hora

e).- Colocar glóbulos rojos a todo incluyendo los controles.

f).- Tapar y mantener a 4°C durante media hora

g).- Hacer la lectura

Nota: Debe tenerse un control de virus y un control de glóbulos rojos con Solución Salina Fosfatada.

Nota 2: Modificaciones en la técnica

Se utilizarón glóbulos rojos al .75% ya que las placas tienen las copillas con fondo en U y no en forma de V por lo que con una concentración mayor de glóbulos rojos se puede observar mejor la precipitación de los mismos.

La temperatura de 4°C fue utilizada ya que puede hacerse la lectura en un menor tiempo (MVZ Jesús Dávila Palmieri comunicación personal).

(1,3,6,7,33,40,41)

3.- OBTENCION DEL ANTIGENO

A).- MATERIAL:

- a).- Embriones de pollo de 9 a 11 días de edad (incubar 5 días - en la estufa). S.P.F.
- b).- Caldo nutritivo
- c).- Vacuna (la que se va a diluir).
- d).- Yodo (para limpiar la cámara)
- e).- Glóbulos rojos al 3%.

B).- EQUIPO:

- a).- Pipetas (Estéril)
- b).- Perforador de embriones. (Estéril)
- c).- Aguja y jeringa (Estéril)
- d).- Lápiz graso para marcar
- e).- Cera para sellar
- f).- Ovoscopio
- g).- Vidrio para coleccionar gotas
- h).- Matraz (Estéril)
- i).- Pipeta Pasteur (Estéril)
- j).- Agitadores
- k).- Frascos (Estéril)
- l).- Refrigerador

C).- PROCEDIMIENTOS

- a).- Restituir la vacuna de virus vivo cepa "La Sota"
- b).- Inocular embriones de pollo con .2ml. a través de la membrana corioalantoidea. (el embrión debe tener de 9 a 11 días de edad)
- c).- Incubar durante 72 horas (y revisar periódicamente para desechar los muertos).
- d).- Colectar el líquido alantoideo
- e).- Se procede a aglutinar porciones de este líquido alantoideo (una gota de líquido + una gota de glóbulos rojos al 3%) se toma el que aglutine como (+). (se mete a congelar)

Nota: No volver a congelar después de haber descongelado sino mantenerlo a temperatura constante)

(MVZ Jesús Dávila Palmieri comunicación personal).

(1,3,6,7,33,42).

4.- TITULACION DE LA VACUNA

A).- MATERIAL:

- a).- Antígeno (virus congelado)
- b).- Glóbulos rojos al .75%
- c).- Solución Salina Fosfatada

B).- EQUIPO:

- a).- Placas
- b).- Microdilutor
- c).- Mango
- d).- Pipetas calibradas
- e).- Puntas desechables

C).- PROCEDIMIENTO:

Se hace la dilución y ahí mismo en la placa se titula. Vacuna emulsionada inocular 2 ml. a cada embrión, incubar a 37°C durante 72 horas.

Refregerar mínimo 2 horas y colectar el líquido

Hacer la prueba y buscar los positivos .

DILUCION	DILUENTE (PBS)	VIRUS	G.R.
1:10	.05	.05	.05
1:20	"	"	"
1:40	"	"	"
1:80	"	"	"
1:160	"	"	"
1:320	"	"	"
1:640	"	"	"
1:1280	"	"	"
1:2560	"	"	"

Dejar reposar durante 30 minutos y hacer la lectura.

Control 1: Gr. al .75% (poner .05 + .05 de P.B.S.)
debe dar sedimentación

Control 2: Ag. .05 + g.r. .05 debe dar aglutinación.

La última aglutinación que se observa es el título del virus.

Para el desarrollo de esta prueba se utilizó un título de 1:1280

Se divide a las unidades que se requieren $160/10=16$.

15 ml. de P.B.S. y 1 ml. de virus es igual a 10 UHA.

Los líquidos positivos centrifugados a 1500 RPM.

durante 20 min. tirar el sedimento y agregar formol al .1% Incubar 24 horas a 37°C

Glicerinar al 25% (75 ml. de líquido más 25 ml. de glicerina estéril) se mezcla y se ponen ampollitas de 1 a 2 ml. y se almacena en congelación a -20°C.

(1,3,7,10,33,42)

5.- PREPARACION DE LOS GLOBULOS ROJOS

A).- MATERIAL:

- a).- Pollos para la obtención de sangre
- b).- Jeringa con aguja
- c).- Citrato de Na al 1%
- d).- Tubos de centrifuga
- e).- Centífuga
- f).- P.B.S.
- g).- Pipetas
- h).- Probetas
- i).- Matraz
- j).- Tubos de Hopkings

B).- PROCEDIMIENTO:

- a).- 1 cm. de citrato de sodio al 1% por 3 cms. de sangre. lavarlos tres veces y ponerlos - al 3% (centrifugar a 1500 RPM y leer el resultado. (el tubo debe marcar el tres para que este correcto)
- b).- Para llevarlo al .75% se hace por regla de tres
$$\begin{array}{l} .75 - 100 \\ .03 - X = 4 \end{array}$$
Por lo tanto 1 ml. de G.R. más tres de P.B.S. esto da el volúmen final de 4 y este ya queda al .75%
(1,6,7,10,33,35)

6.- PREPARACION DE LA SOLUCION SALINA FOSFATADA (P.B.S.)

A).- MATERIAL (Para preparar un litro)

-Cloruro de Sodio químicamente puro	8.5 grs.
-Fosfato disódico anhidro ó	1.42grs.
Fosfato disódico heptahidratado	2.68grs.
-Fosfato monopotásico	0.28grs.
-Agua destilada, C.B.P.	1 Litro

(1,6,7,10,33)

IV R E S U L T A D O S

Analizando estadísticamente la respuesta por semana, a la vacuna contra la enfermedad de Newcastle cepa "La Sota", aplicada por las vías anteriormente mencionadas, se obtuvieron los siguientes resultados:

En la primera semana no se obtuvo respuesta ya que fue cuando se vacunaron las aves. En la segunda semana se dividió la respuesta en tres grupos: (Figs. I, IX, X)

En el primer grupo se encuentran las vías ocular + subcutánea y ocular + intramuscular; la vía con la que se obtuvo el mayor título fue la ocular + subcutánea, que dió una respuesta 68.9% mayor a la obtenida con el lote testigo, siendo estadísticamente similar ($P < 0.05$) la respuesta obtenida con la vía oculo-nasal + intramuscular 66.6%.

En el segundo grupo se encuentran las vías ocular, aerógena, oral e intramuscular, que dieron una respuesta similar entre sí, ($P < 0.05$). Siendo la mayor respuesta la de la vía ocular con 57.19%.

En el tercer grupo se encuentra la vía, subcutánea que dió la respuesta mínima con respecto a las demás vías utilizadas, siendo solamente 30.55% mayor en relación con el lote testigo ($P < 0.05$.)

En la tercera semana la respuesta estuvo dividida en cuatro grupos: --
En el 1er. grupo se encuentran las vías ocular + subcutánea y aeróge--
na. En el segundo grupo se encuentran las vías ocular + intramuscu---
lar, ocular y oral. Estos dos grupos dieron buena respuesta muy simi--
lar entre sí, siendo la más significativa la de la vía ocular más sub-
cutánea 64.13% mayor que la obtenida con el lote testigo.

En el tercer grupo esta la vía subcutánea que dio una respuesta de --
mediana significancia estadística 49.88% mayor que el lote testigo.

En el cuarto grupo se encuentra la vía intramuscular que aunque dio --
la respuesta mas baja con respecto a las otras vías utilizadas fue --
27.20% mayor que la obtenida con el lote testigo. (Figs. I, IX, X).

En la cuarta semana la respuesta se dividió en tres grupos:

En el primer grupo se encuentra la vía ocular + subcutánea con la que--
se obtuvo el mayor título en esta semana, teniendo 44.85% mayor al del
lote testigo.

En el segundo grupo se encuentran las vías: aerógena, oral, subcutá--
nea, ocular y ocular + intramuscular. La vía con la que se obtuvo la-

mayor respuesta en este grupo fué la aerógena 39.18% mayor que el lote testigo.

En el tercer grupo está la vfa intramuscular que fue la que dio la -- menor respuesta con respecto a las demás vfas utilizadas ($P < 0.05$). -- (Figs. I, IX, X)

En la quinta semana se dividió la respuesta en tres grupos:

En el primero estan las vfas subcutánea, aerógena, oral y ocular que dieron respuestas similares entre sí, siendo la más alta la obtenida por la vfa subcutánea 47.20% mayor al lote testigo.

