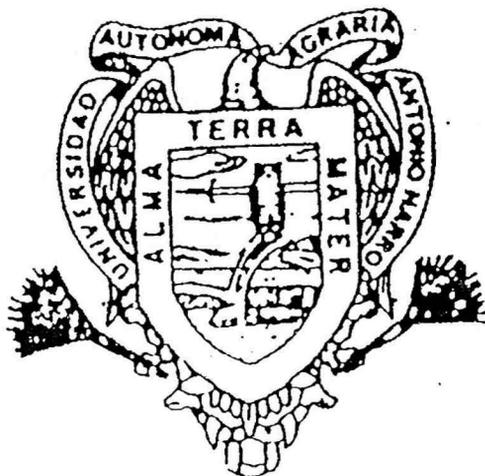


UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"  
UNIDAD LAGUNA  
División Regional de Ciencia Animal



"VACUNAS Y VACUNACIÓN EN  
POLLO DE ENGORDA"

POR:

PABLO MARTÍN ORLANDO TREJO PECH

MONOGRAFIA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO  
ZOOTECNISTA

TORREÓN COAHUILA, MÉXICO  
NOVIEMBRE DE 1999

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"  
UNIDAD LAGUNA  
División Regional de Ciencia Animal

MONOGRAFIA

"VACUNAS Y VACUNACIÓN EN  
POLLO DE ENGORDA"

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE ASESORIA

  
PRESIDENTE DEL JURADO

MVZ. JESÚS GAETA COVARRUBIAS

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

  
M.C. MVZ. JORGE ITURBIDE RAMÍREZ



Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal  
UAAAN - UL

TORREÓN, COAH. NOVIEMBRE DE 1999

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"  
UNIDAD LAGUNA  
División Regional de Ciencia Animal

MONOGRAFIA

POR

PABLO MARTÍN ORLANDO TREJO PECH

"VACUNAS Y VACUNACIÓN EN  
POLLO DE ENGORDA"

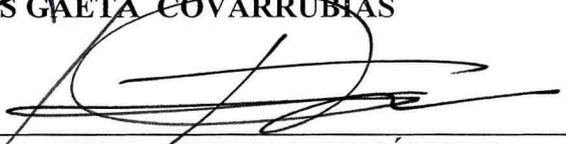
MONOGRAFÍA ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL  
COMITÉ PARTICULAR DE ASESORIA Y APROBADA COMO  
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESIDENTE:

  
\_\_\_\_\_  
MVZ. JESÚS GAETA COVARRUBIAS

VOCAL:

  
\_\_\_\_\_  
MVZ. HÉCTOR VILLANUEVA HERNÁNDEZ

VOCAL:

  
\_\_\_\_\_  
MVZ. NORMA ELIZABETH DOMINGUEZ AVILA

VOCAL:

  
\_\_\_\_\_  
M.C. GREGORIO RODRIGUEZ GARCÍA

TORREÓN, COAH. NOVIEMBRE DE 1999

# **DEDICATORIAS**

**A las dos mujeres que siempre me han apoyado para seguir adelante.**

**Ana María Pech Noh**

**Raquel Mata Fuentes**

**A Dios.**

**Quien siempre me ha guiado por el camino del bien.**

**A mi Alma Mater.**

**Por haberme concedido el honor de culminar satisfactoriamente mi carrera.**

**" La salud, es el don más poderoso que la vida nos pueda dar"**

**Pablo Trejo, 1999.**

## INDICE

TEMA	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	4
III. DESARROLLO DEL TEMA.....	5
1. HISTORIA.....	5
2. SISTEMA INMUNE.....	7
2.1. Composición del sistema inmune.....	7
2.2. Órganos del sistema inmune.....	8
2.3. Respuesta del sistema inmune a la vacunación.....	9
2.3.1. Inmunidad activa.....	10
2.3.2. Inmunidad pasiva.....	11
2.4. Inmunidad materna y vacunación.....	11
2.5. Inmunosupresión.....	13
3. DEFINICIÓN DE VACUNA Y VACUNACIÓN.....	14
4. CARACTERÍSTICAS DE UNA VACUNA IDEAL.....	15
5. TIPOS DE VACUNAS UTILIZADAS COMUNMENTE.....	15
5.1. Vacunas atenuadas.....	16
5.2. Vacunas inactivadas.....	17
5.3. Adyuvantes.....	18
5.4. Nuevos tipos de vacunas en desarrollo.....	20
6. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS TIPOS DE VACUNAS .....	23
6.1. Vacunas viables e inactivadas (muertas).....	23
6.2. Vacunas recombinantes.....	25
6.3. Péptidos sintéticos.....	26
6.4. Vacunas de subunidades.....	27

<b>7. PRINCIPALES MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS.....</b>	<b>27</b>
7.1 Inactivación.....	27
7.2 Atenuación.....	28
7.3. Otros métodos de producción de vacunas.....	29
7.3.1. Microorganismos genéticamente modificados.....	29
7.3.2. Vacunas recombinantes.....	30
a) Antígenos recombinantes.....	30
b) Microorganismos recombinantes Viables.....	30
7.3.3. Péptidos sintéticos.....	30
7.3.4. vacunas antiidiotipo.....	31
<b>8. PRUEBAS QUE SE UTILIZAN PARA EVALUAR UNA VACUNA.....</b>	<b>31</b>
<b>9. PRINCIPALES VÍAS DE ADMINISTRACIÓN, CARACTERÍSTICAS Y FORMA DE APLICACIÓN DE LAS VACUNAS.....</b>	<b>34</b>
9.1. Inyecciones subcutánea e intramusculares.....	34
9.2. Agua de bebida.....	35
9.3. Aspersión – Spray.....	36
9.4. Intraocular o intranasal.....	37
9.5. Punción alar.....	37
9.6. Vacunación in ovo.....	38
9.7. Escarificación.....	40
9.8. Polvo.....	40
9.9. Folículo plumoso.....	40
9.10. Cloacal.....	40
<b>10. PROGRAMA DE VACUNACIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>11. ADMINISTRACIÓN SIMULTÁNEA DE VACUNAS.....</b>	<b>42</b>
11.1. Vacunas mixtas.....	42
11.2. Vacunas administradas simultáneamente con antibióticos.....	43
11.3. Dosis múltiples de la misma vacuna e intervalo.....	44
<b>12. FRACASOS DE LA VACUNACIÓN.....</b>	<b>44</b>

13. CONSECUENCIAS DESFAVORABLES DE LA VACUNACIÓN.....	47
14. RECOMENDACIONES PARA EVITAR UNA FALLA EN LA VACUNACIÓN.....	47
15. REACCIÓN POSTVACUNAL.....	49
16. MONITOREO SEROLÓGICO.....	50
16.1. inmunoprecipitación en agar.....	51
16.2. Técnica de aglutinación directa o aglutinación en placa.....	51
16.3. Neutralización viral.....	52
16.4. Inhibición de aglutinación.....	52
16.5. Prueba de ELISA.....	52
IV. CONCLUSIONES.....	55
V. LITERATURA CITADA.....	57

## LISTA DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 1. Momentos históricos de la Inmunización.....	6
Cuadro 2. Capacidad protectora de los anticuerpos maternos.....	11
Cuadro 3. Agentes productores de estrés Inmunológico bajo condiciones Prácticas.....	13
Cuadro 4. Algunos adyuvantes comunes.....	19
Cuadro 5. Vacunas recombinantes Vanguardistas.....	22
Cuadro 6. Pruebas que componen el control de calidad para productos biológicos.....	32

## I. INTRODUCCIÓN

Algunas enfermedades son tan obicuas, se diseminan fácilmente y con rapidez, que sólo es posible evitarlas con extremas precauciones y poco se puede hacer para alterar el curso de un brote si éste ocurriera. Aun así, la prevención con vacunas es relativamente inofensiva y barata. Esto es cierto en particular en la enfermedad de Marek, infección de la bolsa de Fabricio, enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa y encefalomiелitis aviar. Para estas enfermedades, la vacunación en el momento apropiado es de buen sentido común y un medio para evitar la diseminación de formas virulentas (7,12).

