



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

EFFECTO DE UN ESTABILIZADOR DE VACUNAS PARA
APLICACIÓN EN AGUA DE BEBIDA SOBRE UNA
VACUNA CONTRA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

LUIS DAMIAN MONTESINOS GARCÍA

ASESOR: Dr. NÉSTOR LEDESMA MARTÍNEZ

México, D. F.

2009





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

*A mis padres por todos sus esfuerzos y sacrificios, apoyo, cariño y confianza,
ya que sin estos no habría llegado a este punto final de mi carrera,
que mi triunfo profesional lo sientan como suyo.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo incondicional durante toda la carrera.

A mi asesor, el Dr. Nestor Ledesma por tener confianza en mí para hacer este proyecto y por su tiempo y apoyo para sacarlo adelante.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al personal del DPA: Aves por sus enseñanzas.

A mis profesores que tanto ayudaron a mi formación.

A mi jurado por sus aportaciones a la tesis.

A mis amigos por su apoyo y amistad, en especial a Cristina y Norma por estar conmigo en los momentos más difíciles.

A Israel, Cristina, Norma, Genoveva, Raquel, Xochitl, Guillermo y Nadia por su ayuda.

Al técnico José González por su asesoría y ayuda para las pruebas de serología.

A FERTILEGS por la donación de los embriones para el estudio.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
HIPOTESIS	11
OBJETIVO	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIÓN	21
REFERENCIAS	22
CUADROS	27
GRAFICAS	30

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Agua corriente
AD	Agua destilada
AM	Agua mineral
AP	Aglutinación en Placa
ARN	Ácido ribonucleico
C/E	Con estabilizador
C/E + Cl	Con estabilizador con cloro
DIEP	Dosis Infectante Embrión de Pollo
DPA: Aves	Departamento de Producción Animal: Aves
EDTA	Ácido etilendiaminotetrácico
ENC	Enfermedad de Newcastle
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
G	Gramo
HOCI	Ácido hipocloroso
HI	Inhibición de la Hemoaglutinación
Kb	Kilobase
MI	Mililitro
NaClO	Hipoclorito de sodio
NOM	Norma Oficial Mexicana
OIE	Organización Mundial de Salud Animal
pH	Potencial hidrogeno
Ppm	Partes por millón
SPF	Libre de patógenos específicos
S/E	Sin estabilizador
S/E + Cl	Sin estabilizador con cloro
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
°C	Grado Celsius

RESUMEN

MONTESINOS GARCÍA LUIS DAMIAN. Efecto de un estabilizador de vacunas para aplicación en agua de bebida sobre una vacuna contra enfermedad de Newcastle.

(Bajo la dirección del Dr. Néstor Ledesma Martínez).

Actualmente un método de vacunación usualmente empleado en la avicultura es por medio del agua de bebida, sin embargo, al llevarlo a cabo debe considerarse la calidad del agua empleada, ya que esta puede contener cloro como sanitizante o una cantidad elevada de minerales debido a la fuente de donde proviene, los cuales llegan a inactivar al virus vacunal. Es común el uso de leche en polvo descremada a pesar de sus limitaciones y las consecuencias de su uso para contrarrestar el efecto del cloro o bien de estabilizadores sintéticos de mayor eficiencia para inactivar el efecto del cloro y el de los minerales. Si bien existen actualmente estabilizadores sintéticos de vacuna en el mercado, se requiere de estudios que constaten que estos son capaces de proteger al virus de los desinfectantes en diferentes tipos de agua. En el presente estudio se evaluó un estabilizador de vacuna comercial para una vacuna contra la enfermedad de Newcastle para aplicación en agua de bebida, evaluando su capacidad de proteger al virus vacunal contra el cloro en diferentes tipos de agua, su capacidad de conservar el título y si éste llega a interferir en la respuesta inmune del ave. Se realizaron 3 experimentos, en el primero se evaluó la presencia del virus mediante la prueba de aglutinación en placa, en el segundo se determinó el título de la vacuna mediante el método de Reed & Muench y en el tercer experimento se determinó la presencia de anticuerpos mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. Los resultados obtenidos indican que el estabilizador de vacuna protegió al virus vacunal del cloro en agua corriente, sin embargo en aguas duras presenta problemas en su eficacia ya que si bien protegió al virus vacunal de los minerales del agua, no lo protegió en presencia del cloro.

INTRODUCCIÓN

El método masivo de vacunación más utilizado en la industria avícola es en el agua de bebida¹, por ser considerado rápido, sencillo y que no implica el uso de mucha mano de obra. Sin embargo una falla frecuente en la vacunación por este método es debida a la presencia de desinfectantes en el agua, como lo es el cloro², ya que este inactiva al virus vacunal. Bajo estas circunstancias una práctica común para neutralizar al desinfectante es por medio de la adición de leche en polvo descremada al agua de bebida o bien mediante el uso de un estabilizador de vacuna sintético.

Los problemas del uso de la leche en polvo descremada es su capacidad limitada para neutralizar a los desinfectantes³, conlleva la limpieza de todo el sistema hidráulico debido a que funge como un sustrato altamente nutritivo para las bacterias, favoreciendo la formación de biopelículas de microorganismos, que en el caso de microorganismos patógenos pueden dañar la salud de las aves en producción^{3,4,5}. Así mismo, las aves no poseen las enzimas necesarias para la digestión de los componentes de la leche por lo que llegan a presentar diarrea. Finalmente la adición de leche puede alcalinizar el pH del agua y aumentar su dureza, esto debido a su contenido natural de calcio, poniendo en riesgo el resultado de la vacunación³. A pesar de estas limitantes, en el pasado la adición de leche era el único método disponible por lo que hoy en día se están buscando nuevas alternativas como estabilizadores de vacuna.

Los estabilizadores de vacuna sintéticos son utilizados en aguas en las que además de poseer cloro presentan un nivel de dureza elevado. En México las condiciones de

dureza del agua en las distintas regiones del país ocasionan que las vacunas tengan una respuesta deficiente. El primer efecto y el más visible es la disminución de la solubilidad de medicamentos, aditivos y vacunas. De esta manera la vacuna tenderá a precipitarse en la solución y por lo tanto no será dosificada completamente en las aves³.