En el segundo se encuentra la vfa ocular + intramuscular que dio una respuesta moderada, siendo 26.49% mayor que el lote testigo.

En el tercer grupo se encuentra la vfa intramuscular que dio la menor respuesta en comparación con las otras vfas utilizadas aunque fue -- 21.60% mayor a la obtenida con el lote testigo (Figs. I, IX, X, \)

En la sexta semana se dividió la respuesta en tres grupos:

En el primer grupo esta la ocular + subcutánea, aerógena y subcutánea; Siendo la vfa de mayor significancia la ocular + subcutánea con ---- 73.68% mayor en comparación al lote testigo.

Las vías subcutánea y aerógena dieron una respuesta similar entre sí con 70.64% y 67.52% respectivamente, en relación al lote testigo.

En el segundo grupo están las vías ocular + intramuscular, oral y --- ocular que dieron respuesta moderada, siendo la más alta la obtenida con la vía ocular + intramuscular con 67.48% mayor al testigo.

En el tercer grupo se encuentra la vía intramuscular con la que se -- obtuvo la menor respuesta con respecto a las otras vías utilizadas, -- aunque se obtuvo un porcentaje de 58.86 mayor al del lote testigo. (Figs. I, IX, X)

La respuesta obtenida en el transcurso de la vida del ave, con las - diferentes vías utilizadas, fue la siguiente:

V I A	%
Ocular + Subcutánea	58.91
Aerógena	54.66
Intramuscular + Ocular	50.71
Oral	49.45
Subcutánea	49.19
Oculo-Nasal	49.10
Intramuscular	38.52

Puede apreciarse que de las vfas combinadas, la ocular (virus vivo) - + SC (virus muerto) 58.91% fue más eficiente que la vfa I.M. (virus - vivo) + ocular (virus vivo) 50.71% (Figs. I,II,VII,X)

De las vfas simples utilizadas, la que demostró ser más efectiva fué la aerógena 54.66% y la menos efectiva la intramuscular 38.52% (Figs. I,III,VII,X)

Estos porcentajes son obtenidos con respecto a la respuesta del lote-testigo.

NOTA: Para la obtención de los resultados se utilizarón las técnicas de análisis de varianza y DMS (Diferencia Mínima Significativa) - ($P < 0.05$) .

FIG. 1. TITULOS DE ANTICUERPOS OBTENIDOS POR LA TECNICA DE IHA EN POLLOS DE ENGORDA VACUNADOS CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE CEPA "LA SOTA" POR DIFERENTES VIAS DE VACUNACION UTILIZADAS EN MEXICO

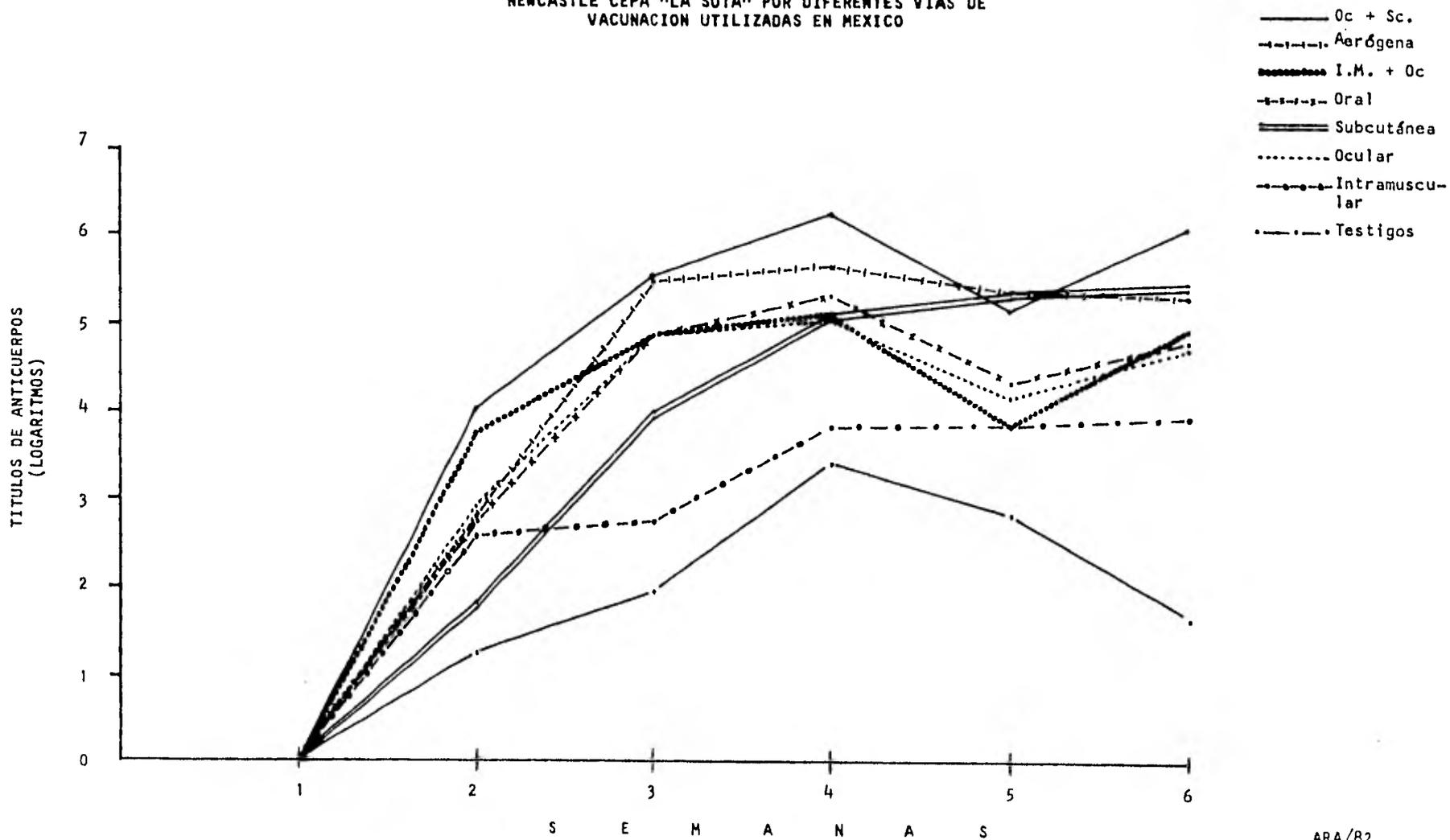


FIG. II. TITULOS DE ANTICUERPOS OBTENIDOS CON LA APLICACION DE LA VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE CEPA "LA SOTA" POR VIA SUBCUTANEA SIMULTANEA CON LA VIA DCULAR EN POLLOS DE ENGORDA