La primera revolución en vacunas se dio en el uso de formas atenuadas o muertas como agentes inmunizantes. La segunda fue el uso de componentes naturales o recombinantes de microorganismos completos. Actualmente, las vacunas de ADN son consideradas la tercera revolución en el desarrollo de inmunógenos. Las investigaciones continúan y algunos científicos piensan que con estas "vacunas de ADN" se podría inmunizar no sólo contra el virus seleccionado, si no también contra cepas diferentes de virus (22).

De hecho, y gracias a la revolución tecnológica que actualmente asiste a los científicos, ya está en marcha ensayos en animales y humanos para probar la eficacia y la seguridad de vacunas ADN contra el virus Influenza (el de la gripe), la malaria, el VIH, la hepatitis B, el virus herpes simple, el cáncer de colon y el linfoma de células T cutáneos. Al mismo tiempo, otros estudios en animales están tratando de demostrar la efectividad de esta forma de inmunización contra el virus Ebola (35).

No obstante, y a pesar de que el futuro de las vacunas de ADN tienen esperanzados a los científicos, existen algunas dudas, aún sin resolver, sobre su seguridad. Se desconoce si estas vacunas puedan llegar a desarrollar a la larga efectos colaterales (carcinogénesis, o afectar a las células germinales, provocando problemas de tolerancia al patógeno en la descendencia y, desarrollo de enfermedades autoinmunes. A pesar de estas incógnitas, la revolución de estas vacunas están en marcha (35).

Actualmente la tecnología en la avicultura ha revolucionado fuertemente en lo que se refiere a vacunas para varias enfermedades infecciosas como Newcastle, bronquitis infecciosa, enfermedad de Marek, Gumboro e influenza aviar, la cual está dando buenos resultados (41). Sin embargo, el uso de estos recientes avances todavía no se generaliza dominando hoy en día el uso de vacunas convencionales como son las vacunas con microorganismos vivos atenuados y las vacunas de microorganismos totalmente muertos (51). Esto se debe probablemente a que los recientes avances científicos que han resultado en vacunas todavía se está probando y dando a conocer los resultados (17).

La industria avícola de explotación de pollo de engorda continúa buscando nuevos procedimientos prácticos para la vacunación de grandes cantidades de pollos en el menor tiempo posible, manteniendo cierto grado de efectividad. Los métodos de vacunación individuales tienden a desaparecer debido principalmente al tiempo requerido para vacunar un lote de pollos y al costo excesivo de mano de obra en algunos países. Para lograr esto, durante las últimas dos décadas se han desarrollado y perfeccionado los métodos masivos de vacunación vía agua de bebida, aspersión y aerosol. Estos métodos permiten la vacunación de pollitos bien sea al día de edad en la planta incubadora (vacunación por aspersión con gota gruesa) o durante los primeros días de vida en la granja avícola (vía agua de bebida o aerosol) (62). Actualmente se cuenta con un nuevo procedimiento de vacunación que es el sistema in ovo, el cual facilita tanto la vacunación (estática) como el manejo del huevo en la incubadora. Este sistema se ha venido expandiendo rápidamente (6,57,62).

Si el propósito de las vacunas es la de prevenir la enfermedad, la baja en la producción o la muerte del ave, la elaboración de un esquema de vacunación depende del tipo de vacunación y su situación epidemiológica. Es necesario conocer las enfermedades prevalentes en la región donde se ubican las granjas, capacidad infecciosa y razones por la que se justifica una vacunación (24).

Ciertas vacunas pueden causar efectos adversos en la salud y productividad de las parvadas cuando se administran inapropiadamente. Una de las formas más sencillas de prevenir fallas de la vacunación o reacciones postvacunal adversas es mediante la instrucción del personal sobre los beneficios y los riesgos del proceso. Los Médicos Veterinarios Zootecnistas, los gerentes de granjas, y los supervisores técnicos deben estar conscientes de que los errores cometidos por el personal, en la mayoría de los casos son errores cometidos con buenas intenciones y/o por falta de recursos, equipo, capacitación e información (61).

Es muy importante recordar la interacción sinérgica de las enfermedades prevalentes en las parvadas con el estrés a que son sometidas las aves para conseguir adecuadas eficiencias productivas. No debemos olvidar que un animal altamente productivo se encuentra mayormente sensibilizado a padecer algún tipo de enfermedad, debido a que el estrés a que se encuentra sometido provoca una baja en sus defensas. Es importante prestar atención a los aspectos fisiológicos que el estrés provoca en el ave, sobre todo a nivel inmunológico (24).

La efectividad de los programas de vacunación puede medirse o evaluarse mediante seguimientos o encuestas serológicas. Las más utilizadas en la industria avícola son: prueba de inmunodifusión en agar, virus-suero neutralización, inhibición de hemoaglutinación y ELISA (61). Es importante tener en mente que el monitoreo serológico aplicado a la industria avícola está dirigido a evaluar la protección de toda la parvada y no el diagnóstico individual de pocas aves (10).

A pesar de toda la atención que han recibido las enfermedades aviares éstas continúan siendo el mayor problema en la avicultura, actualmente se gastan alrededor de dos billones de dólares en controles aviares en el mundo (25).

Actualmente en México a crecido mucho la industria avícola, asentando su producción de carne y huevo en quinto y sexto lugar en el mundo respectivamente. En carne de pollo México es superado por los Estados Unidos de América, China, Brasil y Francia. México como exportador de carne de pollo a nivel mundial ocupa el tercer lugar. Estos datos son de gran importancia ya que por medio de ellos se refleja el empeño que se le ha puesto en nuestro país para el control de las principales enfermedades devastadoras como influenza aviar, Newcastle y salmonelosis y a la vez modernizar la industria avícola. Estos son datos alentadores para que México amplíe más su mercado internacional en lo que se refiere a la industria avícola (31).

En la época actual de mercados abiertos y competitivos, no hay duda de que una granja con aves sanas brinda un retorno económico mucho mayor que una granja a la merced de enfermedades infecciosas. Por lo tanto mantener a las aves en un óptimo estado de salud es extremadamente importante, si se desea tener eficacia en la producción y lograr una mayor competitividad en el mundo actual de economías globalizadas (9).

## II. OBJETIVOS

Recopilar la mayor información posible sobre vacunas en pollo de engorda de diversas fuentes bibliográficas para:

a). Proporcionar información tanto de las vacunas convencionales o tradicionales como las nuevas que se están utilizando en el campo de la inmunización.

b). Conocer los principales métodos de obtención, así como las de administración de las diferentes vacunas.

c). Analizar las principales ventajas y desventajas de los tipos de vacunas más usados en la actualidad.

d). Conocer los diferentes métodos serológicos utilizados en la avicultura para la decisión y evaluación de los programas de vacunación.

e). Saber cuáles son los principales errores en la vacunación y las consecuencias de las mismas y,

f). Proporcionar recomendaciones para una mejor eficiencia en el uso de las vacunas.

