

231
2ef



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES VIAS DE
APLICACION DE LA VACUNA DE
LARINGOTRAQUEITIS AVIAR**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

Torres Islas Juan Agustín

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

9 9 0 .



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 está 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.

INDICE

	PAGINA
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
MATERIAL Y METODOS.....	12
RESULTADOS.....	17
DISCUSION.....	33
CONCLUSIONES.....	39
BIBLIOGRAFIA.....	41

RESUMEN

TORRES ISLAS JUAN AGUSTIN - Estudio Comparativo de tres vias de aplicacion de la vacuna de laringotraqueitis aviar. (Bajo la direccion de Jose de Jesus Gomez Sanchez y Angel Retana Reyes)

Con el objeto de investigar la mejor via de aplicacion de la vacuna de Laringotraqueitis Aviar (LTA) se inmunizaron a 90 pollos de engorda de 28 dias de edad divididos en lotes de 30 aves cada uno por via intraocular, agua de bebida y puncion en el pliegue del ala con una vacuna elaborada en embrion de pollo contra la LTA con un titulo de 10×4.8 DIEP 50%/ml. Se mantuvo un grupo testigo el cual no fue vacunado. Se evaluo la reaccion posvacunal de cada tratamiento de acuerdo a los signos presentados despues de la inmunizacion. Posteriormente, todos los lotes fueron desafiados a los 21 dias posvacunacion con un virus patogeno de LTA aplicado por via intratraqueal. Fueron tomadas muestras de sangre con y sin anticoagulante antes de la vacunacion, a los 14 y 21 dias posvacunacion y despues del desafio para conocer los niveles de anticuerpos sericos e inmunidad celular mediante las pruebas de virus suero neutralizacion (VSN) y factor inhibidor de la migracion de los macrofagos (MIF).

Las aves inmunizadas por via intraocular obtuvieron la mayor proteccion tanto a nivel serico como celular, lo cual coincidio con los resultados obtenidos durante el desafio, en el que no se registro

mortalidad en este lote; sin embargo esta vía causó una severa reacción posvacunal caracterizada por blefarconjuntivitis, estornudo y depresión de la parvada. Tanto la inmunización por aplicación de la vacuna en agua de bebida como la punción en el pliegue del ala no provocaron una reacción posvacunal grave, sin embargo no lograron conferir una protección adecuada a las aves, las cuales sufrieron la enfermedad en toda su magnitud durante el desafío. Sin embargo cabe mencionar que la vacunación por pliegue del ala fue la que obtuvo el segundo más alto porcentaje en la prueba de MIF, además de no provocar ninguna reacción posvacunal, lo que nos indica que el virus es capaz de replicarse en piel y estimular la inmunidad celular por lo que con otro tipo de diluyente y adaptando mejor al virus a este tejido o aplicando una mayor concentración de éste, la vacunación por punción en el pliegue del ala podría ser una buena opción para la inmunización de las aves contra la LTA.

INTRODUCCION

La Laringotraqueítis Aviar (LTA) es una enfermedad respiratoria causada por un Alfa-Herpes virus que afecta a la gallina doméstica, pavos y faisanes caracterizada por causar bierafoconjuntivitis, estertor traqueal y expectoración de exudados sanguinolentos (30 , 29).

La LTA fue descrita por primera vez en 1925 por May y Titsler, quienes observaron un brote en una granja de la población de Rhode Island, N.Y. en 1923; posteriormente fue reportada por Gwatkin en Canadá en ese mismo año y en Holanda por Van Heelstberger en 1929. En Gran Bretaña fue descrita por Dobson en 1935, en Australia por Seddon y Hart en el mismo año, en Suecia por Magnusson en 1940, en Polonia por Marek en 1948 y en México por Velázquez en 1957. Actualmente la LTA es una enfermedad de distribución mundial que ha sido reportada en todos los países que poseen una avicultura industrializada (24, 30, 27).

El herpes virus causante de la LTA fue descrito por Watrach en 1963, este posee una envoltura lipoproteica irregular que recubre la nucleocápside que contiene el ADN viral de 120 a 220 kpb de tamaño. La nucleocápside es icosaédrica y mide entre 80 y 100 nm de diámetro y está formada por 162 capsómeros. Se ha informado de variación en la capacidad neutralizante de las distintas cepas de LTA aisladas, sin

embargo, al parecer son homogéneas desde el punto de vista antigenico. Se replica en embrion de pollo de 9 a 12 dias de edad al ser inoculado sobre la membrana corioalantoidea en la que produce pustulas opacas que tienen areas centrales de necrosis del quinto al septimo dia posinoculacion. Tambien puede propagarse en cultivos celulares de riñon, higado, pulmon y fibroblastos de embrion de pollo o pavo, donde provoca la formacion de celulas multinucleadas, sincitios y cuerpos de inclusion (16, 27, 30).

El virus es sensible a sustancias lipidicas, al calor, a soluciones de cresol al 3%, NaOH al 1% y formol del 2 al 4%. Hughes ha demostrado que permanece en estado latente en aves que han sufrido la enfermedad y que estas pueden llegar a liberarlo de manera espontanea o bien al hallarse inmunodeprimidas; lo que representa un grave problema epidemiologico, ya que asi se perpetua la LTA en una zona, pudiendo llegar a causar brotes de la enfermedad (16, 18, 30, 27).

La LTA se trasmite de manera horizontal directa o indirecta a traves de vectores como equipo, alimento contaminado, aves silvestres y personas que entran en contacto con animales enfermos, siendo las vias respiratorias altas y la conjuntiva la ruta de entrada natural del virus, que tiene un periodo de incubacion de 6 a 12 dias, aunque se ha visto que al ser inoculado por via intratraqueal de manera experimental el periodo de incubacion es de 24 a 72 horas (16, 24, 30, 29). Esta afecta principalmente a las aves mayores de cuatro semanas de edad, sin embargo se ha inoculado en pollitos de tres dias de edad ocasionando un cuadro respiratorio y diseminacion del

virus al hígado a los 5 a 7 días posinoculación (5). Después del período de incubación aparecen los signos clínicos consistentes en inflamación de los senos infraorbitarios, blefaroconjuntivitis uni o bilateral, adherencia de los párpados, rinitis, disnea, estornudo, cuello estirado, estertor traqueal, expulsión de exudados que van de serosos a mucosanguinolentos, baja en la producción de huevo y muerte. El cuadro clínico que se observa varía dependiendo de la virulencia de la cepa de desafío, la receptividad de las aves, las condiciones de manejo e higiénicas de la parvada y la presencia de gérmenes de asociación como Haemophilus gallinarum (16, 30, 29). Es por esto que Seddon y Hart dividieron a la enfermedad en cuatro presentaciones:

1) Hiperaguda.- Los problemas respiratorios son muy graves y hay presencia de expectoraciones mucosanguinolentas por parte de las aves. La morbilidad y mortalidad generalmente es de 50 a 60% y en ocasiones puede ser mayor.

2) Aguda.- La morbilidad es alta, pero no así la mortalidad que va de 10 a 15%. Se observan exudados mucosos en traquea que en raras ocasiones llegan a ser hemorrágicos. Hay presencia de rinitis, sinusitis y conjuntivitis.

3) Crónica.- En esta categoría se incluyen a los sobrevivientes de las dos presentaciones anteriores. La morbilidad es de 2 a 5%, existiendo conjuntivitis, rinitis, descargas nasales fetidas, presencia de estertores traqueales, estornudo y en el caso de aves en postura baja en la producción de huevo.