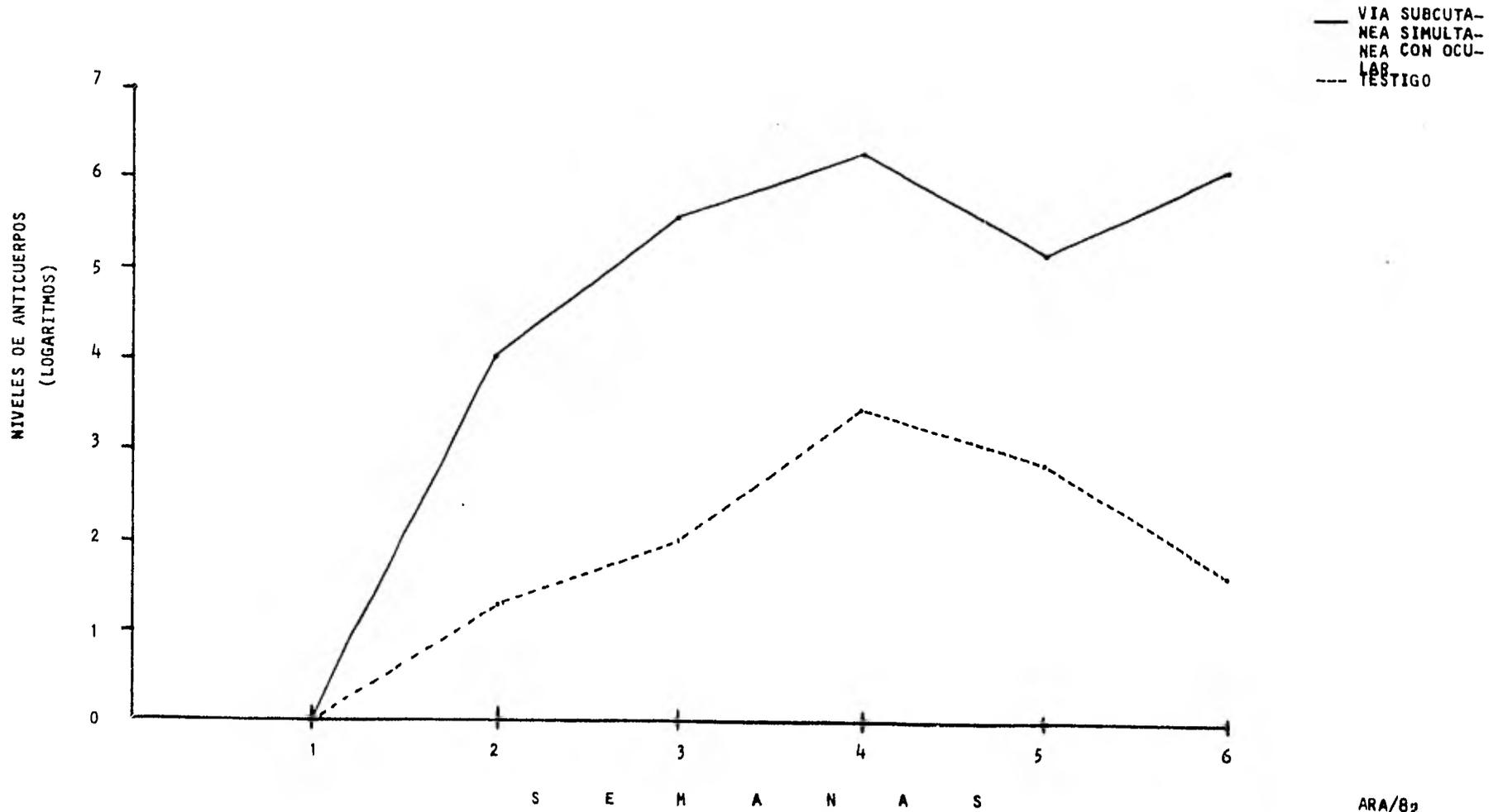


FIG. III TITULOS DE ANTICUERPOS OBTENIDOS CON LA APLICACION VIA AEROGENA DE LA VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE CEPA "LA SOTA" (VIRUS VIVO) EN POLLOS DE ENGORDA

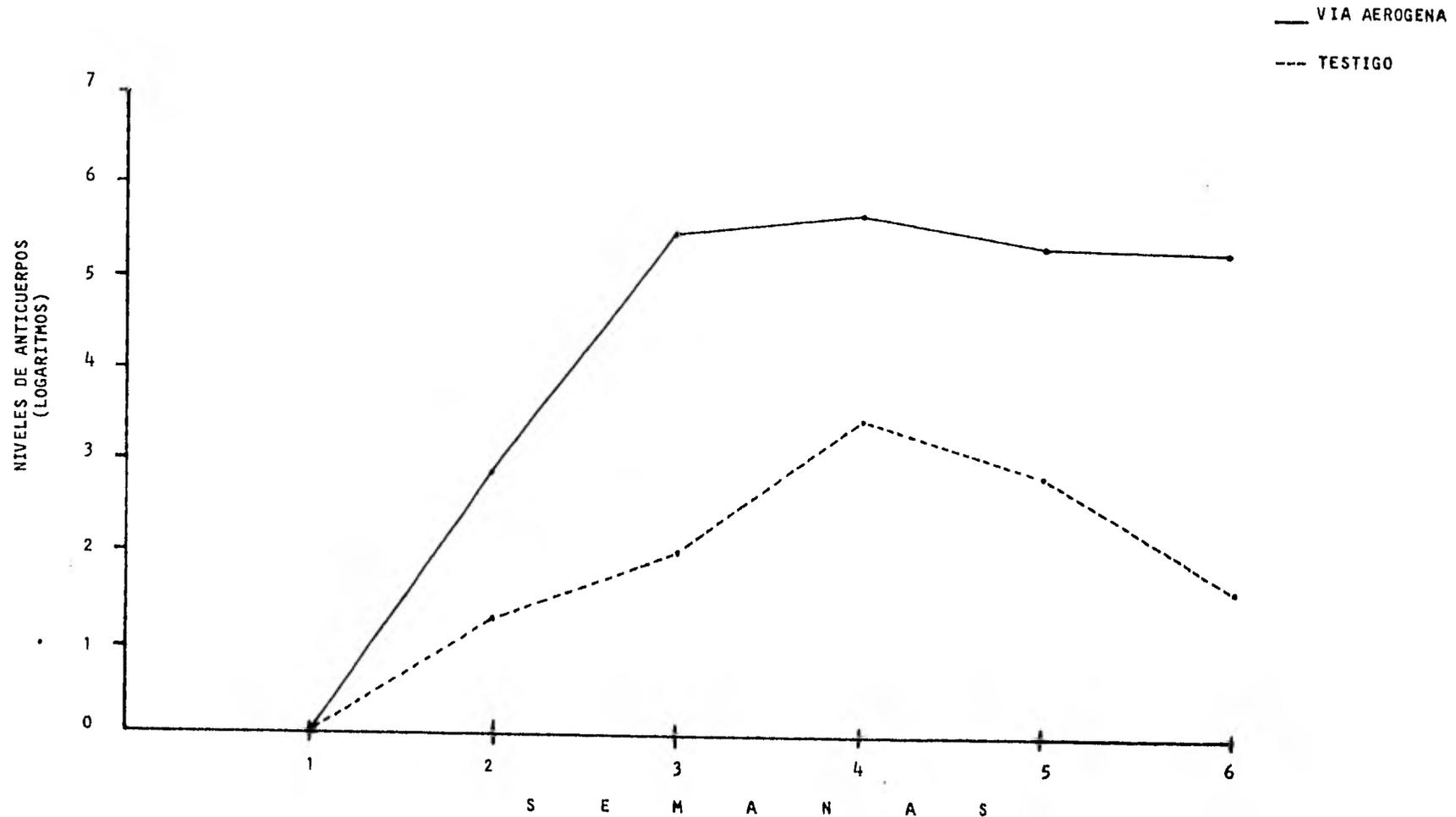


FIG. IV. TITULOS DE ANTICUERPOS OBTENIDOS CON LA APLICACION VIA ORAL DE LA VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE CEPA "LA SOTA" (VIRUS VIVO) EN POLLOS DE ENGOROA