Algunos de los estabilizadores sintéticos de vacuna se encuentran formulados principalmente por: Fosfato monobásico potasio y fosfato dibásico de potasio como estabilizadores de pH, sal disódica de ácido etilendiaminotetrácico (EDTA) como agente secuestrante de la dureza del agua, trisulfato de sodio como agente reductor para neutralizar a los desinfectantes, y por ultimo un colorante grado alimenticio para evidenciar el consumo de la vacuna por parte del ave⁶.

Se han realizado estudios en los que se evaluó la capacidad de un estabilizador sintético para proteger al virus vacunal, los resultados de dicho experimento indican que estos funcionan adecuadamente en condiciones de dureza elevada, en presencia de cloro e incluso en agua con pH fuera de un rango óptimo para la vacunación (por debajo de 6.5 y por encima de 7)^{3,7}.

Métodos de vacunación:

La avicultura moderna conlleva el manejo de grandes poblaciones de aves, en el que uno de sus puntos vitales de éxito radica en un adecuado calendario de inmunización. Para la elaboración de un calendario de vacunación se requiere estar familiarizado con la zona avícola y con la granja en particular, ya que las condiciones varían de una granja a

otra e inclusive de una parvada a otra, aun dentro de la misma granja¹.

Actualmente existen diversos métodos de vacunación en las aves, siendo los más comúnmente usados en el campo:

- Aspersión/Nebulización
- Vacunación Parenteral (Intramuscular, subcutánea, punción en el ala)
- Vacunación en la mucosa de la cloaca
- Vacunación *in ovo*
- Vacunación en el agua de bebida
- Vacunación ocular e intranasal

La elección del método de vacunación dependerá entre otras cosas del agente que se desea suministrar o del producto en sí, la disponibilidad de mano de obra, la presencia de algún agente patógeno en la parvada, la función zootécnica del ave, la disponibilidad del equipo y el tipo de respuesta que se desea, entre otros.

Vacunación en agua de bebida:

El concepto de sistemas de vacunación masiva como lo es la vacunación del agua de bebida puede ser utilizado para inmunizar a las parvadas contra enfermedades del sistema respiratorio superior e inmune, incluyendo enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa e infección de la bolsa de Fabricio. Los sistemas de vacunación masiva evitan el manejo excesivo de las aves y por lo tanto ayudan al productor a optimizar procesos y mejorar sus utilidades⁴.

La vacunación en el agua de bebida constituye un método relativamente fácil y adecuado en muchos casos, pero requiere de cuidados especiales⁸. Existen 4 formas de vacunación en el agua:

- Vacunación directa en los bebederos: Se lleva a cabo cuando son utilizados bebederos abiertos. Se vierte la vacuna directamente en el bebedero, previo cálculo del consumo del agua de las aves en un periodo de tiempo de 1 a 1.5 horas.
- Vacunación a través de medicadores: Es el método más fácil, el problema es que las aves llegan a tardar demasiado tiempo en consumir la vacuna. Se debe de limpiar y neutralizar cualquier componente químico utilizado en los contenedores o en los recipientes donde se haya llevado a cabo la dilución de la vacuna.
- Vacunación a través de bombas de agua: Es uno de los métodos que ofrece mejores resultados, incluso para la vacunación con virus que no son resistentes a condiciones extremas de temperatura, pH y relativamente peligrosos como es el virus de laringotraqueítis infecciosa⁸. La metodología para el caso del pollo de engorda es la siguiente:

Se debe de interrumpir el flujo del agua la noche previa a la vacunación, permitiendo que las aves consuman el agua restante de los bebederos. Posteriormente se reconstituye la vacuna en un volumen de agua de acuerdo al consumo promedio de las aves, en el caso de aves de 10-12 días de edad, se estima un consumo de 22-30 ml por ave en 60-75 minutos, que es el tiempo en el que debe ser consumida la vacuna⁸. El día de la vacunación los bebederos

deben de ser levantados de forma que las aves no alcancen los chupones. Posteriormente por medio de una bomba de agua se lleva a cabo el llenado de los bebederos, aquí se debe de tener cuidado en purgar bien la tubería para eliminar el agua sin vacuna que pudiese estar contenida en esta, finalmente se bajan las líneas de los bebederos y se estimula el consumo de agua con vacuna de las aves. El porcentaje óptimo de aves que consumieron la vacuna debe de ser de 97 o más. La vacunación será adecuada si la vacuna es fácilmente detectable en el buche a través de la piel, sobre las plumas de la cabeza, las comisuras del pico, la lengua, etc⁸.

- Vacunación a través de tanques de agua o tinacos: La metodología es similar a la utilizada mediante las bombas de agua, la variante es que en esta ocasión el llenado de los bebederos y de la tubería es por medio de la gravedad.

Las vacunas contra enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa, infección de la bolsa de Fabricio y encefalomiелitis aviar, son las que se administran más comúnmente en el agua de bebida¹.

Calidad del agua de bebida:

Considerando que la vacunación implica la inoculación de inmunógenos con la intención de inducir protección activa contra patógenos específicos⁸, para la vacunación en agua de bebida se debe tener especial cuidado en la calidad del agua.

En las granjas en las que su suministro de agua carece de cloro y este es

adicionado como desinfectante, se recomienda el drenado del sistema de agua varias veces hasta que esté libre de cualquier desinfectante y posteriormente proveer de agua limpia en la que se agregará la vacuna⁹.

La razón por la cual el agua es clorada es que el cloro es uno de los desinfectantes más utilizados en la fase del tratamiento de agua potable, debido a su bajo costo, baja toxicidad y a su amplia capacidad bactericida¹⁰ que consiste en alterar las proteínas y el grupo amino de la célula bacteriana. Una cantidad de cloro de 0.5 a 2 ppm permite prevenir contaminaciones y garantiza la calidad bacteriológica del agua¹¹.

El cloro o hipoclorito de sodio (NaClO), en solución acuosa, forma ácido hipocloroso o también llamado ácido hipocloroso (HOCl), el cual atraviesa la pared celular de los microorganismos ejerciendo en su interior una fuerte acción oxidante¹², presentando excelente actividad contra bacterias gram positivas y gram negativas, buena actividad contra virus con envoltura y actividad moderada contra virus desnudos¹³, hongos y levaduras¹².