4) ASintomatica.-En esta categoría se encuentran los portadores sanos, que pueden llegar a expulsar el virus de manera espontánea ocasionando el contagio de animales sanos. Ya que este virus llega a permanecer en ganglio trigémino en forma de provirus, confiriendo inmunidad de por vida a las aves recuperadas (1, 5, 18, 24, 30).

Las lesiones macroscópicas producidas por la LTA se encuentran confinadas principalmente al aparato respiratorio superior y ojos, provocando una severa blefaroconjuntivitis, sin embargo la tráquea es el órgano más afectado ya que el virus se replica en forma citocida en la mucosa, ocasionando inflamación en las primeras etapas de la enfermedad y posteriormente degeneración, necrosis y hemorragias, pudiéndose encontrar exudados en tráquea que van de serosos a caseosos dependiendo de la presentación de la enfermedad. Por este proceso que al estornudar las aves expulsan tejido epitelial de descamación y sangre. En algunas ocasiones el proceso inflamatorio puede extenderse a pulmones y sacos aéreos (9, 16, 24, 30, 27, 39). Al realizar el estudio histopatológico de las traqueas afectadas en las primeras fases de la enfermedad se puede observar la formación de sincitios de células epiteliales que contienen corpusculos de inclusión intranucleares de Seifreid (se presentan 12 horas después de la infección y persisten por 3 a 4 días) siendo esta lesión patognomónica de la LTA (11, 37). Posteriormente el epitelio traqueal se desprende y desaparecen los corpusculos de inclusión, por lo cual, si se desea llegar al diagnóstico por medio de la histopatología se debe tomar muestras de los animales que

presenten las primeras fases de la enfermedad. Otras técnicas para llegar al diagnóstico definitivo es el aislamiento del virus en cultivos celulares y en embrion de pollo de 9 a 12 días de edad. También se puede recurrir a la prueba de inmunofluorescencia, que es muy rápida y detecta mínimas cantidades de virus presentes en las muestras, o bien a la prueba de inmunodifusión en agar, la cual es muy específica pero no muy sensible (31, 44, 14). Para realizar monitoreos serológicos de la enfermedad, se puede recurrir a la prueba de virus suero neutralización y precipitación en agar entre otras (14).

El control de la LTA ha sido motivo de diversos estudios, ya que no solo causa una disminución de los parámetros productivos de las aves, sino que además predispone a infecciones secundarias causantes de graves estragos económicos en la avicultura (16, 24, 29). Los primeros métodos de control aplicados en los años treinta consistieron en el sacrificio de los animales afectados y la repoblación de las granjas con aves libres del virus. Esto funcionó en algunas zonas, sin embargo en las áreas en que la enfermedad era enzootica o bien que había una elevada densidad de granjas estas medidas no funcionaron. Gibbs y Brandly descubrieron que la aplicación de suero hiperinmune tenía cierto valor protectorio, aun después de aparecidos los primeros síntomas. Sin embargo el costo de producción y la difícil administración del suero hiperinmune hizo que esto no se llevara a cabo en la práctica. Bajo tales circunstancias se intentó aumentar la resistencia de las aves al virus poniéndolas en contacto de manera deliberada con animales recuperados, los cuales al liberar el virus estimulaban la producción de inmunidad en la

parvada: sin embargo el virus al sufrir pases en las aves llegaba a reproducir la enfermedad. Posteriormente se intento administrar el virus inactivado, sin embargo este procedimiento no era efectivo. Fue hasta el año de 1932 en que se elaboraron las primeras vacunas contra la LTA, que se administraban por escarificación de la cloaca, produciendo en el sitio de la aplicacion la formacion de una pustula cinco dias posinoculacion, lo cual servia para constatar el correcto empleo de la vacuna. Esta "Vacuna" conferia una buena proteccion, sin embargo era necesario la utilizacion de virus patógeno para producir una respuesta inmune adecuada, lo cual servia para perpetuar y diseminar la enfermedad en una zona. Fue hasta los años sesentas en que Shibley propuso la vacunacion por via intraocular con una cepa de virus de LTA atenuada en embrion de pollo, dejandose de utilizar la vacunacion por escarificacion de la cloaca. Se han intentado algunas otras vias de aplicacion de la vacuna de LTA desde ese entonces como es la aspersión, que presenta varios inconvenientes, como son las severas reacciones posvacunales, especialmente en parvadas infectadas por Haemophilus gallinarum, Mycoplasma gallisepticum o Mycoplasma sinoviae; otro inconveniente es la estandarizacion de la tecnica de aplicacion, pues se debe tomar en cuenta el volumen respiratorio de las aves, el volumen y la naturaleza del diluyente utilizado, el tamaño de la gota, los efectos del medio ambiente que puedan actuar sobre la estabilidad del virus entre otros factores. Además existen reportes de que esta via de aplicacion no logra producir una buena inmunidad, por lo que la aspersión unicamente se llega a utilizar para provocar proteccion por interferencia de receptores en caso de que las aves se vean expuestas

a un virus patogeno (8, 2). Otra via utilizada es la oral por agua de bebida; tiene la ventaja de poder inmunizar varias aves en un periodo corto de tiempo con un minimo de mano de obra sin provocar estados de tension en los animales; ademas no causa reacciones posvacunales muy severas y existen reportes (2, 3) que señalan que produce una adecuada inmunidad. Sin embargo esta via tiene los inconvenientes de que no es uniforme la cantidad de vacuna que consumen las aves, ademas de que esta debe ser consumida en un periodo corto de tiempo, pues el virus no es muy resistente al medio ambiente. Es por ello que se deben de retirar los desinfectantes del agua y adicionar leche buscando lograr un pH neutro y proteger así al virus. Existen reportes de otras vias de aplicación como es la intramuscular e intradérmica, sin embargo no existe información suficiente sobre estas formas de vacunación (9, 13, 24, 27, 2, 3, 25, 21).

A pesar de lo antes mencionado la via de inmunización mas utilizada es la aplicación intraocular de una vacuna a base de virus activo modificado en embrion de pollo o en cultivos celulares, con un titulo minimo de 10×4 D₅₀/ml (31), que al ser aplicada por la via de entrada natural logra que el virus vacunal se replique de manera optima en los mismos sitios que el virus patogeno; produciendo de esta forma un fenomeno de interferencia viral extra e intracelular por bloqueo de receptores y producción de interferon en caso de aplicarla durante un brote de la enfermedad, además de estimular de manera poderosa la producción de IGA secretora de manera local; ademas el virus vacunal queda en forma de provirus en el organismo confiriendole de esta forma una inmunidad de por vida al

ave (5, 15, 18, 22, 23, 36, 42). Sin embargo la aplicación de la vacuna por vía intraocular tiene varias serias desventajas como son las reacciones posvacunales muy severas caracterizadas por blefaroconjuntivitis, estertores traqueales, baja en la producción y en algunas ocasiones mortalidad; además en animales infectados por Mycoplasmas se puede desencadenar la presentación de la enfermedad respiratoria crónica complicada y en aves afectadas por Haemophilus gallinarum reproducir la LTA. Es por esta razón que muchos avicultores prefieren evitar la aplicación de la vacuna al menos de verse afectados por la enfermedad, esto representa un grave riesgo en zonas de elevada densidad de granjas o en regiones en que la LTA es enzootica. La vacuna ocular protege de manera local por la producción de IGA secretora y por producir una lesión en el epitelio traqueal estimula tanto la inmunidad celular como la humoral (27, 39, 44). Se sabe que la inmunidad humoral no es muy importante en la LTA, pues se ha visto que no existe una relación entre los niveles de anticuerpos séricos registrados por la prueba de virus suero neutralización y la protección contra la enfermedad; además cuando se aplicaba la vacuna por vía intracloacal se obtenía una inmunidad adecuada contra el virus de LTA a pesar de que no se producía IGA secretora. Todo esto junto con el conocimiento de que la inmunidad celular es la principalmente involucrada en los procesos virales hace pensar que la aplicación de una vacuna a base de virus activo modificado por punción en el pliegue del ala podría conferir a las aves una buena protección contra la LTA, ya que por esta vía se estimula de manera poderosa la inmunidad celular por encontrarse en la piel un sistema de atrapamiento local de antígenos que consta de