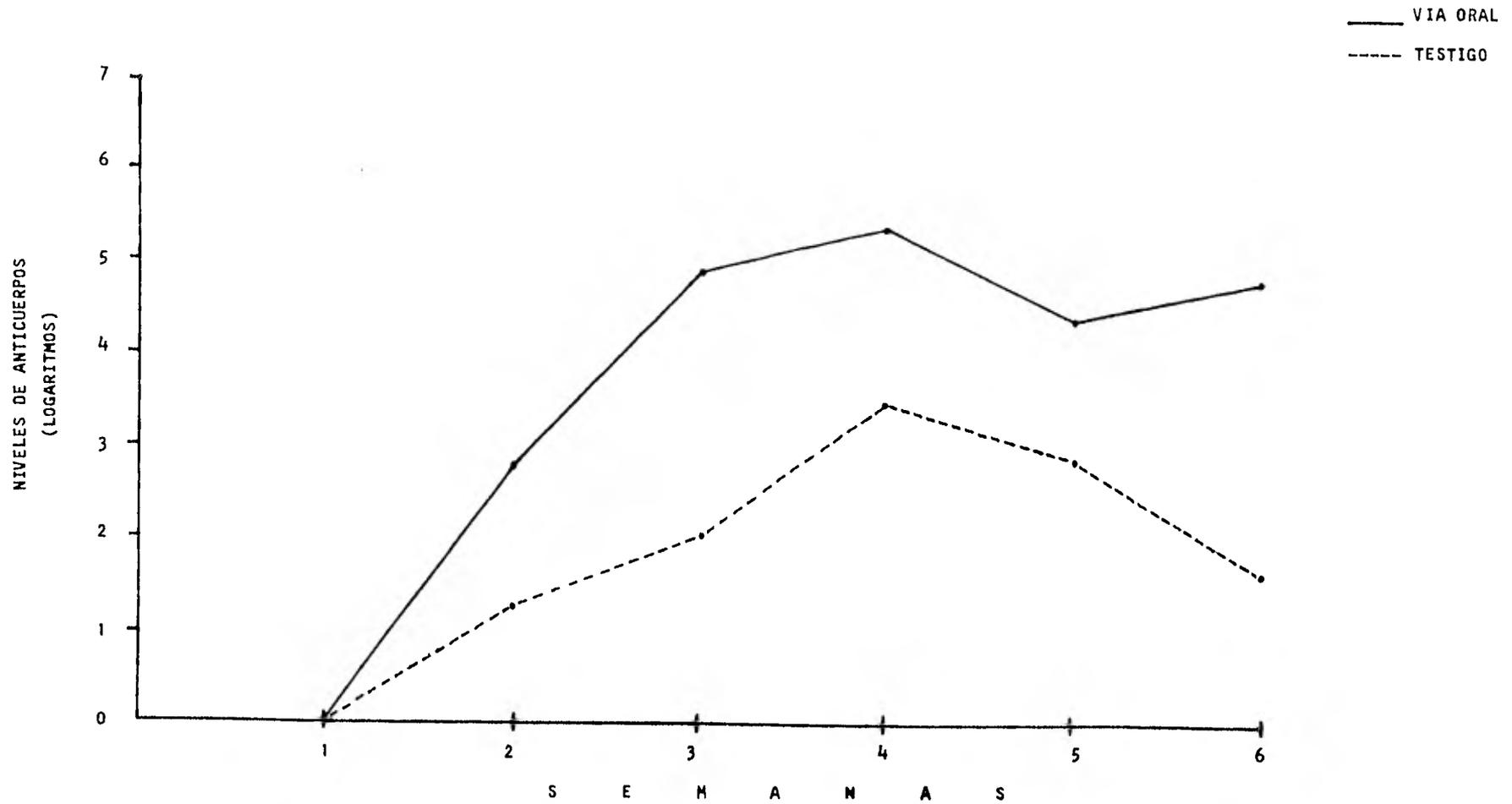


FIG. V. TITULOS DE ANTICUERPOS OBTENIDOS CON LA APLICACION VIA OCULAR DE LA VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE CEPA "LA SDTA" (VIRUS VIVO) EN POLLOS DE ENGORDA

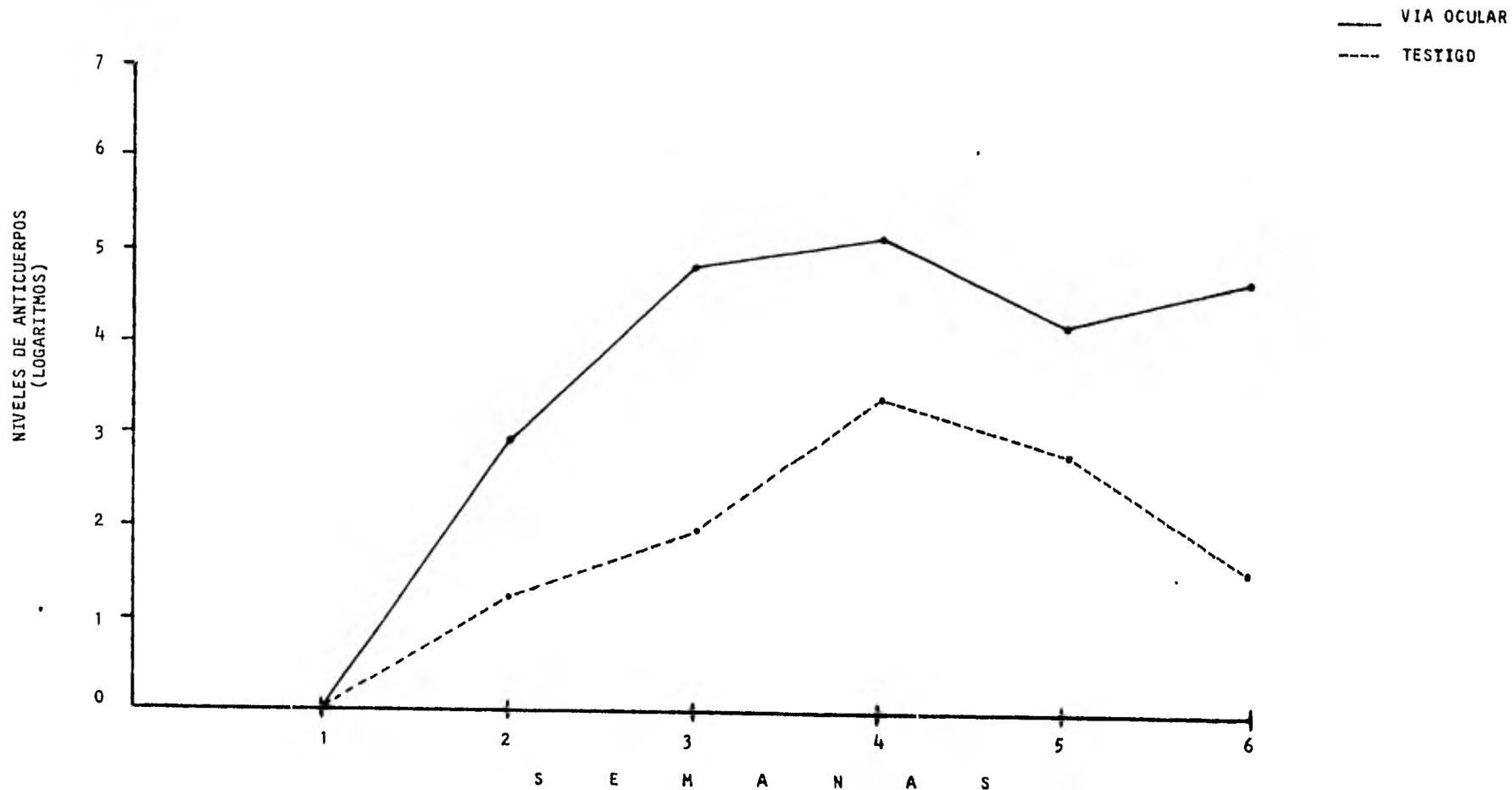


FIG. VI. TITULOS DE ANTICUERPOS OBTENIDOS CON LA APLICACION VIA SUBCUTANEA DE LA VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE CEPA "LA SOTA" (VIRUS INACTIVADO) EN POLLOS DE ENGORDA