Las características fisicoquímicas que el agua posee son en función directa de las características del suelo donde los depósitos de agua han sido encontrados^{3,4}. De esta manera, en suelos altamente mineralizados son fuentes de agua con un pH alcalino y altas concentraciones de minerales, mientras que depósitos más superficiales en zonas de suelos con altos contenidos orgánicos pueden dar como resultado agua con pH ácido³. Las características mínimas requeridas del agua para diferentes aplicaciones se encuentran en el **cuadro No. 1**.

En el caso de las partículas virales, estas son sensibles al pH y por lo general deben mantenerse en un rango de 6.5 a 7.0 con el fin de evitar la inactivación de la vacuna. Rangos por encima o por debajo de los valores anteriormente mencionados provocarán indistintamente una modificación en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas del virus^{3,4}.

Respecto a la dureza del agua esta está dada en función de la concentración de iones calcio y magnesio, entre mayor es la dureza, mayor es la concentración de estos iones. En el caso de las vacunas, la presencia de dureza en el agua puede provocar un aglutinamiento de partículas vírales, ya que de manera similar a la atracción de cargas polares en las moléculas de agua, las cargas superficiales positivas en los iones de calcio y magnesio atraerán los polos negativos de la cápside y/o envoltura formando agrupaciones que provocarán una distribución no uniforme de las partículas en la solución y en casos de dureza muy alta puede provocar una modificación de la estructura terciaria de las proteínas del virus inactivándolo definitivamente³.

Se recomienda que el agua utilizada como bebida y de uso general en las explotaciones sea de entre 200 a 300 ppm de calcio ya que concentraciones menores a 100 ppm pueden provocar pérdidas de minerales y deshidratación en las aves, y por arriba de 400 ppm se favorece el depósito de minerales dentro de tuberías, bebederos y sistema de dosificación de agua^{3,4,14}. Por otro lado en el caso de la dureza optima para llevar a cabo la vacunación esta debe de ser por debajo de 50 ppm, sin embargo en estudios realizados por Nuño JL y Cabriales J, se han encontrado que los niveles de dureza promedio de encuentran en rangos superiores a 100 ppm, y por lo tanto inadecuados para un proceso de

vacunación, e incluso en algunas regiones del país puede llegar hasta 600 ppm, por lo que es indispensable en este caso el uso de un estabilizador capaz de contrarrestar el efecto de los minerales del agua. Resultados de dicho estudio se presentan en el **cuadro No. 2**

La temperatura del agua también toma un papel importante en la eficiencia de la vacunación, por un lado una temperatura alta propiciará un bajo consumo de agua por parte del ave¹⁵ ocasionando una mala dosificación de la vacuna y por otro lado se favorecerá la inactivación del virus por la desnaturalización de los enlaces peptídicos en la cadena proteica³. Como regla general, la vida media de la mayoría de los virus puede ser medida en segundos a una temperatura de 60°C, minutos a 37°C, horas a 20°C y días a 4°C.¹⁶

Finalmente la presencia en el agua de metales pesados como el mercurio, plata y plomo, pueden constituir un riesgo para la estabilidad de los virus, ya que inhiben su actividad mediante un efecto similar a la dureza del agua, aglutinándolos e impidiendo su fijación en los sitios activos de las células hospederas³. Por otra parte el plomo altera la capacidad de las aves para combatir agentes infecciosos y puede disminuir la actividad del interferón^{17,18}.

Enfermedad de Newcastle y su importancia en México:

El agente causal de la enfermedad de Newcastle (ENC) se encuentra clasificado dentro de la superfamilia *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, genero *Rubulavirus*^{19,20}, es un virus envuelto, con un genoma en sentido negativo, ARN de

cadena única y con más de 15 kb de extensión¹⁹.

La infección por virus de ENC es altamente contagiosa, representa una seria amenaza económica para todos los sectores de la industria avícola²¹. Es una enfermedad que afecta a todas las aves domésticas y silvestres tanto jóvenes como adultas^{20,22}. La enfermedad se presenta más frecuentemente en su forma letal velogénica viscerotrópica, uno de los factores que favorecen su presentación son áreas con alta densidad de población avícola²³.

Se encuentra clasificada por la OIE dentro de la lista “A” de enfermedades²⁴. En México la ENC se encuentra bajo campaña de control y erradicación según la norma NOM-013-ZOO-1994²⁵.

En algunos países ha sido difícil erradicar la ENC mediante procedimientos de bioseguridad, limpieza y desinfección. En consecuencia, algunos países se han visto obligados a usar la vacunación como método de control²⁶.

Debido a que la vacunación contra ENC es un método importante de control y que la vacunación en el agua de bebida es un método común de vacunación contra ENC, en el presente estudio se plantea la evaluación de un estabilizador comercial (BlueVac®) de origen sintético para una vacuna contra la enfermedad de Newcastle para aplicación en agua de bebida, evaluando su capacidad de proteger al virus vacunal contra cloro o hipoclorito de sodio en diferentes tipos de agua, su capacidad de conservar el título de la vacuna y si éste llega a interferir en la respuesta inmune del ave hacia el virus vacunal.

HIPÓTESIS

- Con base en que los estabilizador sintéticos han sido creados para proteger a los virus vacúnales, el estabilizador BlueVac® de vacunas para aplicación en agua de bebida, es capaz de proteger al virus vacunal de ENC contra el hipoclorito de sodio en diferentes tipos de agua.

OBJETIVO

- General: Determinar si el estabilizador de vacuna es capaz de proteger al virus vacunal contra el hipoclorito de sodio en diferentes tipos de agua.

- Específicos:

1.- Determinar si el estabilizador de vacuna mantiene el título de la vacuna de la ENC en presencia de hipoclorito de sodio.

2.- Determinar la respuesta inmune de una vacuna contra ENC en agua de bebida en presencia de hipoclorito de sodio con estabilizador de vacuna en pollos SPF de 28 días de edad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material:

Estabilizador de Vacuna BlueVac® (1.2 g/ litro)

Vacuna: vacuna contra el virus de ENC cepa la Sota para aplicación en agua de bebida (10^8 DIEP₅₀/ml).

Agua destilada (AD).

Agua mineral comercial (AM). Con un pH de 5.5. Conteniendo: Bicarbonato de calcio, Cloruro de Potasio y Sulfato de Magnesio.