una red de células dendríticas, situadas en la epidermis, que reciben el nombre de células de Langerhans las cuales poseen antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y son capaces de presentar antígenos a los linfocitos T cooperadores. Además los queratinocitos aumentan la actividad de las células de Langerhans y de los linfocitos T por ser capaces de sintetizar y secretar interleucina-1. También existen pruebas por las que se sospecha que una subpoblación de linfocitos T se alojan en la piel de manera selectiva (44). Por otra parte la vacunación en pliegue del ala tal vez produciría una lesión en el sitio de aplicación que permitiría corroborar la correcta utilización del inmunógeno, además de no producir las serias reacciones posvacunales que se originan al aplicar el virus por vía ocular.

MATERIAL Y METODOS

AVES

Para la realización del presente trabajo se utilizaron 120 pollos de engorda mixtos Indian River-Vantress de un día de edad procedentes de una incubadora comercial, que fueron alojados en unidades de aislamiento con bebederos y comederos de iniciación (que fueron reemplazados por comederos de finalización a los quince días de edad), criadoras eléctricas e iluminación y ventilación artificial. La temperatura fue registrada en termómetros ambientales de máximas y mínimas. Las aves recibieron alimento comercial y agua ad-libitum. A partir de los veintiocho días de edad se separaron al azar en cuatro grupos de treinta aves cada uno los cuales fueron mantenidos en unidades de aislamiento independientes.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se hizo un muestreo serológico y sanguíneo a los veinticuatro días de edad para determinar los niveles séricos de anticuerpos e inmunidad celular contra LTA mediante las técnicas de virus suero neutralización (VSN) y Factor de Inhibición de la Migración de los

Macrofagos (MIF) contra la LTA. Posteriormente a los veintiocho dias de edad las aves fueron agrupadas en lotes de treinta animales cada uno, con los siguientes tratamientos:

Lote A.- Grupo testigo, se mantuvo en aislamiento y no se le aplico ningun tratamiento.

Lote B.- Aves inmunizadas por via ocular a los 28 dias de edad mediante la aplicacion de una gota de 0.03 ml. de una vacuna comercial elaborada en embrion de pollo contra la LTA con un titulo de 10×4.8 D₅₀ 50%/ml.

Lote C.-Aves inmunizadas via oral a los 28 dias de edad mediante la administracion 45 dosis (en lugar de treinta) de la vacuna antes mencionada en 150 ml. agua destilada, y 150 ml. de leche descremada en polvo con la finalidad de proteger al virus de la LTA. En este grupo se retiraron los bebederos 4 horas antes de la vacunacion para que las aves tuvieran sed y consumieran el agua con la vacuna lo antes posible.

Lote D.-Aves inmunizada por via intradermica por puncion en el pliegue del ala a los 28 dias de edad mediante la aplicacion de 0.03 ml de la vacuna antes mencionada.

Se observaron individualmente a las aves durante los diez dias posteriores a la inmunizacion (los animales revisados eran separados del resto de la parvada para no confundirlos) y se registro el numero de animales que presentaron reacciones posvacunales en cada lote y se clasificaron de acuerdo al siguiente cuadro:

- (-) Negativos o sin signos
- (+ -) Ligero desorden respiratorio
- (+) Blefaroconjuntivitis o Estornudo (boqueo)
- (++) Blefaroconjuntivitis, estornudo y depresion
- (+++) Estornudo, conjuntivitis y muerte antes del dia 10 posinoculación

En el lote D se considero a las aves que presentaron una lesion en el sitio de aplicacion de la vacuna como positiva (+) a la reaccion posvacunal contra la LTA.

A los 14 y 21 dias posinoculación se tomaron muestras sanguineas con y sin anticoagulante de los cuatro lotes para determinar los niveles de anticuerpos sericos e inmunidad celular mediante las tecnicas de virus suero neutralizacion y Mit para inmunidad celular.

A los cuarenta y seis dias de edad se inoculó por via intrasinusal 0.1 ml. de Haemophilus paragallinarum, ya que el virus de LTA requiere de una lesion primaria en aparato respiratorio para poder replicarse. Tres dias despues los animales fueron inoculados por via intratraqueal con 0.1 ml. de virus patógeno de LTA con un titulo de 10×4.3 DIFP 50%/ml (obtenido del Departamento de Produccion Animal : Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia) . Se tomaron muestras de las aves afectadas de manera sobreaguda por la enfermedad (3 dias posinoculación) para reaislar el virus por inoculación de las muestras en embrion de pollo y llevar acabo estudios histopatologicos de las traqueas para observar los cuerpos de inclusion intranucleares de la LTA.

Se hizo un muestreo sanguíneo con y sin anticoagulante de las aves que sobrevivieron al desafío para conocer sus niveles de anticuerpos sericos e inmunidad celular.

ESTUDIOS DE LABORATORIO

MIF (Factor de la Inhibición de la Migración de los Macrófagos).- Se obtuvieron muestras de 3ml. de sangre completa usando como anticoagulante EDTA al 0.15% por la vena radial del ala y se realizó la técnica de MIF descrita por Retana. Se consideraron positivas en esta prueba aquellas muestras con un porcentaje igual o mayor al 15% de inhibición de la migración de los macrófagos (34, 42).

VSN (Virus Suero Neutralización) .- Se obtuvieron 2 ml de sangre sin anticoagulante apartir de la vena radial del ala; fueron separados los sueros de estas muestras y se mezclaron en grupos de cinco al azar de cada lote y posteriormente se realizó con ellos el método alfa de VSN (inoculando tres embriones de pollo por dilución) según la técnica descrita por Perez y Hitchner para LTA (14, 33).

AI SLAM IENTO DEL VIRUS.- Se obtuvieron traqueas de los animales afectados de forma sobreaguda por el virus de la LTA y se procedió a preparar un inóculo, mediante la maceración de una muestra de un gramo de tejido en un mortero. Se adicionó 9 ml de solución salina fisiológica estéril y antibiotico al macerado. Se congeló y

descongeló en tres ocasiones para romper las células y permitir la salida del virus. Posteriormente se inoculó 0.2 ml del preparado a embriones de 9 días de edad por MCA. Se mantuvieron en incubación durante cinco días, fueron sacrificados por congelación y se observó la formación de pústulas blanquecinas en MCA por efecto del virus, las cuales fueron enviadas a histopatología para observar los cuerpos de inclusión acidófilos intranucleares de Seifreid (27, 14).

HISTOPATOLOGIA.- Se obtuvieron traqueas de los animales afectados de manera sobreaguda por el virus de LTA, se hicieron cortes de 1 cm y fueron fijados en formol al 10%, para ser posteriormente procesados, incluidos en parafina, cortados, teñidos con hematoxilina-eosina y observar al microscopio los cuerpos de inclusión intranucleares de Seifreid patognomónicos de la enfermedad.