### III. DESARROLLO DEL TEMA

#### 1. HISTORIA

Se ha reconocido durante siglos que los individuos que se recuperan de ciertas enfermedades están protegidos de la recurrencias (3,43,52,64). La inoculación moderadamente afortunada, aunque arriesgada, de una pequeña cantidad de líquido de las pústulas de la viruela en la piel de las personas no infectadas (variolización), fue un esfuerzo para imitar al fenómeno natural. La introducción de las vacunas por Edward Jenner con viruela de la vaca (1796) para proteger contra viruela humana fue el primer uso documentado de una vacuna de virus vivo atenuado y el comienzo de la inmunidad moderna (52).

Durante casi un siglo no se avanzó en el área de la inmunización; siendo Luís Pasteur quien en 1878 desarrolló una vacuna contra el cólera aviar. Esto se hizo con base a la observación de un cultivo de *Pasteurella aviseptica* que había sido dejado en el laboratorio durante la vacunación; éste había perdido la virulencia para los pollos y los animales inoculados con este cultivo eran protegidos contra cepas virulentas de la enfermedad. Pasteur concluyó que este cultivo contenía microbios atenuados y advirtió inmediatamente la analogía con el sistema de inmunización de Jenner y en honor a éste adoptó el término de vacunación para describir el método que pronto iba a salvar tantas vidas. El mismo Pasteur en 1881, desarrolló la vacuna contra el ántrax demostrándola en 24 ovejas (3,64).

En 1885 Pasteur realiza la primera vacunación contra la rabia, empleando para ello tejido nervioso desecado previamente de conejos con rabia. La única modificación sufrida por la vacuna de Pasteur hasta 1950, fue la efectuada por Fermi en 1908, quien introdujo el uso del fenol para inactivar los virus rábicos de las médulas de los conejos infectados (52,64).

En 1893 Haffkine desarrolló la vacunación contra el cólera. Posteriormente en 1921, Albert Calmette y Camille Guérin obtuvieron la vacuna contra la tuberculosis por medio del bacilo tuberculoso atenuado que ha sido denominado bacilo de Calmette-guérin (BCG) (64).

En 1923, el veterinario Gastón Ramón desarrolló el toxoide diftérico modificado con formaldehído, generalizándose su uso rápidamente (43).

Después siguieron los intentos para la elaboración de agentes inmunizantes formándose así el pilar histórico de la inmunización (cuadro 1).

**Cuadro 1. Momentos históricos en la inmunización.**

Variolización	1721
Vacunación	1795
Vacuna contra la rabia	1885
Toxoide diftérico	1925
Toxoide tetánico	1925
Vacuna contra tos ferina	1925
Cultivo viral en embrión de pollo	1931
Vacuna contra la fiebre amarilla	1937
Vacuna contra la influenza	1943
Cultivo viral en tejidos	1947
Poliovacuna con virus inactivado (de Salk)	1954
Poliovacuna con virus vivo atenuado (de Sabin)	1956
Vacuna contra el sarampión	1960
Globulina inmune antitetánica (humana)	1962
Vacuna contra rubéola	1966
Vacuna contra la parotiditis	1967
Vacuna contra la hepatitis B	1975
Viruela erradicada	1980
Primera vacuna recombinante (hepatitis B)	1986
Vacuna conjugada de polisacárido contra <i>H. Influenzae</i> B	1988

Las vacunas desarrolladas originalmente dependieron de la atenuación o inactivación completa del organismo para producir vacunas seguras y efectivas. Las técnicas de laboratorio ahora disponibles permiten la producción de vacunas atenuadas vivas por medio de modificación de genes virulentos o por la introducción de lesiones genéticas en el genoma microbial (39).

Los progresos considerables realizados recientemente en tecnologías respecto a adyuvantes, formulación antigénica y sistemas de deliveración ayudarán al esfuerzo para incrementar la inmunogenicidad de vacunas de subunidades, para modular el balance entre las respuestas de células tipo 1 (Th1) y células T tipo 2 (Th2), y para inducir inmunidad local (39).

La inmunización genética (vacunas de DNA descubiertos o desnudos) ha alcanzado una nueva era de la tecnología de vacunas, alcanzando la posibilidad de la vacunación más económica contra la mayoría de las enfermedades. La

perspectiva de producción de vacunas sintéticas constituidas de péptidos retro-inversos, péptidos modificados por lípidos o péptidos que copian estructuras de carbohidratos también ofrecen nuevos accesos atractivos para el desarrollo de vacunas (39).

En la pasada década suficientes progresos han sido realizados de acuerdo a las principales funciones de células T para el desarrollo de vacunas de células T. Estas vacunas pueden aportar beneficios para el desarrollo de agentes inmunoterapéuticos contra desórdenes autoinmunes y cáncer, así como la inducción de inmunidad protectora contra agentes infecciosos (5).

Las potentes técnicas de biotecnología moderna están siendo usadas comunmente para desarrollar una variedad de nuevos productos biológicos veterinarios. Ejemplos: a) el uso de sistemas de expresión de niveles altamente recombinantes para producir nuevas vacunas de subunidades e inmunomoduladores, b) el uso de técnicas de ingeniería genética para desarrollar nuevas vacunas virales y de bacterias vivas, incluyendo vacunas de genes modificados y vacunas recombinantes por vectores o transportadores, y la producción de sistemas de expresión plásmida produciendo antígenos protectores para el desarrollo de "vacuna DNA" para aplicaciones tanto en humanos como en veterinaria (50).

## **2. EL SISTEMA INMUNE**

### **2.1. Composición del sistema inmune.**

El desarrollo de inmunidad a un antígeno, término que se refiere a cualquier sustancia extraña que provoca la producción de anticuerpos, se inicia en el pollito en su etapa embrionaria. Es un sistema de defensa altamente especializado, llamado sistema inmunológico y consiste en el mecanismo que provee la naturaleza al ave para resistir las enfermedades causadas por la invasión temprana de muchas bacterias, virus, hongos y demás microorganismos infecciosos (45).

El sistema inmunitario debe su origen a ciertas células especializadas de las cuales los linfocitos y otras células derivadas son las más importantes (45).

El sistema inmune está integrado por tres componentes funcionales: la inmunidad humoral, la celular y la reticuloendotelial. La inmunidad humoral se caracteriza por la producción de anticuerpos contra una gama muy amplia de patógenos. Los anticuerpos son proteínas que circulan en el suero sanguíneo y como cada uno es específico para un patógeno, el ave tiene que producir muchos tipos para protegerse contra la multitud a los que estará expuesto en su medio ambiente. Los anticuerpos normalmente se adhieren a la superficie de los patógenos inmovilizándolos e inactivándolos (56).

La inmunidad celular se atribuye a mensajeros químicos llamados linfocinas las cuales son producidas por los linfocitos o glóbulos blancos. Estos mensajeros tienen estructura protéica pero no son anticuerpos y poseen las siguientes funciones: ayudar a los anticuerpos a inactivar los patógenos, destruir los patógenos, activar los macrófagos (células que atrapan los patógenos) y neutralizan los virus (56).