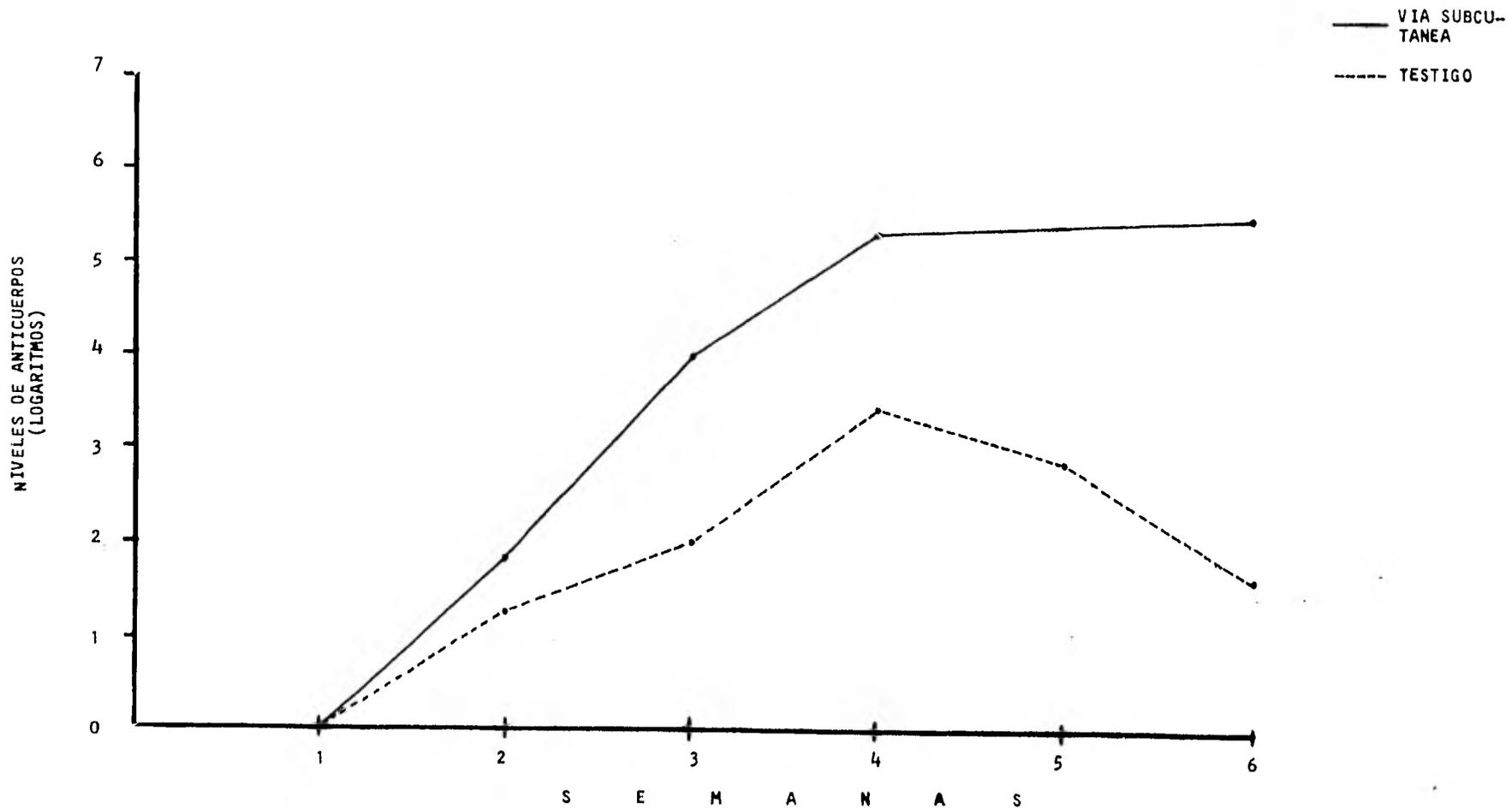


FIG. VII. TITULOS DE ANTICUERPOS OBTENIDOS CON LA APLICACION DE LA VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE CEPA "LA SOTA" POR VIA OCULAR SIMULTANEA CON VIA INTRAMUSCULAR EN POLLOS DE ENGORDA

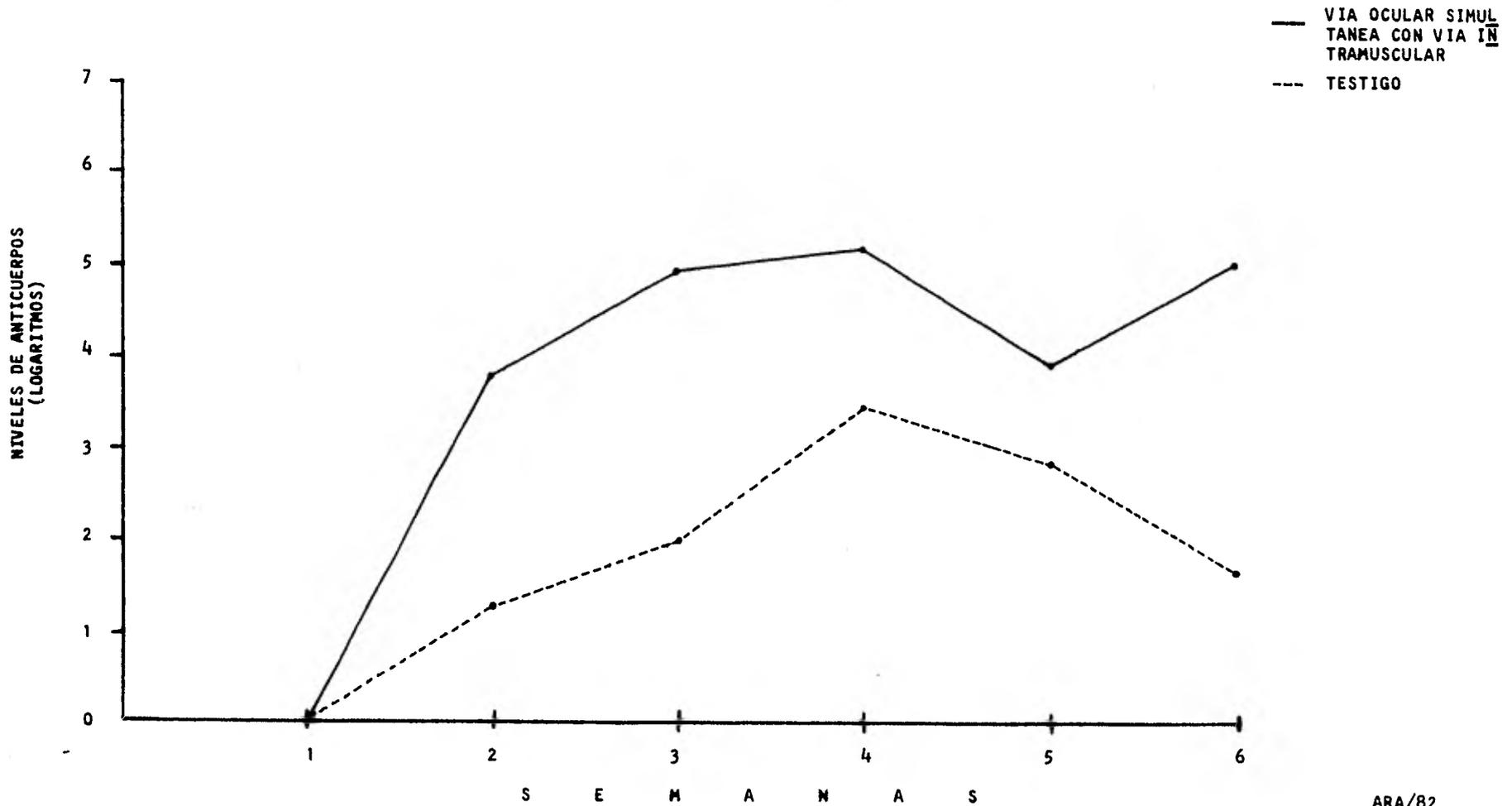


FIG. VIII. TITULOS DE ANTICUERPOS OBTENIDOS CON LA APLICACION INTRAMUSCULAR DE LA VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE CEPA "LA SOTA" (VIRUS VIVO) EN POLLOS DE ENGORDA