Agua corriente potable (AC). Obtenida de las instalaciones del DPA: Aves. Con un pH de 6.6.

Desinfectante: Hipoclorito de sodio 2 ppm.

180 embriones SPF de 9 a 11 días de incubación. (Para la prueba de inactivación de virus)

405 embriones SPF de 9 a 11 días de incubación. (Para la prueba de determinación del título de vacuna).

72 pollos SPF de 14 días de edad. (Para la prueba de reacción de título de anticuerpos).

Metodología:

Se evaluó el estabilizador de vacuna BlueVac® en 3 tipos de agua (AD, AM y AC) cada tipo de agua se dividió en 4 grupos quedando de la siguiente manera:

TIPO DE AGUA	MEZCLA	GRUPO
AGUA DESTILADA (AD)	Sin estabilizador (S/E)	AD S/E
	Con estabilizador (C/E)	AD C/E
	Sin estabilizador con cloro (S/E+Cl)	AD S/E+Cl
	Con estabilizador con cloro (C/E+Cl)	AD C/E+Cl
AGUA POTABLE CORRIENTE (AC)	Sin estabilizador (S/E)	AC S/E
	Con estabilizador (C/E)	AC C/E
	Sin estabilizador con cloro (S/E+Cl)	AC S/E+Cl
	Con estabilizador con cloro (C/E+Cl)	AC C/E+Cl
AGUA MINERALIZADA (AM)	Sin estabilizador (S/E)	AM S/E
	Con estabilizador (C/E)	AM C/E
	Sin estabilizador con cloro (S/E+Cl)	AM S/E+Cl
	Con estabilizador con cloro (C/E+Cl)	AM C/E+Cl

1) PRUEBA DE INACTIVACIÓN DE VIRUS.

- Se preparó cada una de las mezclas de los grupos en matraces con 250 ml de agua, posteriormente la vacuna contra ENC cepa la Sota para aplicación en agua de bebida se reconstituyó en 30 ml del diluyente. Una vez reconstituida se suministró 0.375 ml en cada

uno de los grupos. El contenido se mezcló por 30 segundos y se dejaron todos los matraces a temperatura ambiente (21°C).

- Posteriormente a los tiempos de 15, 30 y 60 minutos después de haber puesto el virus vacunal se tomó 1 ml de la mezcla de cada grupo y se inoculó por cavidad alantoidea en 5 embriones (0.2 ml / embrión) de 9 a 11 días de incubación por cada grupo.

- Los embriones inoculados fueron incubados durante 6 días a 37.5°C y 60% de humedad relativa, con volteo cada 2 horas. La viabilidad de los embriones se verificó por ovoscopia cada 24 horas. Fueron descartados los embriones muertos a las 24 horas.

- Al sexto día, el líquido alantoideo de todos los embriones inoculados, se evaluó mediante la prueba de hemoaglutinación en placa con glóbulos rojos de gallina al 1% lavados en solución amortiguada de fosfatos, para identificar la presencia de partículas hemoaglutinantes compatibles con el virus de Newcastle.

2) PRUEBA DE DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE VACUNA.

- Se realizó la titulación de la vacuna de cada uno de los grupos de AC y AM a los tiempos de 15 y 60 minutos mediante diluciones decuples seriadas en solución amortiguada de fosfatos, desde 10^{-1} a 10^{-9} . A partir de las diluciones 10^{-5} a 10^{-9} se inocularon 5 embriones de 11 días de incubación por cada dilución. Se dejaron 5 embriones sin inocular como testigo negativo.

- Una vez inoculados los embriones, fueron incubados a 37.5°C y 60% de humedad relativa durante 5 días. Posteriormente se obtuvo la dosis infectante del virus vacunal contenido en cada grupo en cada intervalo, con el uso del método descrito por Reed & Munch para la

titulación de suspensiones virales y los resultados fueron comparados.

3) PRUEBA DE REACCIÓN DE TÍTULO DE ANTICUERPOS.

- 36 pollitos SPF de 1 día de edad fueron instalados en las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves de la FMVZ, UNAM, recibiendo agua y alimento comercial a libre acceso, dividiéndolos en 4 grupos de 9 pollos. A los 7 días de edad se determinó el título de anticuerpos contra ENC mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación para garantizar que fueron seronegativos a ENC, tomando muestras de 0.5 ml de sangre sin anticoagulante para la obtención del suero.

- A los 14 días de edad de los pollos, la vacuna de ENC de 1000 dosis se reconstituyó en 30 ml de diluyente, posteriormente se tomaron 7.5 ml de la vacuna reconstituida depositándola en 55 ml de cada una de las mezclas de los grupos de AC, teniendo como volumen final de cada grupo 62.5 ml con una dosis vacunal por cada 0.25 ml. Posteriormente se le suministró 0.25 ml (1 dosis vacunal) de un tipo de mezcla vía oral a cada uno de los pollos de un grupo mediante el uso de una micropipeta, haciendo lo mismo con los demás grupos.

- Pasados 14 días (28 días de edad de las aves) se tomaron muestras de 2 ml de sangre sin anticoagulante de los pollos para colección de suero y posteriormente se realizó la prueba de inhibición de la hemoaglutinación con la finalidad de determinar el título de anticuerpos de cada uno de los grupos. Los resultados fueron comparados entre los grupos mediante la prueba estadística de análisis de varianza.

- La metodología de esta prueba se llevó a cabo por duplicado.

RESULTADOS

Experimento 1:

Los resultados de la prueba de hemoaglutinación en placa para la determinación de la presencia del virus vacunal de ENC en el líquido alantoideo, indicaron que efectivamente hubo replicación del virus en los embriones observándose una marcada tendencia a la disminución de las hemoaglutinaciones positivas conforme el tiempo va en aumento. Los resultados se presentan de manera detallada en el **cuadro No. 3**.

Experimento 2:

Los resultados de la prueba de titulación de vacuna indicaron en el caso del agua corriente que no hay una inactivación total del virus vacunal por parte del hipoclorito de sodio en los tiempos de 15 minutos y de 60 minutos en ninguno de los grupos, así mismo se observa en el caso de los grupos de AC S/E y AC S/E+Cl que hay una disminución del título con respecto al tiempo.