La inmunidad reticuloendotelial consiste en la remoción inespecífica de los patógenos por el proceso de fagocitosis o inclusión del invasor a las células del sistema reticuloendotelial (56)

Si bien los sistemas inmunitarios son el mecanismo natural de protección del ave contra enfermedades, distan mucho de ser perfectos. Un número elevado de invasores pueden producir un efecto devastador y dado que los microorganismos extraños deben estar presentes para poner en marcha los sistemas inmunológicos, por lo general, antes que los sistemas generen una adecuada inmunidad puede ocurrir cierta morbilidad y mortalidad. El remedio más apropiado para este problema es la vacunación temprana contra la enfermedad (45).

## **2.2 Los órganos del sistema inmune.**

En general el sistema inmune de las aves está compuesto por los órganos linfoides primarios y secundarios. Los órganos linfoides primarios son: la bolsa de Fabricio y el timo. Los órganos linfoides primarios fabrican las células o linfocitos B y T, alcanzando el torrente sanguíneo que los transporta hasta los tejidos linfoides secundarios –glándula de Harder, bazo, médula ósea, tonsilas cecales, hígado, pulmón y placas de Peyer-. Estos tejidos linfoides secundarios proporcionan una amplia distribución de los linfocitos por todo el cuerpo para una rápida respuesta a los agentes infecciosos (48).

En aves inmaduras, la bolsa de Fabricio adyacente a la cloaca; es un órgano glandular de aproximadamente 1 cm de diámetro y su función es la de producir linfocitos B los cuales emigran a través del sistema vascular hacia el bazo, en donde cada uno produce dos líneas de clones de células; una de estas líneas inmediatamente segrega anticuerpos para combatir los patógenos y

representa la respuesta primaria de anticuerpos; La segunda línea produce células "con memoria" para facilitar la respuesta inmune a exposiciones subsecuentes al mismo patógeno (56).

Los programas de vacunación efectivos dependen de la aplicación temprana de memoria inmunológica, ya que el tejido de la bolsa y del timo sufren regresión de las seis semanas en adelante (56).

La glándula de Harder, el tejido linfoide del tracto intestinal y el tejido conjuntivo de la cabeza y del bazo continúa funcionando como protección al ave después de la desaparición del tejido linfoide primario (56).

El tejido del timo en las aves consiste de 6 a 7 lóbulos subcutáneos de forma irregular localizados desde la parte torácica del cuello hasta la mitad de la cabeza. El timo produce linfocitos T que son distribuidos a todos los órganos del cuerpo; estos segregan linfocinas y proteínas que actúan como reguladores de la respuesta inmune. Se han identificado más de 30 linfocinas entre ellas las interleucinas, interferón y factores activadores de macrófagos. Algunas funciones de las linfocinas incluyen la neutralización del virus, la destrucción de células tumorales, la ayuda a los linfocitos a reconocer los antígenos, la inhibición de la actividad inespecífica de los linfocitos y la activación de macrófagos (56).

Los linfocitos T ejercen una función multifacética pero en general activan, orquestan y facilitan las respuestas celulares que involucran los tres componentes del sistema inmune: el humoral, el celular y el reticuloendotelial (56).

### **2.3. Respuesta del sistema inmune a la vacunación.**

La vacunación produce una inmunidad de tipo humoral (anticuerpos) y/o celular. La respuesta humoral se basa en la producción de anticuerpos por las células B, mientras que la inmunidad celular, supone la aparición de linfocitos citotóxicos que destruirán a las células infectadas (por ejemplo virus o bacterias intracelulares). Ambas respuestas, humoral y celular, están mediadas por la acción de células T adyuvantes (Th) (36).

En general se consideran dos tipos de inmunidad relacionados con la vacunación: activa y pasiva. La inmunidad activa es producida por el sistema inmunológico del ave después de una vacunación o exposición a los patógenos de campo. Este tipo de inmunidad comprende la producción de anticuerpos y la inmunidad celular que protegen al ave contra enfermedades. La inmunidad pasiva involucra la transferencia de anticuerpos a partir de la madre a través de la yema del huevo hasta llegar al pollito para conferir una protección temporal a éste (13).

### **2.3.1. Inmunidad activa**

Las bacterinas y los virus contienen proteínas conocidas como antígenos, las cuales son reconocidas por el sistema inmunológico de las aves como sustancias extrañas. El evento crítico que inicia la respuesta inmunológica se presenta cuando las células vigilantes llamadas macrófagos reconocen a estos antígenos como extraños e intentan su eliminación del cuerpo. Los macrófagos envían señales a otras células del sistema inmunológico, los linfocitos B y T, para que estos se multipliquen y participen en la respuesta inmunológica específica contra dichos antígenos. La respuesta es coordinada por mensajeros químicos, tales como las interleucinas e interferones, conocidos genéricamente como linfocinas. Ulteriormente, esta respuesta da como resultado la producción de anticuerpos específicos por parte de las células plasmáticas y la inducción de la inmunidad celular contra cada una de estos antígenos. Una vez que el sistema inmunológico ha respondido adecuadamente a la presencia de los antígenos, el proceso es inhibido mediante otra clase de linfocitos conocidos como linfocitos T supresores (13).

La respuesta inmunológica también produce células de memoria que conservan la capacidad de reconocer estos antígenos. Si el ave es expuesta a estos antígenos más tarde, se presentará una respuesta inmunológica secundaria amplificada (13).

Las respuestas inmunológicas pueden ser primarias o secundarias. La respuesta inmunológica primaria se presenta después de la exposición del sistema inmunológico del ave al antígeno. Esta respuesta es lenta en su desarrollo y de corta duración y generalmente dura de 2 a 3 semanas (13).

Las respuestas inmunológicas secundarias se presentan después de las exposiciones subsecuentes al antígeno y dan como resultado una respuesta inmunológica que se desarrolla más rápidamente y que perdura más tiempo debido a la presencia de células de memoria inmunológica creadas durante las exposiciones previas (13).

La primera vez que un ave es vacunada se produce una respuesta inmunológica primaria. Las vacunaciones subsecuentes o revacunaciones inducen respuestas inmunológicas secundarias. Debido a la mayor duración de las respuestas inmunológicas secundarias, los intervalos entre las revacunaciones son generalmente mayores que los intervalos necesarios entre la primera vacunación y la revacunación (13).

### 2.3.2. Inmunidad pasiva

La inmunidad pasiva resulta de la transferencia de anticuerpos del suero de la reproductora a través del huevo hasta el pollito en desarrollo. Este tipo de inmunidad es de corta duración y generalmente dura de 2 a 3 semanas. La capacidad de producción de los anticuerpos maternos no es la misma para cada enfermedad. Los programas de vacunación de reproductoras son diseñados frecuentemente para optimizar la cantidad y calidad de éstos anticuerpos protectores (13).

Los anticuerpos maternos pueden ser protectores, pero pueden interferir con el desarrollo de la inmunidad activa. Esta interferencia hace difícil la determinación de la edad adecuada de vacunación en aves jóvenes. En estas circunstancias deben considerarse diversos factores para determinar la (s) mejor (es) edad (es) de vacunación. Estos factores incluyen la cantidad inicial de anticuerpos maternos, la tasa de declinación de anticuerpos maternos, la uniformidad de anticuerpos maternos en la parvada, el grado de patogenicidad del desafío de campo, la vía de administración de la vacuna y el tipo de vacuna a utilizar (13).