TITULACION DE LA VACUNA.- La vacuna utilizada fue reconstituida en 30 ml. de diluyente comercial, posteriormente se realizaron diluciones decuples (se realizaron seis diluciones) y se inocularon 0.1 ml. de cada dilución a cinco embriones de 9 días de edad por MCA. Se incubaron durante cinco días y posteriormente fueron sacrificados por congelación, observando la formación de pústulas blanquecinas en MCA por efecto del virus vacunal. Se obtuvo el título de la vacuna mediante el método de Reed & Muench, tomando como referencia las lesiones observadas en MCA (31).

RESULTADOS

Lote A (Testigo). - No se detecto formacion de anticuerpos a nivel humoral, ni estimulacion de inmunidad celular contra la LTA por las pruebas de VSN y de MIF en los muestreos realizados antes de la vacunacion, y 14 y 21 dias despues de esta. Durante el desafio, el 100% de las aves presentaron signos de la enfermedad (Cuadro 3 y Grafica 3) consistentes en estertores traqueales, estornudo, conjuntivitis ligera a severa blefaroconjuntivitis, secrecion nasal y depresion. El equipo y las paredes de la unidad de aislamiento estaban manchados con coagulos de sangre. Se registro un 20% de mortalidad en la parvada a causa del desafio, al realizar la necropsia se observo en el interior de la traquea la formacion de coagulos de sangre y exudados que iban de serosos a sanguinolentos en todas las aves, los demas organos no mostraban cambios patologicos aparentes. Para confirmar la presencia del virus de la LTA, se enviaron traqueas en formol al 10% y en recipientes esteriles para la realizacion de estudios histopatologicos y virologicos. En las celulas de las pustulas se observaron al microscopio corpusculos de inclusion intranucleares de Seifreud, patognomicos de la LTA. En las pruebas de VSN y MIF realizadas despues del desafio se registraron altos niveles de anticuerpos neutralizantes (Cuadro 7 y Grafica 1), asi como de MIF (Cuadro 8 y Grafica 2).

Lote E (Vacuna Ocular).- No se detectaron anticuerpos séricos, ni inmunidad celular contra la LIA por las pruebas de VSN y MIF, realizadas antes de la vacunación por vía ocular (Cuadro 7 y 8, Gráfica 1 y 2). En los primeros dos días después de aplicada la vacunación las aves no presentaron ningún cambio, sin embargo al tercer día un 50% de la parvada presentó una ligera irritación ocular y un 10% de estornudo; al cuarto día se observó un 70% de conjuntivitis ligera y el estornudo continuo en la misma proporción. El quinto día el 80% mostraba una severa blefaroconjuntivitis, con secreción ocular serosa, depresión (disminución en el consumo de alimento) y un 10 a 15% de estornudo; el sexto día la blefaroconjuntivitis se presentó en el 100% de la parvada, los signos respiratorios y la depresión continuaron presentes. Al séptimo día disminuyó a un 70% la cantidad de aves con blefaroconjuntivitis, además de que solo el 50% de las afectadas continuaba presentando secreción ocular. El estornudo se mantuvo presente, sin embargo estas se mostraban mucho más activas. El octavo día se observó un 40% de la parvada con conjuntivitis muy ligera, aunque todavía el 10% continuaba teniendo secreción ocular. El estornudo continuo presente en la misma proporción antes mencionada. El noveno y décimo día posvacunación se observó conjuntivitis muy ligera y estornudo en un 10 a 15% de la parvada. Este lote presentó la reacción posvacunal más severa (Cuadro 1 y 2 y Gráfica 3), y obtuvo los títulos de anticuerpos circulantes e inmunidad celular más altos para las pruebas de VSN y MIF realizadas a los 14 y 21 días posvacunación, también fue positivo a estas pruebas después del desafío (Cuadro 7 y 8, Gráficas 1 y 2). Durante el desafío este lote mostró ciertos desordenes respiratorios consistentes en estertores traqueales.

estornudo, secreción nasal, además de conjuntivitis y depresión ligera, sin embargo no se registro mortalidad y los signos desaparecieron casi en su totalidad entre el cuarto y quinto día (Cuadro 4 y Gráfica 3), siendo de esta manera el grupo que mejor resistió el desafío.

Lote C (Agua de Bebida).- No se detectaron anticuerpos sericos ni inmunidad celular en las pruebas de VSN y MIF realizadas antes de la aplicacion de la vacuna (Cuadro 7 y 8, Gráfica 1 y 2). En los primeros dos dias posvacunacion no se registro ninguna alteracion en la parvada. Al tercer dia se observo una irritacion ocular muy discreta y un 20 a 30% de estornudo; el cuarto dia continuo el estornudo en la misma proporcion y se hizo un poco mas evidente la irritacion ocular, aunque esta no llegaba a ser una franca conjuntivitis. Estos signos se mantuvieron hasta el octavo dia en que el estornudo disminuyo y desaparecio la irritacion ocular por completo. El noveno y decimo dia se observaban totalmente normales (Cuadro 1 y 2 y Grafica 3). Las aves resultaron positivas a las pruebas de VSN y MIF realizadas a los 14 y 21 dias posvacunacion, pero no con altos titulos en ninguna de las pruebas. Tambien fueron positivas a dichas pruebas en alto grado despues del desafio (Cuadro 7 y 8, Gráfica 1 y 2). Durante el desafio, el 100% mostraron signos de LTA consistentes en estertores traqueales, estornudo, conjuntivitis ligera a severa blefaroconjuntivitis, secrecion nasal y depresion (Cuadro 5 y Gráfica 3). El equipo y las paredes de la unidad de aislamiento tenian coágulos de sangre adheridos a su superficie. Se registro un 20% de mortalidad debida al desafio, la cual, a la necropsia presento graves traqueitis hemorragicas, ademas

de formación de coágulos y exudados en el interior de esta; los demás órganos no mostraban cambios patológicos aparentes. Se confirmó la presencia del virus de LTA mediante estudios histopatológicos y virológicos de las traqueas de los animales afectados.

Lote D (Funcion en el Pliegue del Ala). - No se detectaron anticuerpos séricos ni inmunidad celular mediante las pruebas de VSN y MIF realizadas antes de la vacunación (Cuadro 7 y 8, Gráfica 1 y 2). En los tres primeros días después de la vacunación las aves no presentaron ninguna alteración: sin embargo al cuarto día hubo un 5 a 10% de estornudo, el cual aumento ligeramente el quinto día (20%), para disminuir nuevamente el sexto día a un 10% y mantenerse así hasta el noveno día en el que desapareció (Cuadro 1, 2 y Gráfica 3). Las pruebas realizadas a los 14 y 21 días posvacunación fueron positivas a MIF en regular proporción, mientras que casi no se detectaron anticuerpos séricos mediante la prueba de VSN. En el muestreo realizado después del desafío la parvada resulto positiva a ambas pruebas (Cuadro 7 y 8, Gráfica 1 y 2). Durante la exposición al virus patógeno de LTA, se observaron signos de la enfermedad consistentes en estertores traqueales, estornudo, conjuntivitis, blefaroconjuntivitis, secreción nasal y depresión (Cuadro 6 y Gráfica 3). Además las paredes y equipo de la unidad de aislamiento mostraban coágulos de sangre en su superficie. El desafío provocó un 31% de mortalidad en la parvada, la cual fue la más elevada de todos los lotes. A la necropsia se observaban exudados que iban de serosos a sanguinolentos, además de coágulos de sangre y formación de pseudomembranas en el interior de la tráquea. Los demás órganos no mostraban cambios patológicos aparentes. Se

determino la presencia del virus de la LTA mediante pruebas histopatológicas y virológicas de las traqueas afectadas.