En el caso del agua mineral se evidenció disminución de la actividad viral en los grupos de AM S/E, AM S/E+Cl y AM C/E+Cl a los 60 minutos. Solo el grupo de AM C/E conservó un título de $10^{6.28}$. Los resultados se presentan de manera detallada en el **cuadro No. 4 y en la grafica No.1 y 2**.

Experimento 3:

Los sueros tomados de las aves a los 7 días de edad indicaron que estas son seronegativas a anticuerpos contra virus de ENC mediante técnica de inhibición de la

hemoaglutinación.

Los resultados de la prueba inhibición de la hemoaglutinación para la determinación título de anticuerpos contra el virus de la Enfermedad de Newcastle en las aves de 28 días de edad, indicaron que el grupo al que le fue suministrado el tratamiento de AC S/E+Cl poseen un bajo título de anticuerpos siendo su media geométrica de 1.44 en el caso de la primer replica y de 2.29 en la segunda replica, a diferencia de las aves a las que les fue suministrado el tratamiento de AC C/E+Cl que mostraron un título mayor siendo su media geométrica de 45.7 en el caso de la primer replica y de 39.8 en el caso de la segunda replica. En el caso de los dos grupos sin cloro se comportan de manera similar al grupo de AC C/E+Cl Los resultados se presentan de manera detallada en el **cuadro No. 5 y en la grafica No.3.**

DISCUSIÓN

En la prueba para la determinación del virus vacunal en el líquido alantoideo si bien se evidencia una marcada tendencia a la disminución de la presencia del virus con el paso del tiempo, no se observa una diferencia entre los grupos de los tres tipos de agua empleada, no hay estudios similares, sin embargo existen estudios con otras pruebas en donde se indica que la ausencia de estabilizadores disminuye la presencia del virus, inclusive con el uso de leche descremada⁷, así mismo la viabilidad de los virus disminuye a temperatura ambiente con el paso del tiempo¹⁶ lo cual concuerda con las observaciones de este ensayo, sin embargo aunque la tendencia es a la baja no se puede asegurar que la cantidad de virus es suficiente para generar una respuesta.

En la prueba para la determinación del título de la vacuna, en el caso del agua corriente se evidenció la disminución del título de la vacuna en el grupo de AC S/E+Cl, dicha disminución fue de 0.5 logaritmo base 10 en comparación con el grupo de AC C/E+Cl en el tiempo de 60 minutos. Comparando los resultados con otro experimento realizado por Nuño JL., en agua con un pH de 6, 3 ppm de cloro y 200 ppm de dureza se observó la disminución de hasta 1 logaritmo de título en tan solo 30 minutos³, ambos estudios concuerdan en la disminución del título de la vacuna, si bien en el experimento realizado por Nuño JL está fue del doble en la mitad del tiempo en comparación con el realizado en este estudio, la diferencia puede ser debida a que el experimento realizado por Nuño JL se llevó a cabo empleando 3 ppm de cloro a diferencia del presente estudio

que se realizó con 2 ppm. Sin embargo al parecer el estabilizador da mejores resultados sin presencia de hipoclorito de sodio.

En caso del agua mineral ha sido documentado que la dureza del agua tiene un efecto negativo sobre la viabilidad de los virus⁷ en este ensayo aparentemente el estabilizador tiene un efecto protector sobre el virus ya que se logró mantener el título, a diferencia del grupo sin estabilizador en el que a 60 minutos no se encontró actividad viral. Por otra parte al adicionar hipoclorito de sodio en el agua mineral el virus fue inactivado independientemente a la presencia del estabilizador.

Estos resultados muestran que el estabilizador puede proteger contra el efecto de la dureza del agua, puede proteger contra el efecto del hipoclorito de sodio pero no en combinación de ambos.

Por último en la prueba de detección de anticuerpos contra el virus de Newcastle se observó claramente la actividad del hipoclorito del sodio y del estabilizador por si solos y en combinación sobre el virus vacunal, obteniendo resultados favorables hacia la actividad del estabilizador. Con base en los resultados obtenidos en este estudio en el que las aves del grupo S/E + Cl mostraron títulos de 1.865 (los cuales no se consideran protectores), a diferencia de las aves de los grupos S/E 46.75, C/E 49.75 y C/E + Cl 42.75 (los cuales se consideran protectores), se sugiere que estabilizador tuvo el efecto esperado, comparando estos resultados, con un estudio realizado por Van Boven y cols²⁷, en el que muestra que aves SPF vacunadas al día de edad con títulos de HI menores de 4 a los 14 días de edad, presentaron una mayor mortalidad en comparación con aves con títulos

mayores o iguales a 8, esto al ser desafiadas con tres diferentes cepas de virus velogénico de Newcastle. En otro estudio realizado por Kapczynski DR y King DJ²⁸ en aves SPF vacunadas al día de edad y posteriormente desafiadas los 14 días con un virus de Newcastle velogénico, se encontró que las aves con un título igual o inferior a 4 mostraron una mortalidad del 100% a diferencia de las aves que mostraron un título de 37 las cuales no mostraron mortalidad. De la misma forma en un experimento realizado Jeon WJ y cols.²⁹, se encontró que aves de 6 semanas vacunadas y con un título de 9.8 no tuvieron mortalidad al ser desafiadas con un virus velogénico de Newcastle. Finalmente Survashe BD, Desmukh SG³⁰ y Camacho et al³¹; mencionan que anticuerpos séricos con un título de 16 en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación protege al 80% de los animales contra la mortalidad ante un desafío severo; si el título es 32 o superior se puede alcanzar el 100% de protección.

El hecho de que en este estudio el título de anticuerpos de las aves de los grupos de AC C/E, A/C S/E y AC C/E+Cl posean un título superior a 32 y el grupo de AC S/E+Cl un título inferior a 2 en las medias geométricas de títulos de HI, indica que el estabilizador cumplió el objetivo de proteger al virus vacunal a pesar de las diferencias estadísticas significativas entre los grupos, ya que se generó una respuesta inmune cuyos títulos de anticuerpos podrían asociarse a protección.^{27,28,29,30,31}

CONCLUSIÓN

- 1.- El estabilizador de vacuna protege al virus vacunal contra el efecto del hipoclorito de sodio en agua corriente en los ensayos *in ovo*.
- 2.- El estabilizador de vacuna protege al virus vacunal de manera parcial en presencia de aguas duras en los ensayos *in ovo*.
- 3.- El estabilizador de vacuna fue capaz de proteger al virus vacunal en presencia de hipoclorito de sodio de manera suficiente para generar una respuesta inmune adecuada en pollos vacunados en agua corriente.