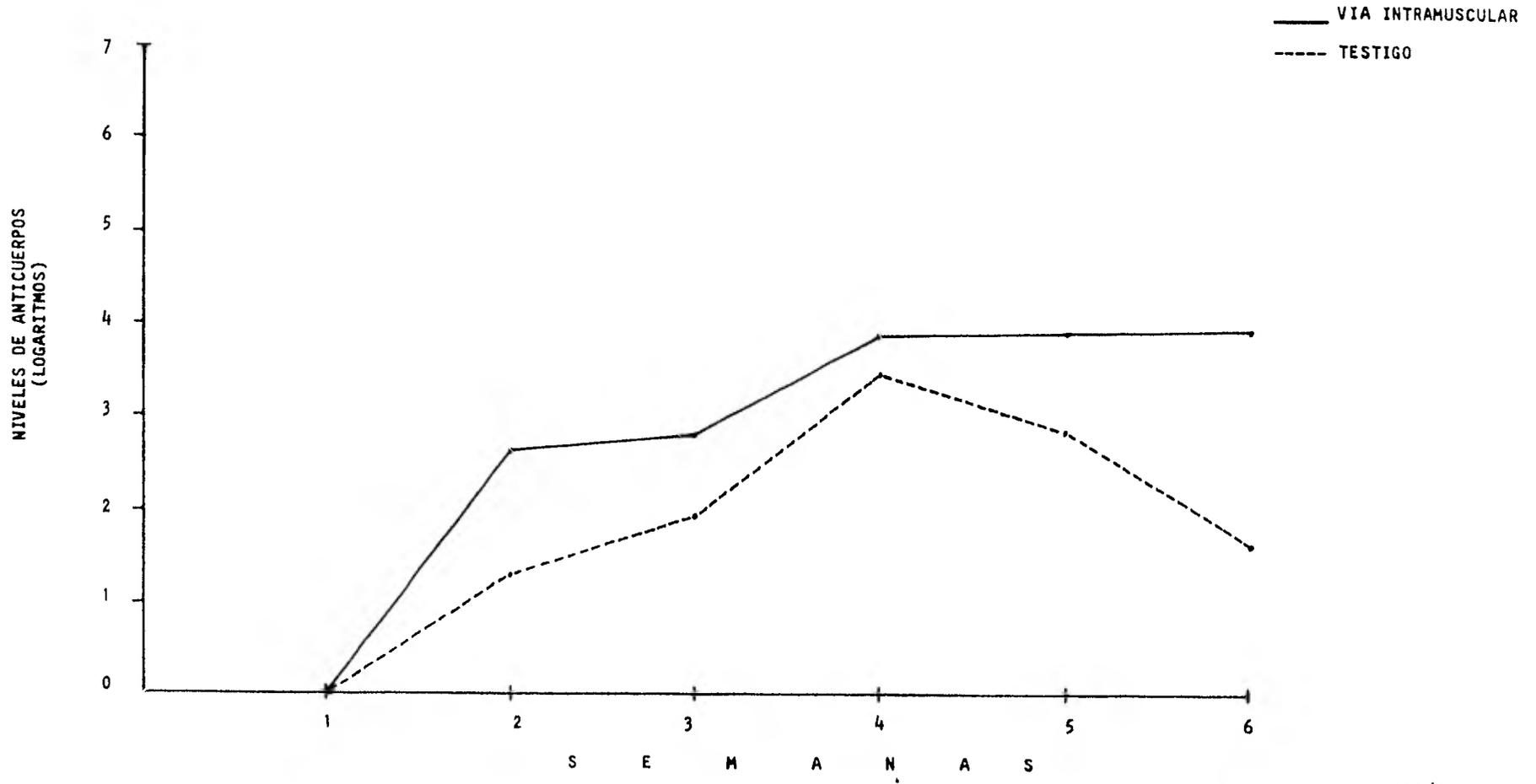


FIG. IX. EXPOSICION COMPARATIVA DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS OBTENIDOS SEMANALMENTE AL INOCULAR LA VACUNA CONTRA NEWCASTLE CEPA "LA SOTA" EN POLLOS DE ENGORRA LIBRES DE ANTICUERPOS MATERNOS, POR DIVERSAS VIAS DE VACUNACION UTILIZADAS EN MEXICO

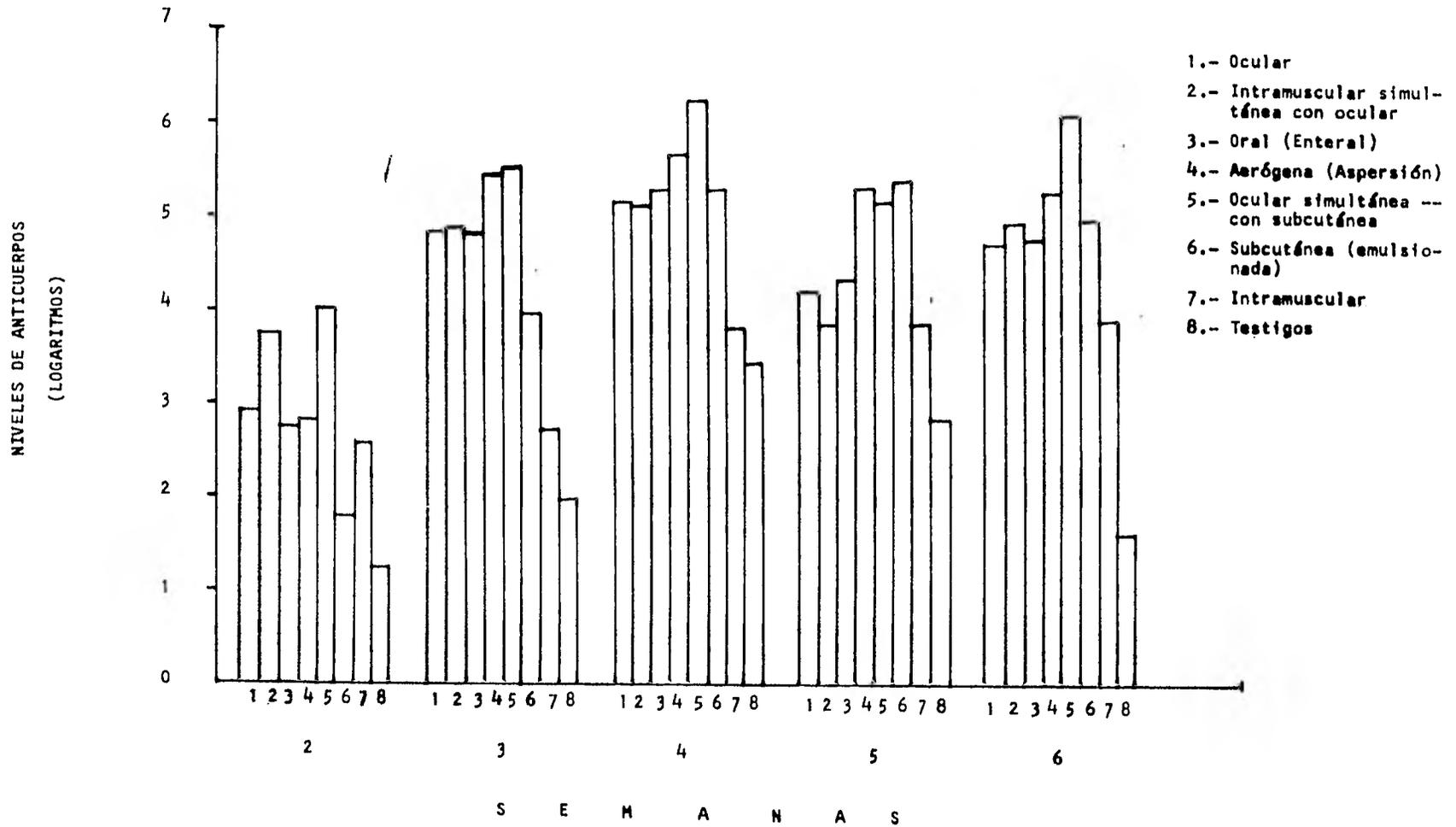


FIGURA X.

TITULOS DE ANTICUERPOS OBTENIDOS POR LA TECNICA DE INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION VACUNANDO POLLOS DE ENGORDA CONTRA LA ENFERMEDAD DE "NEWCASTLE" CON CEPA "LA SOTA" POR DIFERENTES VIAS DE VACUNACION - UTILIZADAS EN MEXICO. (PROMEDIOS SEMANALES)

VIA DE INOCULACION	\bar{X} T O T A L	S E M A N A S					
		1	2	3	4	5	6
OCULAR	4.358 a		2.92 b	4.84 b	5.15 b	4.18ab	4.70 d
INTRAMUSCULAR SIMULTANEA CON - OCULAR	4.500 a		3.75 a	4.86 b	5.12 b	3.85bc	4.92 bcd
ORAL (ENTERAL)	4.388 ab		2.75 b	4.83 b	5.29 b	4.32 a	4.75 cd
AEROGENA (ASPERSION)	4.892 ab		2.82 b	5.45 ab	5.64 b	5.30 a	5.25 bc
OCULAR SIMULTANEA CON SUBCUTANEA	5.398 a		4.02 a	5.52 a	6.22 a	5.15 a	6.08 a
SUBCUTANEA	4.366 bc		1.80 c	3.95 c	5.27 b	5.36 a	5.45 b
INTRAMUSCULAR	3.608 d		2.59 b	2.72 d	3.80 c	3.84 c	3.89 e
TESTIGOS	2.218 c		1.25 c	1.98 d	3.43 c	2.03 d	1.60 f

NOTA I: Para la obtención de los resultados se utilizaron las técnicas de análisis de varianza y D.M.S. (Diferencia Mínima Significativa)

NOTA II: Los resultados son expresados en logaritmos

NOTA III: Las vfas señaladas con letras iguales fueron estadfsticamente similares ($P < 0.05$)

V E R A N E X O

FIGURA X. ANEXO

Los rasgos encontrados para la obtención de las diferencias estadísticas al nivel de 95% de confianza son los siguientes:

SEGUNDA SEMANA:

a=	>	3.43		
b=	<	3.43	>	2.33
c=	<	2.33	>	1.21

TERCERA SEMANA:

a=	>	5.30		
b=	<	6.10	>	4.70
c=	<	4.70	>	3.30
d=	<	3.30	>	1.54

CUARTA SEMANA

a=	>	5.69		
b=	<	5.69	>	4.62
c=	<	4.62	>	2.58

FIGURA X. ANEXO

Los rasgos encontrados para la obtención de las diferencias estadísticas al nivel de 95% de confianza son los siguientes:

SEGUNDA SEMANA:

a=	>	3.43		
b=	<	3.43	>	2.33
c=	<	2.33	>	1.21

TERCERA SEMANA:

a=	>	5.30		
b=	<	6.10	>	4.70
c=	<	4.70	>	3.30
d=	<	3.30	>	1.54

CUARTA SEMANA

a=	>	5.69		
b=	<	5.69	>	4.62
c=	<	4.62	>	2.58

QUINTA SEMANA

a=	>	4.18		
b=	<	4.18	>	3.85
c=	<	3.85	>	3.60
d=	<	3.60		

SEXTA SEMANA:

a=	>	5.54		
b=	<	5.54	>	4.89
c=	<	5.54	>	4.71
d=	<	5.54	>	4.38
e=	<	4.38	>	3.25
f=	<	3.25	>	1.06

V DISCUSION

Habiendo analizado los resultados obtenidos estadísticamente al aplicar la vacuna contra la enfermedad de Newcastle (Cepa "La Sota") por vía ocular simultánea con la vía subcutánea (virus vivo + virus inactivado), se obtuvo el mayor nivel de anticuerpos con un título promedio de 5.398 (log) como se puede observar en la figura I, alcanzando el mayor nivel de protección a la séptima semana de edad (Figura II).