C U A D R O 1

Comparacion de la reaccion posvacunal a la inmunizacion contra LTA por via ocular, agua de bebida y puncion en el pliegue del ala.

V I A D E A P L I C A C I O N D E L A V A C U N A			
DIAS	OCULAR	AGUA DE BEBIDA	PUNCION EN EL PLIEGUE
PI			DEL ALA
1	-	-	-
2	-	-	-
3	- +	- +	-
4	+	+	- +
5	++	+	+
6	++	+	- +
7	++	+	- +
8	++	- +	- +
9	+	-	-
10	+	-	-

(-) = Negativo (- +) = Ligero desorden respiratorio

(+) = Blefaroconjuntivitis o Estornudo

(+ +) = Blefaroconjuntivitis, estornudo y depresion.

(+ + +) = Estornudo, conjuntivitis y muerte antes del dia 10 Pi.

Pi = Posinoculacion

C U A D R O 2

Comparación del porcentaje de signos posvacunales presentados por la aplicación de la vacuna contra LTA por vía ocular, agua de bebida y punción en el pliegue del ala.

SIGNOS Y VIA DE APLICACION

U1A	E			C o CB		
	O	A	P	U	A	P
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	10	20-30	-	60	-	-
4	10	20-30	5-10	70	10	-
5	10-15	20-30	20	80	10	-
6	10-15	20-30	10	100	10	-
7	10-15	20-30	10	70	5	-
8	10-15	10	10	40	-	-
9	10-15	-	-	10-20	-	-
10	10-15	-	-	10	-	-

Resultados expresados en porcentaje

PI = Posinoculación

C o CB = Conjuntivitis o Blefarconjuntivitis E = Estornudo

O = Ocular

P = Pliegue del Ala

A = Agua de Bebida

C U A D R O 3

Porcentajes de signos observados por el lote testigo
durante el desafío
con virus patogeno de LTA

S I G N O S						
DIAS	PD	E T	E	C o CB	SN	M
1		-	-	-	-	-
2		10	50	35	30	-
3		100	50	60	60	14
4		80	50	60	60	6
5		50	50	30	50	-
6		30	30	10	30	-
7		30	30	6	30	-

*Resultados en Porcentajes

PD = Posdesafio

E T = Estertor Traqueal E = Estornudo M = Mortalidad

C o CB = Conjuntivitis o Blefaroconjuntivitis

S N = Secrecion Nasal

- = Negativos

C U A D R O

Porcentaje de signos observados por el lote vacunado
por via ocular durante el desafio con virus patogeno de LTA.

S I G N O S

DIAS	PD	E T	E	C o CB	S N	M
1	-	-	-	-	-	-
2	10	45	50	30	-	-
3	30	30	25	25	-	-
4	10	20	10	10	-	-
5	10	10	-	-	-	-
6	10	10	-	-	-	-
7	10	10	-	-	-	-

* Resultados expresados en Porcentajes

PD = Posdesafio

E T = Estertor Traqueal E = Estornudo M = Mortalidad

C o CB = Conjuntivitis o Bleraroconjuntivitis

S N = Secrecion Nasal

- = Negativo

CUADRO 5

Porcentaje de signos observados por el lote
vacunado por agua de bebida
durante el desafío con virus patógeno de LTA.

S I G N O S

DIAS	PD	E T	E	C o CB	S N	M
1		-	-	-	-	-
2		20	50	30	15	-
3		100	90	60	30	14
4		80	70	50	20	3
5		50	70	30	20	3
6		40	70	20	20	-
7		40	70	20	20	-

* Resultados expresados en Porcentajes

PD = Posdesafío

ET = Estertor Traqueal

E = Estornudo

M = Mortalidad

C o CB = Conjuntivitis o Blefaroconjuntivitis

SN = Secreción Nasal

- = Negativos

CUADRO 5

Porcentaje de signos observados por el lote vacunado por puncion
 en el pliegue del ala
 durante el desafio con virus patogeno de LTA.

S I G N O S						
DIAS PD	E T	E	C o CB	S N	M	
1	-	-	-	-	-	-
2	35	60	40	10	3	
3	80	70	40	20	14	
4	50	70	40	50	14	
5	30	60	30	60	-	
6	20	60	-	40	-	
7	20	60	-	40	-	

* Resultados expresados en Porcentajes

P D = Posdesafio

E T = Estertor Traqueal

E = Estornudo

M = Mortalidad

C o CB = Conjuntivitis o Blefaroconjuntivitis

S N = Secrecion Nasal

- = Negativo

C U A D R O 7

Resultados de las pruebas de VSN
obtenidos de los lotes testigo y vacunados contra LTA
ocularmente, en agua de bebida y punción en el pliegue del ala

L O T E S

MUESTRA	CONTROL	OCULAR	AGUA DE BEBIDA	PLIEGUE DEL ALA
A V *	-	-	-	-
14 PV *	-	1.96	1.16	0.74
21 PV *	-	2.50	1.51	1.25
P D *	4.75	4.75	4.75	3.51

* Los resultados indican el índice de VSN.

A V = Antes de la Vacunación

14 PV = 14 días posvacunación

P D = Posdesatio

21 PV = 21 días posvacunación

C U A D R O 5

Resultados de las pruebas de MIF
 obtenidos de los lotes testigo y vacunados contra LTA
 ocularmente, por agua de bebida y puncion en el pliegue del ala

L E G E N D A

MUESTRA	CONTROL	OCULAR	AGUA DE BEBIDA	PLIEGUE DEL ALA
A V *	-	-	-	-
14 PV *	-	40	15.6	26
21 PV *	-	52	26.6	39
P D *	54	90	70	62.8

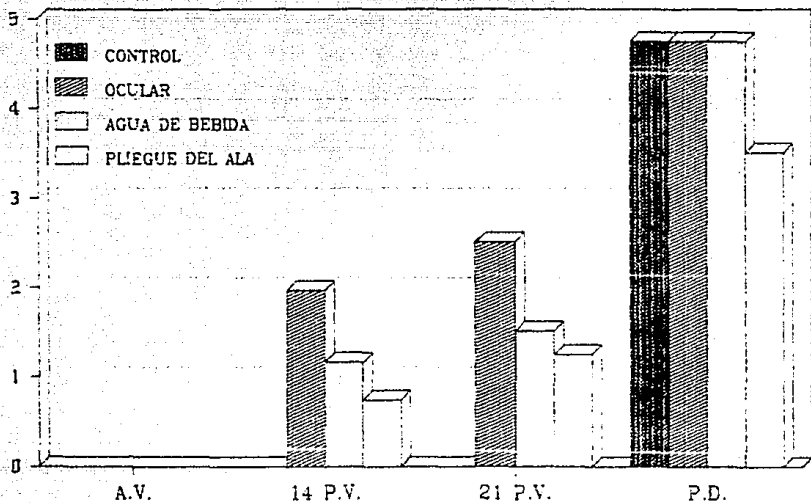
* Los resultados indican porcentaje de MIF.