REFERENCIAS

- 1.- Banda CA. Prevención de enfermedades por vacunación. Sistema de producción animal 1 volumen 2. 2ª edición. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2005.
- 2.- Bell DD, Weaver WD. Commercial chicken meat and egg production. 5th ed. USA: Springer, 2002.
- 3.- Nuño JL. La importancia de la calidad del agua en la eficiencia de vacunación. Memorias de la XXXI convención ANECA; 2006 abril 26-29; Ixtapa Zihuatanejo (Guerrero), México. Asociación Nacional de Especialista en Ciencias Avícolas, AC, 2006: 101-106.
- 4.- Nuño JL, Cabriales J. Parámetros de optimización para los procesos de vacunación en aspersión y en el agua de bebida. Memorias de 57th WPDC/XXXIII ANECA; 2008 abril 9-12; Puerto Vallarta (Jalisco), México. 2008: 65-70.
- 5.- Van del Sluis W. Watering systems depend on water quality and pressure. World Poultry 2001; 15 (5): 30-32.
- 6.- Nuño JL, inventor, Banner & Witcoff LTD, propietario. Vaccine Stabilising Formula with Live Antigens for Use in Mass Vaccination Systems. USA. [citado 15 Septiembre 2009] Disponible en: <http://www.faqs.org/patents/app/20080268000>.

- 7.- Cabriaes J, Nuño JL. Importancia del uso de un estabilizador de alto desempeño para contrarrestar los efectos adversos de los componentes del agua durante la vacunación. Memorias de la XXXIV convención ANECA. 2009 abril 12-15, Acapulco, Guerrero.
- 8.- Zavala G. Inmunización y sistemas de vacunación. Memorias del XX curso AVIMEX actualidades en vacunología aviar; 2008 junio 27; México. 2008: 41-47.
- 9.- Jordan FTW, Pattison M. Enfermedades de las aves. 3^a ed. México: Manual Moderno, 1996.
- 10.- Donald J., Water requirements for broiler production. Poultry Dig 2000; 59 (6): 12-18.
- 11- Quintana LJA. Avitecnia. Manejo de las aves domesticas más comunes. 3^a ed. México: Trillas, 1999.
- 12.- Strauch D, Böhn R. Limpieza y desinfección de alojamientos e industrias animales. España: Acribia, 2004; 1-56.
- 13.- Bixler JE. Desinfección y desinfectantes, Acontecer avícola; 1994, 2: 12-22.
- 14.- Salazar MG. Calidad del Agua en la industria avícola (Estudio recapitulativo) (Tesis de Licenciatura). México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2002.

15.- May JD, Lott BD. Feed and water consumption patterns of broilers at high environmental temperatures. *Poultry Sci* 1992; 71: 331-336.

16.- Murphy FA, Gibbs FA, Horzinek MC, Studdert MJ. The nature of viruses as etiologic agents of veterinary and zoonotic diseases. *Veterinary virology*. 3th ed. USA: Academic Press, 1999: 3-21.

17.- Vodela JK, Renden JA, Lenz SD, McElheenny WH, Kemppainen BW. Drinking water contaminants (arsenic, cadmium, lead, benzene and trichloroethylene). 1. Interaction of contaminants with nutritional status on general performance and immune function in broiler chicken. *Poultry Sci* 1997; 76: 1474-1492.

18.- Avadhesh RS, Chauhan RS, Singh NP. Immunopathological effect of lead on cell mediated immunity in chickens. *Indian J of Vet Pat* 1998; 22 (1): 22-25.

19.- Zavala G. Vacunación contra la enfermedad de Newcastle. Memorias del XX curso AVIMEX actualidades en vacunología aviar; México junio 27 2008. 67-71.

20.- Alexander DJ: Newcastle diseases and other paramyxovirus infection in: *Diseases of poultry*. Iowa State University Press, ed. Calnek and cols. USA. 2003: 541-570.

21.- Ortíz NM, Fehervari T, Huerta LB, Ledesma N, Téllez G. Caracterización molecular de aislamientos mexicanos del virus de la enfermedad de Newcastle. Memorias de la

XXVII Convención anual ANECA: 2002 mayo 1-4, Puerto Vallarta: 77-79.

22.- Información SANINET (on line) 2003 [citado 23 de abril de 2003]. Disponible en:

<http://www.iicasainet.net/pub/sanani/html/exoticas/envv.htm>

23.- Juárez M, Petrone V, Fehervari T. Caracterización biológica de cuatro cepas velogénicas y una lentogénica del virus de la enfermedad de Newcastle. Memorias de la XXVII Convención ANECA: 2002 mayo 1-4, Puerto Vallarta: 79-81.

24.- Información OIE (on line) 2009 [citado 20 de Enero de 2009] Disponible en:

http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification.htm

25.- Norma Oficial Mexicana: NOM-013-ZOO-1994. Campaña nacional contra le enfermedad de Newcastle presentación velogénica. Diario Oficial de la Federación (02, 28, 1995).

26.- Survashe BD, Desmukh SG: Newcastle disease prevention and control. [citado 15 julio de 2009]. Disponible en:

<http://www.wattnet.com/Archives/Docs/NEWCAST.PDF?CFID=25710&CFTOKEN=74030876>

27.- Van Boven M, Bouma A, Fabri T, Katsma E, Hartog L , Koch G. Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. Avian Pathology. 2008. 37:1, 1-5.

28.- Kapczynski DR, King DJ. Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine* 23. 2005. 3424-3433.

29.- Jeon W, Lee E, Lee Y, Jeong O, Kim Y, Kwon J, Choi K. Protective efficacy of commercial inactivated Newcastle disease virus vaccines in chickens against a recent Korean epizootic strain. *J. Vet. Sci.* 2008, 9 (3), 295-300.

30.- Survashe BD, Desmukh SG: Newcastle Disease, Prevention and Control, *Poultry International*. 1998, February: 26-28.