**Cuadro 2. Capacidad protectora de los anticuerpos maternos.**

Enfermedad	Protección de la progenie
Enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio.	++
Enfermedad de Newcastle.	++
Reovirus.	++
Encefalomiелitis aviar.	++
Bronquitis infecciosa.	+
Micoplasmosis.	-
Viruela aviar.	-
Laringotraqueítis infecciosa.	-

### 2.4 . Inmunidad materna y vacunación

Los anticuerpos transmitidos por las reproductoras a su progenie a través de la yema, puede interferir en el desarrollo de la inmunidad después de la vacunación (14,16). Ya que si los pollitos con niveles altos de anticuerpos maternos son tratados con vacunas de virus vivos o atenuados, la respuesta

primaria de anticuerpos puede ser inhibida. Por otro lado, si la primera vacunación se retarda hasta que el nivel de anticuerpos maternos ha bajado, la parvada puede ser afectada antes que la vacunación le de protección; por lo anterior, el tiempo para administrar los agentes inmunogenéticos es crítico para obtener dicha protección (56).

En general, los niveles de anticuerpos maternos bajan lentamente en el pollito en las primeras dos o tres semanas de vida (30).

El nivel de los anticuerpos maternos en donde la vacuna puede tener éxito depende de la potencia del virus de la vacuna. Por ejemplo, una vacuna suave de Gumboro solamente es efectiva en aves con bajos o sin anticuerpos maternos, una vacuna intermedia de Gumboro puede ser utilizada en aves con una cantidad significativa de anticuerpos, y otras vacunas más fuertes de Gumboro actúan como un virus patogénico y puede infectar a las aves aunque tengan altos niveles de anticuerpos maternos. El tiempo propicio para la vacunación sería simple si todas las aves del lote tuvieran la misma cantidad de anticuerpos maternos, pero esto es muy raro. Cuando un lote tiene anticuerpos maternos desiguales se hace imposible vacunar a todas las aves con una sola vacunación. Por lo tanto una vacunación múltiple es requerida para proveer a todas las aves de un lote con una vacunación temprana (30).

Los anticuerpos maternos que proveen protección contra las enfermedades y bloquean una vacuna activa en los pollitos son: Gumboro, Newcastle, Reovirus y Bronquitis infecciosa (parcial) (30).

Trabajos de experimentación, han demostrado que en la mayor parte de los casos no tiene actividad vacunar a los pollos hasta que la mayor parte de la inmunidad pasiva se haya terminado, lo que significa no antes de que las aves tengan 14 días de edad. Las principales excepciones a esta práctica incluyen el uso de vacunas contra enfermedad de Marek al día de edad y contra bronquitis infecciosa/enfermedad de Newcastle en la incubadora (45).

Esto es, cuando los pollitos son vacunados a temprana edad, algunos virus de la vacuna serán parcialmente neutralizados. Sin embargo, con títulos o una cantidad de virus presente en la mayoría de las vacunas actuales, no toda la vacuna será neutralizada y los virus vivos se multiplicarán, produciendo una reducción generalmente suave. Este es el caso de la enfermedad de Newcastle y de la Bronquitis infecciosa (63).

Por otro lado, la vacunación temprana contra estas dos enfermedades es también beneficiosa, porque con la primera vacuna las aves son preparadas, de modo que cuando les sea suministrada la segunda vacuna el efecto o respuesta secundaria será más uniforme y rápida (63).

## 2.5. Inmunosupresión

Por definición la inmunosupresión es un estado de disfunción temporal o permanente de la respuesta inmune resultado de una lesión en el sistema inmune. Esto conlleva a una susceptibilidad incrementada a agentes infecciosos y a una respuesta reducida a vacunaciones (27).

Una inmunosupresión puede ser causada por agentes infecciosos o no infecciosos. Los agentes infecciosos incluyen bacterias, virus y parásitos internos. Los agentes no infecciosos incluyen productos químicos, hormonas antibióticos, toxinas, estrés ambiental y desbalances alimentarios (27).

En el cuadro siguiente se muestra los diversos agentes que producen estrés inmunológico que más comunmente se presentan en la avicultura (2).

**Cuadro 3. Agentes productores de estrés inmunológico bajo condiciones prácticas.**

<b>Bacterias</b>	<b>Virus</b>	<b>otros</b>
<i>Salmonella</i>	Bronquitis infecciosa	Eimeria sp.
<i>E. coli</i>	Enfermedad de	Histomonas
<i>Mycoplasma</i>	Newcastle.	Toxinas
<i>Pasteurella</i>	Enfermedad de la bolsa	Terapéuticos
<i>Haemofilus</i>	de Fabricio.	Contaminantes
<i>Clostridia</i>	Síndrome de baja postura	Desordenes metabólicos.
<i>Estafilococos</i>	76.	
	Encefalomiелitis aviar,	
	Enfermedad de Marek.	
	Leucosis linfoide.	
	Reovirus.	

Algunas parvadas muestran escasa respuesta inmunitaria a la vacuna, debido a la falta de inmunocompetencia. La capacidad del ave de reaccionar a la vacuna puede verse reducido como consecuencia de una enfermedad bursal, por lo que la bolsa de Fabricio no posee toda su capacidad de proveer la respuesta inmunitaria (45).

La enfermedad de Marek (virus tipo herpes) y Gumboro (birnavirus) constituyen las dos entidades patológicas inmunosupresoras más importantes de la industria avícola mundial, ya que ambas enfermedades son capaces de afectar el sistema inmune provocando que la vacunación contra otras enfermedades no resulte efectiva o que microorganismos que forman parte de la flora microbiana se conviertan en patógenos (8).

Existen otros virus que también producen un efecto adverso directo sobre el sistema inmune de las aves. Entre ellos se incluyen la hepatitis por cuerpos de inclusión (adenovirus tipo 1), reticuloendoteliosis (retrovirus), tenosinovitis infecciosa (reovirus) y la anemia infecciosa de los pollos (existe una controversia sobre la clasificación de este virus). Además de estos agentes virales, las micotoxinas son responsables de la inmunosupresión en las aves, representando una de las causas más importantes de esta condición (8).

La atrofia de órganos linfoides y el agotamiento de los folículos linfoides son frecuentemente el resultado de la acción de agentes inmunosupresores. Por lo tanto, los cambios en los órganos como el timo y la bolsa de Fabricio son indicadores de inmunosupresión. Se puede determinar y analizar estadísticamente las diferencias y cambios macroscópicos en pesos de los órganos linfoides y pesos corporales entre grupos control y grupos infectados (27).

La mejor evaluación de la inmunocompetencia es la reacción y respuesta a un desafío. Sin embargo, no es práctico desafiar a las aves con cada organismo al que están vacunadas. Por lo tanto el monitoreo serológico, una observación cuidadosa de los registros, los resultados del rendimiento y los patrones de mortalidad podrían revelar desafíos y darnos un índice de comportamiento del sistema inmune (44).

### **3. DEFINICIÓN DE VACUNA Y VACUNACIÓN**

El agente que se utiliza para la inmunización activa se denomina genéricamente “antígeno” o “vacuna”. Puede consistir de virus vivos atenuados o bacterias, o microorganismos muertos. También puede ser un producto bacteriano inactivado o un componente simple específico de bacterias (52).

Las vacunas son preparaciones inmunogénicas inocuas obtenidas a partir de agentes infecciosos o tóxicos que, al ser inoculadas a individuos inmunocompetentes, inducen un estado específico de protección contra los efectos nocivos del agente de donde provienen, es el primer recurso en la prevención de las enfermedades infecciosas. Son preparaciones que provocan el proceso inmunológico que naturalmente ocurre en una infección, con la ventaja de que se trata de un procedimiento que de ninguna manera afecta en forma drástica al individuo (23).