A V = Antes de la Vacunacion 14 PV = 14 dias posvacunacion

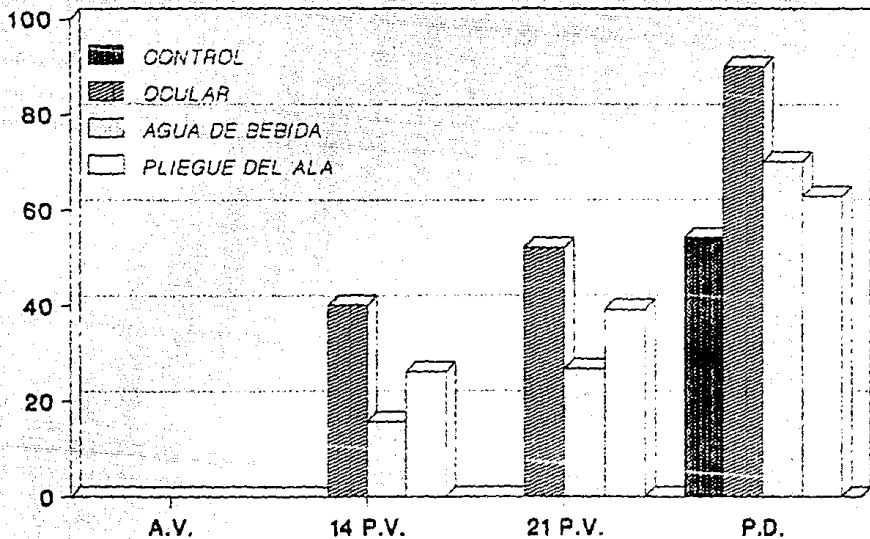
P D = Posdesatino 21 PV = 21 dias posvacunacion

Grafica 1.

TITULOS DE VIRUS SUERO NEUTRALIZACION
POR DIFERENTES VIAS DE VACUNACION

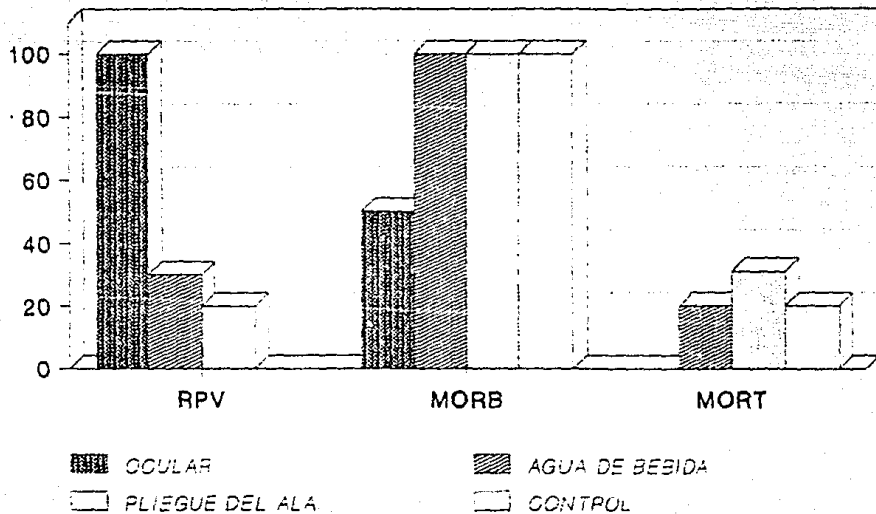


GRAFICA 2. PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA MIGRACION DE LOS MACROFAGOS POR DIFERENTES VIAS DE VACUNACION



GRAFICA 3.

REACCION POSVAQUINAL (RPV), MORBILIDAD Y MORTALIDAD



D I S C U S I O N

Los resultados obtenidos en el presente experimento indican que la vacuna de LTA aplicada por via ocular produce las reacciones posvacunales mas severas , que consisten principalmente en una blefaroconjuntivitis y estornudo, esto coincide con lo indicado por Muelomans (30), pero no asi con lo observado por Andreasen et al. (2, 3) , quienes aplicaron una vacuna de LTA por esta misma via en pollos de engorda y gallina de postura y no registraron ninguna reaccion posvacunal, quizá esta respuesta se puede deber a la cepa vacunal que utilizaron o bien a las condiciones ambientales en que realizaron el experimento. Sin embargo, en Mexico, en la práctica diaria la aplicacion por esta via de la vacuna de LTA si produce reacciones posvacunales muy severas al quinto dia despues de la vacunacion a consecuencia de la replicación del virus en conjuntiva y aparato respiratorio superior, que llega a causar complicaciones secundarias muy graves*, las cuales tal vez no fueron observadas en el presente trabajo debido a que las aves se encontraban en un medio ambiente controlado y a que se llevaron a cabo medidas higienico sanitarias muy estrictas , que muchas veces no se toman en cuenta en la practica cotidiana y en la avicultura actual son básicas para obtener resultados optimos (43).

* Cueto, R., comunicacion personal. 1990.

Ademas debemos recordar que el virus de la LTA pertenece taxonomicamente a la subfamilia Alphaherpesvirinae, cuyos integrantes (virus de la rinotraqueitis bovina, virus de la rinopneumonitis equina, virus de la enfermedad de Aujeszky, etc.) se caracterizan por quedar en forma latente, tener un ciclo de replicacion corto y un efecto altamente citopatico hacia las celulas por las que tienen tropismo (27), lo cual apoya el hecho de que el virus vacunal debe producir una cierta reaccion despues de su aplicacion, ya que como indica Izuchi (22, 23) las vacunas comerciales elaboradas para prevenir la enfermedad continuan siendo patogenicas en cierto grado para las aves. La vacunacion en agua de bebida provocó una reaccion posvacunal casi imperceptible, lo cual coincide con lo reportado por Andreasen (2, 3), Hilbink (13), Samberg (40) y Hayles (12); esto puede deberse a que al administrar la vacuna por esta via el virus muchas veces no llega en la concentracion adecuada a los tejidos en los cuales tiene una replicacion optima. Por su parte la aplicacion de la vacuna contra LTA por puncion en el pliegue del ala provocó una reaccion posvacunal inperceptible en vias respiratorias, ademas de no producir ningun tipo de lesion en el sitio de vacunacion, lo cual no coincide con lo reportado por ciertos investigadores australianos, quienes indican que la aplicacion de la vacuna por puncion en el pliegue del ala causa la formacion de una pustula al quinto dia posvacunacion (17, 19, 20). Esto puede deberse a que el virus vacunal utilizado por estos autores este más adaptado a piel y que sus vacunas tengan titulos más elevados o bien a que usen otro tipo diluyente que proteja al virus y le permita llevar a cabo su replicacion de manera adecuada al permanecer un

Mayor periodo de tiempo en contacto con el ave. Es importante señalar que cuando se acostumbraba vacunar por escarificación de la cloaca, siempre había una reacción consistente en inflamación y formación de pustulas en el sitio de aplicación, y que esta respuesta inflamatoria local posvacunal y la protección conferida a la parvada eran directamente proporcionales (41).