31.- Camacho E, Sarfati D, Soto E, Murillo M, Lozano B. Inmunización y causas de brote de la enfermedad de Newcastle. *Memorias del XVIII Curso Avimex: Laringotraqueítis, Influenza y Newcastle hoy*. Laboratorio Avi-Mex SA de CV. México DF, Julio 28, 2006:15-32.

CUADROS

CUADRO 1. Características fisicoquímicas del agua en diferentes casos.

	Calidad mínima para bebida	Calidad mínima para vacunar	Calidad promedio agua municipal	Calidad promedio agua embotellada	Calidad promedio agua de pozo	Calidad promedio agua destilada
pH	5.5 –7.5	6.8 –7.0	6.5 – 8.5	6.5 – 8.5	6.5 – 8.5	5.8
Dureza (ppm)	< 400	< 50	500	200	400	0
Cloro libre (ppm)	1.0 –2.0	0	3 – 5	0.1	0	0

*Tomado de Nuño JL. La importancia de la calidad del agua en la eficiencia de vacunación. Memorias de la XXXI convención ANECA

CUADRO 2. Condiciones del agua encontradas en diferentes regiones avícolas del país.

ESTADO	CIUDAD	Ph	Dureza	Cloro
Michoacán	Uruapan	8.6	340 ppm	2.0 ppm
Veracruz	Córdoba	9.2	480 ppm	1.0 ppm
Puebla	Tehuacán	8.9	440 ppm	1.0 ppm
Nuevo León	Monterrey	8.8	320 ppm	1.0 ppm
Coahuila	Saltillo	9.4	600 ppm	2.5 ppm
Nayarit	Tepic	8.7	280 ppm	1.5 ppm
Jalisco	Tepatitlán	6.3	280 ppm	0.0 ppm
San Luis Potosí	San Luis Potosí	8.8	230 ppm	1.0 ppm
Jalisco	Guadalajara	8.1	210 ppm	0.5 ppm
Querétaro	Querétaro	8.6	240 ppm	1.5 ppm
Colima	Colima	6.4	220 ppm	0.0 ppm
Jalisco	Acatic	7.6	200 ppm	1.5 ppm
Puebla	Tecamachalco	8.7	320 ppm	0.5 ppm
Edo. de México	Jilotepec	6.5	150 ppm	0.0 ppm

* Tomado de Nuño JL, Cabriales J. Parámetros de optimización para los procesos de vacunación en aspersión y en el agua de bebida. Memorias de 57th WPDC/XXXIII ANECA

CUADRO 3. Determinación de la presencia del virus de enfermedad de Newcastle mediante aglutinación en placa (Ap) de los tratamientos en agua destilada, agua corriente y agua mineral.

GRUPO*	15 minutos		30 minutos		60 minutos	
	Ap positivas	Porcentaje (%)	Ap positivas	Porcentaje (%)	Ap positivas	Porcentaje (%)
AD S/E	4/5	80	3/5	60	1/5	20
AD C/E	5/5	100	4/5	80	1/5	20
AD S/E+Cl	4/5	80	5/5	100	0/5	0
AD C/E+Cl	5/5	100	4/5	80	0/5	0
AC S/E	5/5	100	2/5	40	0/5	0
AC C/E	5/5	100	3/5	60	2/5	40
AC S/E+Cl	5/5	100	5/5	100	3/5	60
AC C/E+Cl	5/5	100	4/5	80	0/5	0
AM S/E	4/5	80	3/5	60	1/5	20
AM C/E	4/5	80	4/5	80	3/5	60
AM S/E+Cl	5/5	100	5/5	100	1/5	20
AM C/E+Cl	3/5	60	3/5	60	2/5	40

*AD = Agua destilada
AC = Agua corriente
AM = Agua mineral

S/E = Sin estabilizador
C/E = Con estabilizador
S/E+Cl = Sin estabilizador con cloro
C/E+Cl = Con estabilizador con cloro

CUADRO 4. Títulos de vacuna (DIEP 50/ml) de los tratamientos en agua corriente y agua mineral.

GRUPO*	Tiempo (minutos)	
	15	60
AC S/E	$10^{6.19}$	$10^{6.07}$
AC C/E	$10^{6.86}$	$10^{7.07}$
AC S/E+Cl	$10^{6.32}$	$10^{5.7}$
AC C/E+Cl	$10^{6.06}$	$10^{6.2}$
AM S/E	inferior a 5	0
AM C/E	$10^{6.25}$	$10^{6.28}$
AM S/E+Cl	0	0
AM C/E+Cl	0	0

*AD = Agua destilada
AC = Agua corriente
AM = Agua mineral

S/E = Sin estabilizador
C/E = Con estabilizador
S/E+Cl = Sin estabilizador con cloro
C/E+Cl = Con estabilizador con cloro

CUADRO 5. Media geométrica de los títulos de anticuerpos de la prueba de HI (Log₂) de los tratamientos en agua corriente en aves de 28 días de edad.

1er replica										
GRUPO*	Título (n=9)									Media geométrica
AC S/E	128	64	32	64	8	32	64	129	128	53.7
AC C/E	128	256	256	128	128	256	16	32	64	53.7
AC S/E+Cl	2	0	0	2	2	2	0	0	2	1.44
AC C/E+Cl	32	16	64	32	128	32	32	128	64	45.7

2da replica										
GRUPO*	Título (n=9)									Media geométrica
AC S/E	32	128	32	64	16	64	32	32	32	39.8
AC C/E	128	128	64	64	32	32	32	32	16	45.7
AC S/E+Cl	2	0	4	8	0	0	4	4	2	2.29
AC C/E+Cl	32	64	64	64	64	16	32	32	32	39.8