Las vacunas están compuestas por virus vivos o inactivados, o por bacterias que han sido diseñadas para estimular una respuesta inmunológica activa y específica de las aves (13).

Las vacunas, han sido instrumento en la protección de los animales y el hombre contra la propagación de enfermedades infecciosas. Estas son una parte integral del manejo de la salud de la avicultura comercial (51).

Por lo tanto la base de la eficiencia de una vacuna es su capacidad para inducir una respuesta inmune o respuestas capaces de proteger en el campo frente a la posterior exposición a microorganismos patógenos (4).

La vacunación se refiere al hecho de administrar a un animal un antígeno derivado de un agente infeccioso, a efecto de que se produzca una respuesta inmunitaria y se logre una resistencia contra ese agente infeccioso (58).

La vacunación es tan sólo la segunda línea de defensa de las parvadas, cuando el programa de bioseguridad falla en prevenir la introducción de agentes infecciosos a la granja (61).

El objetivo de una vacunación es inducir una respuesta inmune específica en el animal con el fin de que, tras el contacto natural con el agente de la enfermedad, el animal quede protegido y no desarrolle la enfermedad (4).

Esto implica diseñar una vacuna que imite muy de cerca al agente infeccioso tanto en su apariencia "antigénica" exterior, dosis, vía de entrada y tiempo de permanencia en el ave, con el propósito de estimular al máximo su sistema de defensa, pero sin causarle la enfermedad. Es así como las vacunas más efectivas, es decir las que inducen una inmunidad duradera y niveles altos de protección, son aquellas que mejor imitan la infección natural (9).

#### **4. CARACTERÍSTICAS DE UNA VACUNA IDEAL**

Una vacuna ideal debería tener las siguientes propiedades: (a) segura para todos los individuos, incluyendo los inmunosuprimidos; (b) fácilmente administrable; (c) activación de toda la gama de respuestas inmunes; (d) efecto duradero a partir de una dosis única; (e) fácil y barata de fabricar; (f) de fácil evaluación y control; (g) estabilidad al calor y al transporte (36).

#### **5. TIPOS DE VACUNAS UTILIZADAS COMUNMENTE**

En la actualidad se emplean dos tipos fundamentales de vacunas, las que contienen agentes activos o vivos (usualmente atenuados en cuanto a su capacidad patógena) y aquellas que emplean agentes inactivados (9,27,51).

### 5.1. Vacunas atenuadas.

Las vacunas vivas contienen virus o bacterias que pueden replicarse en el ave y producir una forma benigna de la enfermedad, por lo que actúan semejando una infección natural (48). Los microorganismos activos usados en la preparación de una vacuna pueden debilitarse (atenuados) por medio de varios métodos para que cuando se administren a un ave se produzca una forma ligera de la enfermedad. Generalmente es imposible, para tal tipo de vacuna, producir la enfermedad en otras aves excepto por medio del empleo de la vacunación (45).

Estas vacunas por inducir una respuesta inmunológica similar a la generada durante la infección natural, les confiere una enorme importancia ya que en general, su uso representa un menor número de dosis y es mayor la duración de la memoria inmunológica, debido a que la dosis inicial del agente vacunal se multiplica en el receptor (23).

Por lo tanto, estas vacunas son producidas manipulando al agente infeccioso de tal manera que aunque esté vivo y mantenga su apariencia antigénica, al ser aplicado en la dosis y por la vía adecuada, sea capaz de estimular al máximo el sistema inmune, claro sin causar la enfermedad; esto sólo se logra atenuando al agente infeccioso usando mecanismos que limitan su capacidad de multiplicarse en el ave, permitiendo al sistema inmune el tiempo necesario para montar una respuesta eficiente que logre neutralizarlo (9).

Las vacunas de virus apatógeno comprenden las vacunas víricas atenuadas artificialmente (vivas modificadas) y los virus que existen en la naturaleza con virulencia reducida para un determinado hospedador. Como productos vacunales se han utilizado aislamientos víricos de virulencia reducida o avirulentos. El origen de estos aislamientos fortuitos puede ser el hospedador natural. Otro origen de vacunas puede ser un virus íntimamente emparentado aislado de un hospedador diferente: por ejemplo, en un principio el virus de la vacuna se utilizó para vacunar a las personas contra la viruela. Los principales requisitos de este procedimiento de vacunación son que induzca una inmunidad adecuada y que la avirulencia del virus sea estable. La mayoría de las vacunas comunmente utilizadas en veterinaria son virus atenuados (4).

Una de las características importantes de las vacunas vivas atenuadas es que el desarrollo de la respuesta inmune requiere de corto tiempo, sin embargo a pesar de sus virtudes una desventaja que presenta es que los antígenos con que son elaborados pueden ser excretados (23).

### 5.3. Adyuvantes.

Los adyuvantes son sustancias no inmunogénicas que adicionadas a una vacuna incrementan su capacidad de producir una respuesta inmunológica. Es importante señalar que las vacunas acompañadas de adyuvantes pueden producir desde irritación hasta necrosis en el sitio de la aplicación (23).

Un mecanismo propuesto de la acción de los adyuvantes es aumentar la expresión de coestimuladores en los macrófagos y otras células presentadoras de antígenos (APC). Debido a esto, la administración de antígenos proteicos como adyuvantes promueve la inmunidad mediada por células y la producción de anticuerpos dependiente de las células T. Las vacunas son más eficaces en la generación de inmunidad sistémica cuando se administran por vía subcutánea o intradérmica junto a adyuvantes (1).

Algunos microorganismos contienen adyuvantes en sus paredes celulares que influyen en el tipo y la fuerza de respuestas inmunitarias específicas inducidas por ellos (1).

Se ha utilizado una gran variedad de compuestos como adyuvantes. El sistema inmunitario, dirigido por el antígeno, responde a la presencia del antígeno y termina esa respuesta una vez que dicho antígeno es eliminado. Es posible disminuir la velocidad de eliminación del antígeno al mezclarlo con un adyuvante insoluble. Cuando se inyecta al animal, esta mezcla forma un "depósito". Los adyuvantes formadores de depósito incluyen las sales de aluminio, como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de aluminio y potasio. Cuando un antígeno se mezcla con uno de estas sales y se inyecta a un animal, se forma un granuloma rico en macrófagos en los tejidos. El antígeno dentro de este granuloma se libera lentamente y de tal modo proporciona un estímulo antigénico prolongado. Los antígenos que normalmente persisten sólo durante algunos días pueden ser retenidos en el cuerpo por varias semanas mediante esta técnica. Esos adyuvantes formadores de depósito influyen únicamente la respuesta inmunitaria primaria y tienen poco efecto en la secundaria (58).

**Cuadro 4. Algunos adyuvantes comunes**

Tipo	Adyuvante	Modo de acción
Sales de aluminio.	Fosfato de aluminio. Hidróxido de aluminio. Alumbre.	Depósito de liberación lenta del antígeno.
Emulsiones agua-aceite.	Adyuvante incompleto de Freund.	Depósito de liberación lenta del antígeno.
Fracciones bacterianas.	Corinebacterias anaerobias. Bacilo Calmette-Guérin. Muramil dipéptido. <i>Bordetella pertussis</i> . Lipopolisacárido	Estimula macrófagos. Estimula macrófagos. Estimula macrófagos. Estimula linfocitos. Estimula macrófagos.
Agentes de superficie activa.	Saponinas.  Lisolecitina	Estimula el procesamiento del antígeno.  Estimula el procesamiento del antígeno.
Carbohidratos complejos	Acemanano. Glucanos Sulfato de dextrán	Estimula macrófagos. Estimula macrófagos. Estimula macrófagos.
Adyuvantes mixtos	Adyuvante completo de Freund	Emulsión agua-aceite más <i>micobacterium</i>

Un método alternativo para formar un depósito consiste en incorporar al antígeno en una emulsión agua-aceite conocida como adyuvante incompleto de Freund. El antígeno es expulsado fácilmente de la fase acuosa de la emulsión (58).