En el presente trabajo se observó que la vía de aplicación ocular protegió a la parvada en un 100% contra el virus patógeno, a pesar de no haber producido niveles muy elevados de anticuerpos neutralizantes en suero, pues las aves solo mostraron un leve desorden respiratorio del cual se recuperaron totalmente. Lo anterior coincide con lo reportado por Jordan (25) y Andreasen (2, 3), quienes dicen que la vacuna ocular confiere una protección adecuada a pesar de no existir niveles de anticuerpos séricos muy elevados, tal vez se tenga que producir IgA secretora para obtener una inmunidad completa contra el virus. Las aves vacunadas en agua de bebida no lograron desarrollar una inmunidad adecuada para resistir el desafío contra la LTA, pues presentaron toda la signología de la enfermedad y tuvieron un porcentaje de mortalidad similar al del lote testigo. Lo anterior no coincide con lo reportado por Andreasen (24, 25), Hilbink (7) y Samberg (31), los cuales reportan haber obtenido buenos niveles de protección al aplicar un inmunógeno con un título mínimo de 10×2 D₅₀/ml por agua de bebida. Sin embargo Hitchner (35) y Jordan (26) mencionan que para lograr una inmunidad satisfactoria al aplicar la vacuna en agua de bebida es necesario administrar de ocho a diez veces la dosis aplicada por vía intraocular. Tal vez esta gran

diversidad de infecciones se deba a las distintas cepas vacunales y de desafío utilizadas en los diferentes experimentos, así como a la variedad de concentraciones de virus activos que llegan a ingerir las aves y que logran replicarse de manera adecuada en el interior de estas. Por último la vacunación por punción en el pliegue del ala no produjo una inmunidad satisfactoria, ya que se observaron signos de la enfermedad y la parvada registro un 31% de mortalidad. Lo anterior no coincide con lo reportado por los investigadores australianos (17, 19, 20) quienes obtuvieron una buena protección al aplicar la vacuna por esta vía, lo cual puede deberse a lo anteriormente mencionado. Por otra parte la vía que estimuló más poderosamente la producción de anticuerpos neutralizantes a nivel sérico y de inmunidad celular fue la intraocular. Andreasen (2) menciona que la prueba de VSN no es útil para determinar la protección de un ave hacia la enfermedad, pues existen animales con altos títulos de anticuerpos neutralizantes que llegan a sufrir la L'A, pero puede ser útil si se obtiene la media geométrica de la parvada para determinar el nivel de inmunidad y la capacidad de resistir un desafío, aunque no logro determinar los niveles de VSN indicativos de protección. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo en el cual el grupo inmunizado por vía ocular obtuvo los títulos más elevados de VSN, aunque en realidad estos fueron bajos. Jordan menciona que la inmunidad celular y posiblemente la producción de IgA secretora sea necesaria para obtener una inmunidad completa, aunque cuando se aplicaba la vacuna por vía intracelular a base de virus activo patógeno, no había producción de IgA secretora y si se desarrollaba protección contra la

enfermedad. Robertson sugiere que la inmunidad celular es la responsable de la protección contra la LTA. Este investigador observó que en aves bursectomizadas al día de edad y vacunadas posteriormente no había formación de anticuerpos, pero las aves si presentaban protección contra el virus patógeno, mientras que al timectomizarlas y bursectomizarlas no había protección contra la enfermedad. Lo anterior explica el por qué los niveles de VSN no son confiables para determinar la protección de los animales. Actualmente se han realizado varios trabajos que demuestran la importancia de la inmunidad celular en infecciones virales (39, 7, 6), bacterianas (4), parasitarias (10) y enfermedades tumorales (26). La LTA no es la excepción y el hecho de que en el presente trabajo las aves que obtuvieron el porcentaje más elevado de MIF, fueron las que resistieron adecuadamente el desafío hace pensar en que la inmunidad celular juega un papel primordial. El menor porcentaje que resistió el desafío fue de 52%, lo cual nos indica que aunque los estándares de esta prueba indiquen que las muestras que registren un 15% de inhibición de la migración son positivas, este porcentaje no es indicativo de protección en la LTA, por lo que es necesario realizar más estudios para determinar el porcentaje de MIF protector a un desafío contra el virus patógeno de la LTA (35), y de esta manera poder utilizar dicha prueba para determinar la inmunidad y capacidad para resistir un desafío. Cabe hacer mención que a pesar de haber fallado la vacunación en pliegue del ala, el virus logró replicarse y estimular la inmunidad celular en mejor grado que al ser aplicado en agua de bebida, además no causa reacciones posvacunales tan severas como la vacunación ocular, por

lo que esta via de vacunacion mediante ciertas modificaciones a la tecnica utilizada en este trabajo podria ser una buena opcion para la inmunizacion contra la LTA. Las posibles variaciones serian:

a) Usar un diluyente que permitiera permanecer al virus mas tiempo en contacto con el ave.

b) Aplicar una mayor concentracion de virus o una mayor cantidad de vacuna al ave.

c) Adaptar el virus a piel para que de esta manera tenga una replica adecuada en el sitio de aplicacion.

CONCLUSIONES

1.- La vacuna aplicada por via intracocular con un titulo de 10×4.8 DIEP 50%/ml, a pesar de producir las reacciones posvacunales mas severas, protegio al 100% de la parvada contra el virus patogeno de la LTA, ademàs de alcanzar los titulos mas altos en la prueba de VSN y el porcentaje mas elevado de MIF.

2.- La vacuna aplicada por agua de bebida con un titulo de 10×4.8 DIEP 50%/ml no produjo un buen nivel de proteccion, por lo que esta via de inmunizacion no se recomienda debido a la ingestion desigual de la vacuna y al desarrollo insuficiente de inmunidad por parte de las aves.

3.- La vacuna aplicada por puncion en el pliegue del ala con un titulo de 10×4.8 DIEP 50%/ml no logro proteger a las aves contra el virus patogeno de la LTA. Sin embargo el virus vacunal si logro replicarse y estimular, aunque no de manera adecuada la inmunidad celular, por lo que es necesario realizar mas estudios con respecto a esta via de inmunizacion.

4.- La inmunidad celular juega un papel primordial en la protección contra el virus de la LTA y es posible medir los niveles de inmunidad celular mediante la prueba de MIF.

5.- Es necesario realizar estudios para conocer la importancia de la IgA secretora en la enfermedad de LTA.

6.- Es necesario realizar más estudios encaminados a determinar los niveles de inmunidad y las pruebas de laboratorio adecuadas para poder conocer en forma real si las aves están protegidas o no contra el virus de la LTA.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Addair, B.M., Mickillop, E.R. and Burns, K.: Survey of antibodies to infectious laryngotracheitis virus in Northern Ireland poultry flocks. Vet Rec., 117 : 275 - 276 (1985)
- 2.- Andreason Jr., J.R., Glisson, J.R., Goodwin, M.A., Resurrecion, K.S., Villegas, P. and Brown, J.: Studies of infectious laryngotracheitis vaccines : Immunity in broilers. Avian Dis., 33 : 516 - 523 (1989)
- 3.- Andreason Jr., J.R., Glisson, J.R., Goodwin, M.A., Resurrecion, K.S., Villegas, P. and Brown, J.: Studies in infectious laryngotracheitis vaccines : Immunity in layers. Avian Dis., 33 : 524 - 530 (1989)
- 4.- Baba, T.: Cell mediated immune protection in chickens against Pasteurella multocida. Res. Vet. Sci., 36 : 225 - 230 (1984)
- 5.- Bagust, T.J., Calnek, B.W. and Fahey, K.J.: Gallid 1 Herpesvirus infection in the chickens. 3.- Reinvestigation of the pathogenesis of infectious laryngotracheitis in acute and early post-acute respiratory disease. Avian Dis., 30 : 179 - 190 (1986)

6.- Bazendale, W.: Immunity to fowl pox. In: Avian Immunity. British Poultry Science, Ltd., Edinburg, p. 255-261, 1981.