Estos resultados concuerdan con otros trabajos realizados (Phillips--1973 y Partadiredja 1978) en los que se obtuvo una respuesta más efectiva combinando virus vivo con virus inactivado aplicándolo simultáneamente (94% máxima protección) que aplicando cuatro vacunaciones de virus vivo (84% máxima protección).

La otra vía combinada utilizada (ocular simultánea con intramuscular) con virus vivo solamente dio una respuesta promedio de 4.500 (log) -- que fue menor comparándola con la obtenida al aplicar virus vivo simultáneo con virus inactivado 5.398(log) Figura 1, Con la vía ocular simultánea con la vía intramuscular se obtuvo el mayor título de protección a la séptima semana de edad, teniendo un comportamiento menos estable que el presentado por la vía ocular simultánea con la vía

subcutánea, ya que decae el nivel de anticuerpos a la octava semana de edad y después vuelve a elevarse (Figura VII)

De las vfas individuales utilizadas en este trabajo la que confiere un mayor título de protección es la aerógena con 4.892 (log) que alcanzó el máximo nivel de protección a la séptima semana de edad como se muestra en la figura número III. Este resultado concuerda con otros trabajos previos (36,37) en los que se obtuvo al utilizar la vfa aerógena una respuesta aerológica mayor que al utilizar la vfa oral y la vfa intra-traqueal manteniéndose ésta con mayor estabilidad en comparación con las otras.

Al aplicar la vacuna contra la enfermedad de Newcastle cepa "La Sota" por vfa oral se obtuvo el máximo nivel de protección a la séptima semana y decae a la octava semana para volver a elevarse a la novena semana de edad.

Este resultado concuerda con el obtenido por Eidson y Kleven (1976) quienes al utilizar la vfa oral obtuvieron el máximo nivel de protección a la séptima semana descendiendo ligeramente a la octava, solo que en este trabajo el nivel de anticuerpos no volvió a elevarse sino que su descenso fue más notorio a la novena semana de edad.

Con respecto a las demás vfas utilizadas el resultado obtenido con la vacuna aplicada por vfa oral concuerda con los resultados presentados

por BALLA y PAPOCSI (1976) quienes obtuvieron una mediana protección al aplicar la vacuna contra la enfermedad de Newcastle cepa "La Sota" por vfa oral, obteniendo un mayor nivel de anticuerpos al efectuar -- inmunizaciones consecutivas.

La vacuna aplicada por vfa ocular dió una respuesta semejante a la -- aplicada por vfa oral ya que presentó su mayor nivel de protección a la séptima semana de edad 5.150 (log) y disminuyó a la octava volviendo a elevarse en la última semana de vida del ave.

Los resultados obtenidos con la vfa ocular concuerdan con los obtenidos por Eidson y Kleven (1980) que al utilizar las vfas aerógena, ocular y subcutánea, obtuvieron una buena respuesta inmunológica con la vfa ocular que aunque no fue la mejor fue bastante efectiva.

(Figs. I y V)

Al aplicar la vacuna por vfa subcutánea se obtuvo una respuesta uniforme ya que el título fue aumentando lentamente después de la aplicación de la vacuna y al llegar a la séptima semana de vida presentó -- una tendencia horizontal sin disminuir en ningún momento; lo presente concuerda con los trabajos realizados por MacPherson 1975, Stone, -- Brug y Beard 1979 quienes obtuvieron buenos títulos de protección al vacunar contra la enfermedad de Newcastle por vfa subcutánea.

De las vías utilizadas con la que se obtuvo la menor protección fue - la intramuscular que dió una respuesta ligeramente mayor a la obtenida con el lote que no fue vacunado y aunque el nivel de anticuerpos - fue siempre en aumento fue muy lentamente y alcanzó el 3.890 (log) como máximo nivel a la novena semana de vida que es cuando las aves son sacrificadas; este resultado obtenido concuerda con el trabajo realizado por Quaglio G. 1973 quien al vacunar contra la enfermedad de New castle cepa "La Sota" midiendo con IHA, 15 días después de la vacunación y habiendo vacunado a los 18 días de edad por vía ocular, aéroge na y oral obtuvo una respuesta satisfactora, no así al inocular intra muscular la vacuna obteniendo una respuesta pobre y teniendo un 45% - de mortalidad al efectuar la prueba de desaffo.

VI C O N C L U S I O N E S

Con los datos obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que la vía de inoculación, para la vacuna contra la enfermedad de Newcastle cepa "La Sota", con la que se obtiene un mayor nivel de anticuerpos, es la aerógena, que confiere el máximo de protección a la séptima semana de vida del ave manteniéndose estable el título después de haber alcanzado el máximo.

La vía de inoculación con la que se obtiene la más rápida elevación de anticuerpos es la ocular ya que fue con la que se obtuvo el mayor título en la siguiente semana después de aplicar la vacuna.

Se puede concluir que la aplicación simultánea de una vacuna virus vivo y una vacuna virus inactivado confiere mayor protección que la aplicación de vacunas individuales, observándose una rápida respuesta ya que confiere títulos de protección desde la primera semana posterior a la vacunación, aumentando gradualmente este nivel hasta obtener su máximo a la séptima semana de vida del ave y manteniéndose estable -- hasta que estos son enviados al mercado.

También puede decirse que el aplicar vacunas de virus vivo por dos diferentes vías (intramuscular y ocular) eleva rápidamente el título -

de anticuerpos a la primera semana después de la vacunación siendo es
te título mayor que el obtenido con cualquiera de las vfas individua-
les utilizadas pero en el transcurso de la vida del ave el título con
ferido al utilizar estas vfas de vacunación no es significativamente-
mayor que el obtenido con las vfas individuales por lo que no es nece
sario aplicar la vacuna por dos diferentes vfas cuando ésta es de vi-
rus vivo.

VII BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALLAN, W.H., LANCASTER, J. E AND TOTH, B.: Vacunas contra la Enfermedad de Newcastle. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma (1980).
- 2.- ALLAN, W.H.: Medidas para un control más efectivo de la enfermedad de Newcastle. Agricultura, Vol. 79, No. 10 pp. 413-420 Avicultura Técnica año XIII No. 163.
- 3.- ALLAN, W. H., AND GOUGH, R.E.: A Standard Hemagglutination - Inhibition test for Newcastle disease. 1, a comparison of - macro and micro methods. Vet. Rec. 95.: 120-123 (1974)
- 4.- BALLA, L., PAPOCSI L. , SZUROP I. , TOTH, B.: Allatgoyo gyaszati oltoanyagel enorzo intezet, szallas vtca u, 1107 budapest, Hungary. Magyar Allatorvosok lapja (1976), 31, 2, 75-80, 80-84.
- 5.- BANKOWSKI, R. E., CORSTVET: Nature of Immunity to Newcastle - disease in vaccinated chickens. Influence of residual resistance upon the level and duration of immunity following revaccination. Avian Dis. VI: 333/49 (1962).