Los adyuvantes oleosos por lo general no son apropiados para los animales sujetos al consumo, debido a que el aceite puede atravesar los planos fasciales y deteriorar la carne (58).

Por mucho, los coadyuvantes más utilizados en las vacunas veterinarias comerciales son las que incluyen sales insolubles, como hidróxido de aluminio o sulfato de aluminio y potasio (alumbre). Estos coadyuvantes se producen en suspensiones coloidales, a las cuales se absorbe el material antigénico. Son estables en el momento de almacenarlas, características que no suelen tener los coadyuvantes oleosos; producen un pequeño granuloma local en el sitio de inoculación, no se desplazan por los tejidos, ni tampoco vuelven inadecuadas para el consumo ciertas partes importantes de la carcasa del animal receptor. De tal modo, este tipo de coadyuvantes son, en el momento actual, los más adecuados para los animales (58).

Las vacunas que contienen adyuvantes como hidróxido de aluminio, siempre deberán aplicarse intramuscular profundo. El sitio ideal de inyección intramuscular es la porción anterolateral y superior del muslo (52).

Las vacunas oleosas están compuestas en base de aceite, agua (que contiene el antígeno), y surfactantes. La fase acuosa, la que contiene el antígeno, se dispersa en la mezcla en forma de glóbulos microscópicos. Esta es llamada la fase interna o discontinua. El aceite envuelve a los microglobulitos de agua y se le llama la fase externa o continua. La mayoría de las vacunas oleosas utilizan aceites minerales, éste es un aceite no metabolizable. Los surfactantes se añaden en las dos fases para ayudar a la emulsión y dar estabilidad a la mezcla (38).

Las vacunas actuales utilizan aceites minerales a base de petróleo como un vehículo para suspender pequeñas gotas encapsuladas de antígeno de vacuna. Una vacuna inactivada utiliza un virus "muerto" como el antígeno, el componente que induce la inmunidad contra la enfermedad, comparada con las vacunas que utilizan antígenos de virus vivo. Las vacunas inactivadas compuestas de aceite mineral no se pueden administrar a las aves dentro de 42 días antes del sacrificio, a causa de los posibles efectos secundarios, incluyendo lesiones de la piel y de los músculos que resultan en pollos no adecuados para el procesamiento. Ahora, los aceites sintéticos, animales y muchos aceites vegetales podrían reemplazar el aceite mineral. Rhone Mériux de Lyon, Francia refina un método inventado por el departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA) utilizando aceites vegetales y otros aceites no derivados de petróleo para formular vacunas aviares contra Newcastle que son menos costosas y más seguras (53).

Un investigador del USDA también descubrió una combinación de tres compuestos -aceite de recino modificado, un diglicol y un triglicérido- que pueden encapsular los antígenos de la vacuna en los aceites. En estudios, la vacuna de Newcastle compuestas de varios aceites no minerales protegieron los pollos de la enfermedad con pocos o ningunos efectos secundarios. El método podrá tener potencial con otras vacunas para aves, ganado y seres humanos (53).

#### **5.4. Nuevos tipos de vacunas en desarrollo.**

Comunmente las vacunas usadas en la avicultura consisten principalmente de vacunas con microorganismos vivos atenuados o vacunas de microorganismos totalmente muertos. Los avances recientes de la tecnología molecular ha conducido a una era de nuevos acercamientos al desarrollo y vacunas deliveradas (51).

Las vacunas que están en desarrollo comprenden vacunas de subunidades en los que se aíslan los polipéptidos del material infeccioso (por ejemplo, hepatitis B, influenza); las vacunas de DNA recombinantes, en las que los antígenos son

sintetizados por células procarióticas (por ejemplo, *E.coli* o levaduras); o células eucarióticas menores (por ejemplo, fibroblastos de ratón); vectores infecciosos recombinantes, en los que el genoma del microorganismo (por ejemplo, HSV, hepatitis B, VIH) es insertado en un vector como vaccinia o BCG; idiotipos de imagen interna en donde se producen anticuerpos antiidiotípicos que imitan los determinantes antigénicos del inmunógeno requerido (por ejemplo, reovirus, virus sendai, poliovirus tipo II y antígeno HBs); por último, péptidos sintéticos producidos por determinantes antigénicos sintetizados de manera secuencial (por ejemplo, toxina del cólera, polio). Un enfoque interesante para la inmunización contra *Salmonella* es utilizar mutantes no revertibles con requerimientos de ciertos metabolitos tales como los aromáticos. Una mutación de *Salmonella typhi* con deleciones en Aro A y pur A, requieren metabolitos aromáticos y adenina. La ingestión de esta bacteria no provocó efectos adversos en los estudios e indujo inmunidad humoral y celular (65).

La obtención de vacunas de subunidades es en la actualidad un área en la que se utiliza abundantes investigaciones; incluyen la purificación de las subunidades víricas, la tecnología recombinantes y la síntesis de péptidos. Con respecto a veterinaria, un buen ejemplo de la obtención de estas vacunas de "tipo avanzado" es la que se obtiene con el virus de la fiebre aftosa. El fundamento de las vacunas de subunidades son las proteínas (o las secuencias de péptidos) capaces de inducir una inmunidad protectora. Estas proteínas se encontrarían principalmente en la superficie del virión y contendrían epítomos capaces de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes (4).

En la actualidad, también se presta una gran atención a las vacunas de péptidos sintéticos. Lo mismo que en el caso de las vacunas víricas obtenidas por clonación, la obtención de vacunas sintéticos que dan buenos resultados requieren un amplio conocimiento de las proteínas que intervienen en la inducción de la inmunidad protectora (4).

Otro excitante avance es el uso de péptidos sintéticos portadores de múltiples antigenicidad conteniendo epítomos de células B y T, los cuales son actualmente explorados para la producción de antígenos derivados de microorganismos (39).

Teóricamente, los productos biológicos desarrollados usando las técnicas precisas de biología molecular tienen el potencial de mayor seguridad que los productos desarrollados usando procedimientos convencionales o comunes de atenuación "al azar" (por ejemplo, series de pasajes de virus en cultivo celular) (50).

El notable progreso que durante el pasado decenio experimentó la tecnología del ADN (ácido desoxirribonucleico) recombinante ha llevado a la obtención de un amplio surtido de vectores de vacuna nuevos y seguros, capaces de expresar con eficiencia inmunógenos ajenos. Pertenecientes a diversos tipos víricos -poxvirus, herpesvirus y adenovirus-, dichos vectores ofrecen la posibilidad de fabricar un gran número de nuevas vacunas recombinantes. La primera vacuna

recombinante vehiculada por un vector que obtuvo licencia de comercialización es una vacuna contra el virus de la enfermedad de Newcastle, que utiliza el virus de la viruela aviar como vector donde se expresan proteínas inmunógenas del primero. Actualmente muchas vacunas de este tipo se están experimentando (66).