7.- Chauhan, H.V.S., Verma, K.C., Sah, R.L. and Sharma, B.D.: Prediction of the occurrence of Marek's disease in chickens on the basis of the quantitation of cell-mediated immunity. Res. Vet. Sci. 32 : 133 - 135 (1984)

8.- Clarke, J.K., Robertson, G.M. and Purcell, D.A.: Spray vaccination of chickens using infectious laryngotracheitis virus. Aust. Vet. J. 56: 424-428 (1980)

9.- Curtis, P.E. and Walls, A.S.: Infectious laryngotracheitis. Vet. Rec. 112 : 486 (1983)

10.- Davis, P.J.: Immunity to coccidia. In: Avian Immunity. British Poultry Science, Ltd., Edinburg, p. 361 - 385 , 1981.

11.- Hayashi, S., Odigiry, Y., Kotani, T. and Horiuchi, I.: Pathological changes of tracheal mucosa in chickens infected with infectious laryngotracheitis virus. Avian Dis. 29 : 943 - 950 (1985)

12.- Hayles, L.B., Newby, W.C., Gasperdone, H. and Gilchrist, E.W.: Immunization of broilers chickens with a commercial infectious laryngotracheitis vaccine in the drinking water. Can. J. Comp. Med. 40 : 129 - 134 (1976)

13.- Hilbink, F., Smit, T. and Jadin, H. : Drinking water vaccination against infectious laryngotracheitis. Can. J. Comp. Med., 45 : 120 - 123 (1981)

14.- Hitchner, S.B., Domermuth, C.H., Purchase, H.G. and Williams, J.E.: Isolation and Identification of Avian Pathogens. American Association of Avian Pathologists, Endwell, New York, 1980.

15.- Hitchner, S.B.: Virus concentration as a limiting factor in immunity response to laryngotracheitis vaccines. J. Am. Vet. Med. Ass. 154: 1425 (1969)

16.- Hofstad, M.S.: Diseases of Poultry 8th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1984.

17.- Howes, D.W., Tannock, G.A. and Sinkovic, B. Proc. XII World's Poultry Congress, Sydney, Australia, p. 344 - 348, 1982.

18.- Hughes, C.S., Jones, R.C., Gaskell, R.M., Jordan, F.T.W. and Bradbarg, J.M.: Demonstration in live chickens of the carrier state in infectious laryngotracheitis. Rec. Vet. Sci. 42 : 407 - 410 (1987)

19.- Hunt, S. The feather follicle method of vaccinating baby chicks with laryngotracheitis vaccine. Proc. Poultry Science Convention, Sydney, Australia, p. 29 - 30, 1959.

20.- Hunt, S. : Field experience with feather follicle vaccination of day-old chickens for infectious laryngotracheitis. Proc. XII World's Poultry Congress, Sydney, Australia, p. 335 - 338- 1962.

21.- Hunton, P.: Administración de Vacunas. Shaver Focus, 18 : 4 - 6 (1989)

22.- Izuchi, T., Haseyawa, A. and Miyamoto, T.: Studies on the live virus vaccine against infectious laryngotracheitis properties of attenuated strain C-7. Avian Dis. 27 : 918 - 926 (1982)

23.- Izuchi, T., Haseyawa, A. and Miyamoto, T.: Studies on the live virus vaccine against infectious laryngotracheitis of chickens II Evaluation of the tissue-cultured-modified strain C-7 in laboratory and field trials. Avian Dis. 28 : 323 - 330 (1983)

24.- Jordan, F.T.W.: A review of the literature on infectious laryngotracheitis. Avian Dis. 10 : 1 -26 (1966)

25.- Jordan, F.T.W.: Immunity to laryngotracheitis. In: Avian Immunity. British Poultry Science, Ltd., Edinburg, p. 245 -254, 1981.

26.- Lamont, S.J. and Smyth Jr., J.R.: Effect of selection for delayed melanosis on immune response in chickens. 2. Cell-Mediated Immunity. Poult. Sci. 93 : 440 - 442 (1984)

- 27.- Mohanty, B.S. y Dutta, S.K.: Virologia Veterinaria. Nueva Editorial Interamericana, Mexico, D.F., 1985.
- 28.- Molgaard, P.C. and Cavett, J.W.: The feather follicle method of vaccinating with fowl laryngotracheitis vaccine. Poult. Sci. 26: 563 - 567 (1947)
- 29.- Mosqueda, A. y Lucio, B.: Enfermedades comunes de las aves domesticas. 2da ed., Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico, D.F., 1986.
- 30.- Muelomans, G.: La laryngotracheitis infectieuse. Rec. Med. Vet., 160 : 951 - 959 (1984)
- 31.- National Academy of Sciences - National Research Council: Methods for the examination of poultry biologics. National Academy of Sciences - National Research Council, Washington, D.C., 1959.
- 32.- Payne, L.N.: Immunity to lymphoid leukosis, rous sarcoma and reticuloendotheliosis. In : Avian Immunity. British Poultry Science, 14d., Edinburg, p. 285 - 299, 1981.
- 33.- Pérez, B.R.: Virus suero neutralizacion. Memorias Inmunologia Aviar. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de Mexico, Mexico, D.F., p. 68 - 70, 1988.

34.- Ketana, R.A.: Aplicacion practica de la prueba de contrainmuno-electroforesis y MIF en el diagnostico de enfermedades aviarias. Memorias Inmunologia Aviar. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico, D.F., p. 50 - 55, 1988.

35.- Ketana, R.A.: La prueba de MIF en el control de las vacunas contra la infeccion de la bolsa de fabricio (IBF). Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico, D.F., 1981.

36.- Richardson, J.B., Notariis, A., Ferguson, C.C. and Boucher, R.C.: Effects of a viral laryngotracheitis on the epithelial barrier of chicken airways. Lab. Invest., 44 : 144- 150 (1981)

37.- Robertson, G.M. and Egerton, J.R.: Replication of infectious laryngotracheitis virus in chickens following vaccination. Aust. Vet. J. 57 : 119 - 123 (1981)

38.- Robertson, G.M.: The role of bursa-dependent responses in immunity to infectious laryngotracheitis. Res. Vet. Sci., 22 : 281 - 284. (1977)

39.- House, B.T. and Horohov, D.W.: Cytotoxic lymphocytes in herpes virus infections. Vet. Immunol. Immunopathol., 5 : 35 - 66 (1984)

40.- Sanberg, J., Cuperstein, E., Bendheim, U. and Aronovici, I.: The development of a vaccine against avian infectious laryngotracheitis. IV. Immunization of chickens with a modified laryngotracheitis vaccine in the drinking water. Avian Dis. 15 : 413 - 417 (1971)

41.- Sanchez, W.C.: Determinacion del tiempo minimo de proteccion requerido por una vacuna de laringotracheitis para el control de un brote de campo en condiciones experimentales. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico, D.F., 1966.

42.- Solyom, F., Barhomm, S. and Drarai, G.: Development of inactivated infectious laryngotracheitis virus vaccina. Acta Microbio. Hungarica, 31 : 266 - 267 (1984)

43.- Téllez, I.G.: Limpieza y desinfeccion de casetas avícolas. Memorias I Curso de Manejo para la Prevencion de Problemas Aviáres. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico, D.F., p. 1 - 14, 1989.

44.- Tizard, I.: Inmunologia Veterinaria. 3ra ed., Nueva Editorial Interamericana, Mexico, D.F., 1989.