- 6.- BEARD, C.W., AND WILKES, W.J.: A simple and rapid microtest - procedure for determining Newcastle Hemagglutination-Inhibition (HI) antibody titers. Proc. 77 th Ann. Mtg. U.S. An. - Healt Assoc. pp. 596-600 (1973)
- 7.- BEARD, C.W., HOPKINS, S.R. AND HAMMOND, J.: Preparation of - Newcastle Disease Virus Hemagglutination - Inhibition test antigen. Avian Dis. vol. 19 No. 4 (1975)
- 8.- BENSON, H.N., WENGER, D.R., BEARD, P.D.: Efficacy of a commercial Newcastle vaccine against velogenic viscerotropic Newcastle disease virus. Avian Dis. 19, 3 pp. 566-572 (1975)
- 9.- CUADRA, G.A.: Aspectos clínicos y patológicos de la enfermedad de Newcastle en México. IV Congreso Panamericano de M.V.Z. México pp. 7780 (1962)
- 10.- CUNNINGHAM, C.H.: Virologfa Práctica. Ed. Acribia pp. 133-135 (1971)
- 11.- CHEVILLE, N.F.: Environmental factors affecting the immune response of birds. 27 th Western Poultry Disease Conference. Davis California (1978).

- 12.- DANTON, H. F.: Enfermedad de Newcastle. Avicultura Técnica. Año XII No. 153 (1974)
- 13.- EIDSON, C.S., VILLEGAS, P. AND KLEVEN, S.H.: Field Trials with an Oil-Emulsion Newcastle disease vaccine in broiler breeders Poultry Science 59: 702-707 (1980)
- 14.- EDISON, C.S., AND KLEVEN, S.H.: A comparison of Various Routes of Newcastle disease vaccination at one day of age. Poultry Science 55: 1778-1787 (1976)
- 15.- EIDSON, C.S., AND KLEVEN, S.H.: Vaccination of chickens with a Clone selected LaSota strain of Newcastle disease virus Poultry Science 59: 976-984 (1980)
- 16.- ESTUDILLO, J.: Newcastle disease. Western poultry disease Conference University of California, Davis. in anuary 21 st. March (1972)
- 17.- FECHNER, J.: Vacunas y vacunación de los animales domésticos ED. Acribia España (1966).
- 18.- FINDENBERG, H.; STITES, D.; CALDWELL, J.; Manual de Inmunología clínica. 2a. Edición ed. El Manual Moderno México (1980).

- 19.- GALVAN, G.: Mesa redonda sobre la enfermedad de Newcastle, -
III Seminario ord. de la APYZAN Guaymas, Son. marzo 31 (1974)
- 20.- GIAMBRONE, J.J.: Laboratory evaluation of the immune response of young broiler chickens vaccinated against Newcastle -
disease under field conditions. Poultry Science 60: 1204-1208
(1981).
- 21.- HANSON, R.P.: Newcastle disease. Isolation and Identification
of avian pathogens. The American Association of Avian Patholo
gist, pp. 160-173 (1975).
- 22.- HELLER, D.; SOLLER, M.: Immune response to Newcastle disease
virus vaccine, fowl-pox vaccine, and escherichia coli vacci
ne in bedouin and white Leghorn Chickens. Poultry Science, Vol.
60 No. I pp. 34 enero (1981).
- 23.- HOFSTAD, : Diseases of Poultry. Seventh Edition. Iowa State -
University Press. pp. 513-535 (1978).
- 24.- KARCZEWSKI, W.: Investigations of the effectiveness of vacci-
nations against Newcastle disease in broiler farms. II. Attem
pts to improve the effectiveness of vaccination. Bulletin of
the veterinary Institute of Pulawy (1973), 17, No. 1/2, 15-25.

- 25.- LOPERENA, VELAZQUEZ Y CUENTOS: Relación entre inmunidad congénita y respuesta a la vacunación contra la enfermedad de Newcastle. II Convención Anual de la A.N.E.C.A. (1977).
- 26.- LOZANO, D., PARADA, A., TELLEZ, G.: Métodos y vías de vacunación contra la enfermedad de Newcastle. Lab. PFIZER (1979).
- 27.- LUCIO, B.: Newcastle disease in México. Proc. and Abst. XV. World Poultry Congress. New Orleans pp. 405-406 (1974).
- 28.- MACPHERSON, I.; FEEST, A.: Newcastle disease haemagglutination inhibition titers found on routine sampling of poultry in 1974. Veterinary Record. (1975), 97, 9, 169-170.
- 29.- MAJIYAGBE, K.A. AND HITCHNER, S.B.: Antibody response to Strain Combinations of Newcastle Disease Virus as Measured by Hemagglutination-Inhibition. Avian Dis. Vol. 21 No. 4 (1977)
- 30.- MARQUEZ, M.A.: Historia de la enfermedad de Newcastle en México Avirama Año 1 vol. No. 6.
- 31.- MARQUEZ, M.A., AND HUERTA, A.: Prueba de campo comparativa - entre la cepa La Sota y una cepa vacunal clonada para la - prevención de la enfermedad de Newcastle en el noroeste de México. Avirama No. 27.

- 32.- MERCHANT, I.A., AND PACKER, R.A.: Bacteriología y Virología Veterinarias. Ed. Acribia España (1970).
- 33.- METHODS FOR THE EXAMINATION OF POULTRY BIOLOGICS: National Academy of Sciences.- National Research Council, Washington D. C. Publication 1038. 2nd Edition (Revised). Newcastle.- IV. Immunology.- Hemagglutination, Hemagglutination-Inhibition, Beta procedure. pp. 44-49 (1963)
- 34.- PARADA, A.J.: Sistemas de vacunación contra la enfermedad de Newcastle. IV Simposium de Nutrición y Sanidad Animal México (1978)
- 35.- PARADA, A.J.; TELLES: Últimas innovaciones en la inmunización contra la enfermedad de Newcastle, Depto. Técnico de la División Veterinaria. Laboratorio PFIZER (1981).
- 36.- PARTADIREJJA, M., EDISON, C.S., AND KLEVEN, S.H.: A comparison of Immune Responses of Broiler Chickens to Different Methods of Vaccination Against Newcastle Disease. Avian Dis. Vol. 23 No. 3 (1978).
- 37.- PARTADIREJJA, M. EDISON, C.S., AND KLEVEN, S.H.: Immunization of Broiler Breeder Chickens Against Newcastle Disease with an Oil-Emulsion Vaccine. Avian Dis., vol. 23 No. 3 (1978).
- . . .

- 38.- PHILLIPS, J.M.: Vaccination against Newcastle disease. An -
Assessment of Haemagglutination-Inhibition titers Obtained
from Field Samples. Veterinary Record., December 1st. (1973)
- 39.- QUAGLIO, G., LOMBARDI, D., MAESTRINI, N.: Studio della immu-
nità indotta nel pollo dal virus della malattia di Newcastle
ceppo LaSota, in rapporto alla via de somministrazione. Nuo-
va Veterinaria, 49 No. 5, pp. 239-242. (1973).
- 40.- Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la UNAM (ENFERMEDAD DE NEWCASTLE) Vol. VII, abril-junio
(1976) No. 2
- 41.- ROJAS, M.W. Inmunología 3a. Edición Ed. Colina (1976).
- 42.- SKAKA, B.: Virología Veterinaria. Instituto Cubano del Li-
bro la Habana. pp. 50 (1971).
- 43.- STOENESCU, V.; NICULESCO, E.; SANDLUSCO, S.: Verificarea in
practica a rezultatelor vaccinariii contra pseudopestei prin
apa de baut la puii de carne Revista de Zootenie si Medici-
na Veterinara (1972), 22, No. 6, 78-84.

- 44.- STONE, H.D., BRUGH, M. ERICKSON, G.A., AND BEARD, C. W. :
Evaluation of Inactivated Newcastle Disease Oil Emulsion Vaccines. Avian Dis. vol. 24 No. 1 (1979).
- 45.- TIZARD, I.R.: Immune Responses 5th Western Poultry Disease - Conference Davis, California. February 27-28 (1978).
- 46.- VELAZQUEZ, E.A.: Características de algunas cepas del virus - de la enfermedad de Newcastle, aisladas en México. 1er. Symposium sobre las enfermedades de las aves S.A.G. UNAM pp. 103 - 109 (1964).
- 47.- WINTERFIELD, R.W., DHILLON, A.S., AND ALBY, L.J.: Vaccination of chickens against Newcastle Disease with Live and Inactivated Newcastle Disease Virus. Poultry Science 59:240-246 (1980)
- 48.- WINTERFIELD, R.W., AND DHILLON, A.S.: Comparative Immune Response from vaccinating chickens with lentogenic Newcastle Disease Virus Strains Poultry Science 60: 1195-1203 (1981).
- 49.- ZAVALETA, D., LUCIO, B.: Estabilidad de las vacunas a virus - contra la enfermedad de Newcastle elaboradas en México. Avirama año 2 vol. II No. 15.