*AC S/E = Agua corriente sin estabilizador

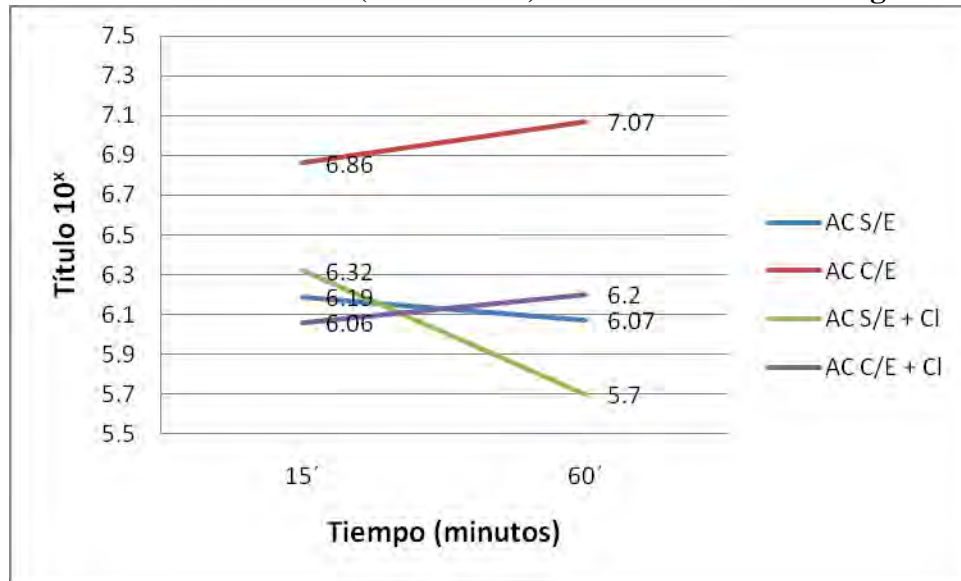
AC C/E = Agua corriente con estabilizador

AC S/E+Cl = Agua corriente sin estabilizador con cloro

AC C/E+Cl = Agua corriente con estabilizador con cloro

GRÁFICAS

GRAFICA 1. Títulos de vacuna (DIEP 50/ml) de los tratamientos en agua corriente.



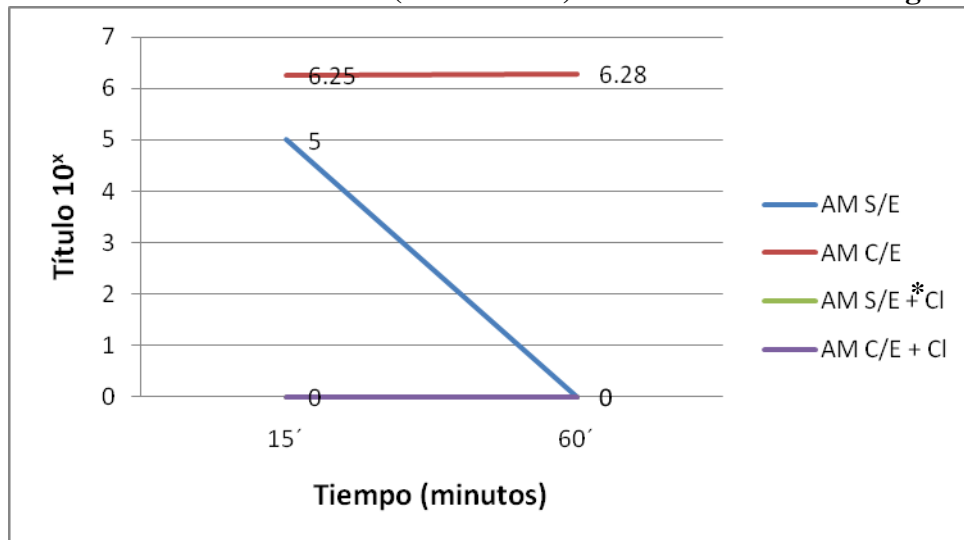
*AC S/E = Agua corriente sin estabilizador

AC C/E = Agua corriente con estabilizador

AC S/E+Cl = Agua corriente sin estabilizador con cloro

AC C/E+Cl = Agua corriente con estabilizador con cloro

GRAFICA 2. Títulos de vacuna (DIEP 50/ml) de los tratamientos en agua mineral.



*El título del grupo AM S/E+Cl posee los mismos valores que el grupo AM C/E+Cl, debido a esto no se observa en la gráfica.

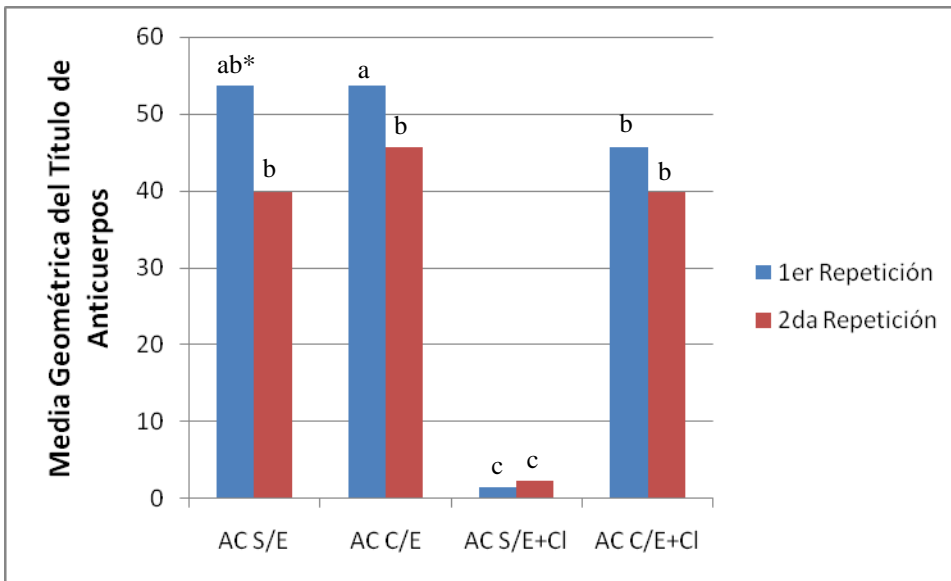
*AM S/E = Agua mineral sin estabilizador

AM C/E = Agua mineral con estabilizador

AM S/E+Cl = Agua mineral sin estabilizador con cloro

AM C/E+Cl = Agua mineral con estabilizador con cloro

GRÁFICA 3. Media geométrica y análisis de varianza de los títulos de anticuerpos de la prueba de HI de los tratamientos en agua corriente en aves de 28 días de edad.



*Literales diferentes demuestran diferencia estadística significativa. $p \leq 0.05$

AC S/E = Agua corriente sin estabilizador

AC C/E = Agua corriente con estabilizador

AC S/E+Cl = Agua corriente sin estabilizador con cloro

AC C/E+Cl = Agua corriente con estabilizador con cloro