Una de las novedades más recientes en vacunología es el éxito obtenido con el uso de ADN desnudo como medio de vacunación. Este sistema ha deparado resultados prometedores en modelos con ratones, hasta convertirse hoy en día en el campo donde más activamente se trabaja para crear nuevas vacunas. Hasta hace poco tiempo, la modificación molecular de virus ARN (ácido ribonucleico), convencionales para obtener vacunas atenuadas más estables solo era posible con virus ARN de cadena positiva, como los poliovirus. Sin embargo, recientes progresos en las técnicas de biología molecular hacen posible rescatar virus de cadena negativa a partir de copias ADN de su genoma. Ello, a su vez, a permitido introducir cambios específicos en el genoma de Rabdoviridae y Paramixoviridae, familias ambas que incluyen diversos virus de importancia veterinaria (66).

En lo que se refiere a vacunas producidas con tecnología recombinante de DNA, la primera de éstas en obtener licencia y salir al mercado es la vacuna recombinante contra hepatitis B (52).

Actualmente se dispone en el mercado de varias vacunas recombinantes vanguardistas como lo muestra el cuadro 5 (41).

#### **Cuadro 5. Vacunas recombinantes vanguardistas**

Influenza aviar/vector: Poxvirus aviar.
Influenza aviar/Vector: Báculovirus.
Newcastle/Vector: Poxvirus aviar.
Newcastle/Vector: Herpes virus de la laringotraqueítis aviar.
Newcastle/Vector: Virus herpes del pavo.
Coccidia/Vector: Salmonella.
Infección de la bolsa de Fabricio/Vector: Báculovirus.
Fiebre porcina clásica/Vector: Báculovirus.
Panleucopenia felina/Vector: Báculovirus.
Rabia/Vector: Vaccinia.

A manera de ejemplo, en ingeniería genética se dispone ya de una nueva vacuna contra la enfermedad de Aujeszky con delección de las fracciones indeseables del genoma del virus (41).

En recientes estudios hechos por Ross (1998), indican que las vacunas recombinantes del virus de la viruela del pollo y del virus de herpes de pavos expresando antígenos de la enfermedad de Marek han sido producidas. Sin embargo, los anticuerpos maternos contra la vacuna de virus de la enfermedad de Marek disminuyó la eficacia de la vacuna del virus de la viruela del pollo recombinante, pero la vacuna de virus del herpes del pavo recombinante asociado a células expresando los antígenos de la enfermedad de Newcastle y enfermedad de Marek fueron efectivos en la prevención de ambas enfermedades de Marek y Newcastle sistémica en presencia de anticuerpos maternos de enfermedad de Marek y enfermedad de Newcastle (18).

Por último cabe mencionar que los recientes avances científicos que han resultado en vacunas, tales como vacunas de subunidades o las producidas a través de tecnología recombinante no han sido exitosamente usados, ya que todavía se están probando y dando a conocer los resultados obtenidos (17).

## **6. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS TIPOS DE VACUNAS**

### **6.1. Vacunas viables e inactivadas (muertas).**

Desafortunadamente dos de los prerrequisitos de una vacuna ideal, como la elevada antigenicidad y la ausencia de efectos colaterales desfavorables, tienden a ser mutuamente incompatibles, así, los microorganismos vivos estimulan las mejores respuestas inmunitarias pero conllevan peligros debido a su virulencia residual, en tanto que los microorganismos inactivados son más malignos como inmunógenos, pero suelen ser mucho más seguros (58).

Los microorganismos vivos (viables) tienen mucho más capacidad para estimular una respuesta de inmunidad mediada por células que "los microorganismos muertos" (inactivados) (58).

Las ventajas de las vacunas que contienen microorganismos inactivados consisten en que son seguras con respecto a la virulencia residual relativamente fáciles de almacenar, toda vez que los microorganismos ya estén muertos. Estas ventajas de las vacunas muertas se corresponden con los defectos de las vacunas vivas. Es decir, algunas vacunas vivas pueden tener una virulencia residual, no sólo con relación a los animales para los cuales se hayan preparado si no también para otros de ellos. Es posible que se transforme en un tipo totalmente virulento de diseminación hacia animales no vacunados. Las vacunas con microorganismos vivos siempre corren el riesgo de contaminarse con microorganismos no deseados, por ejemplo, los brotes de reticuloendoteliosis en los pollos; en Japón y en Australia han podido rastrearse hasta detectar vacunas contaminadas, las cuales se utilizan para tratar la enfermedad de Marek. En algunas vacunas existen

micoplasmas contaminantes. Por último, las vacunas que contienen microorganismos vivos atenuados requieren de un gran cuidado para su preparación, su almacenamiento y su manejo, principalmente para evitar que mueran los microorganismos (58).

Las desventajas de las vacunas de microorganismos inactivados corresponden a las ventajas con microorganismos "vivos". Así, el uso de coadyuvantes para aumentar la efectividad de la antigenicidad produce graves reacciones locales, en tanto que la dosificación múltiple, o las elevadas dosis individuales del antígeno, aumenta los riesgos de producir reacciones de hipersensibilidad, y también afectan de modo desfavorable a los costos. Un aspecto aún más importante es que las vacunas de microorganismos vivos suelen dar mejor inmunidad que las que se fabrican con microorganismos inactivados. Una de las razones por las cuales ocurre esto es que los virus de las vacunas de microorganismos vivos invaden a las células del hospedero e inducen la producción del interferón, lo cual proporciona una protección precoz a los animales susceptibles. Es probable que la mayor eficacia de las vacunas viables también se deba a la distribución de los microorganismos viables en el cuerpo, así como los cambios bioquímicos que resultan del proceso de darles muerte (58).

Ventajas y desventajas comparativas entre vacunas viables e inactivas.

Ventajas de las vacunas viables:

- Permiten una aplicación en masa.
- Producen una respuesta inmune local mediada por IgA.
- Pueden ser administradas por varias rutas, como la ocular, oral, nebulización, etc.
- Suelen ser menos caras que las inactivadas.
- Requieren menos manipulaciones de las aves, lo que se traduce a un menor estrés.
- Menor necesidad de mano de obra.
- Se deben inocular pocas dosis.
- No se requieren adyuvantes.
- Menos posibilidad de causar hipersensibilidad.
- Inducen la producción de interferón.

Desventajas de las vacunas viables:

- Pueden provocar enfermedad si son usadas inadecuadamente.
- Puede ser causa de diseminación de la enfermedad a lotes susceptibles.
- Un fallo en la conservación de la vacuna o de su aplicación representa dejar sin protección a la totalidad del efectivo o a un gran número de las mismas.
- Hay una menor respuesta humoral que con las inactivadas.

Ventajas de las vacunas inactivadas:

- Son estables cuando se almacenan.
- No es probable que causen enfermedades por el hecho de que se conserve alguna virulencia residual.
- Es poco probable que contengan microorganismos contaminantes.
- Suele ser mucho más seguras.

Desventajas de las vacunas inactivadas:

- Son más malignos como inmunógenos.
- Hay graves reacciones locales por uso de adyuvantes.
- La dosificación múltiples o elevadas dosis individuales del antígeno, aumenta los riesgos de producir reacciones de hipersensibilidad, por lo que,
- Es más costoso.
- Hay mayor estrés.
- Se requiere mayor mano de obra.
- Su aplicación es exclusivamente parenteral.

## **6.2. Vacunas recombinantes.**

En contraste a la vacunación clásica donde se administran directamente los antígenos (exopolisacáridos, toxina, virus o bacteria), la vacunación con AN involucra la administración de material genético (ADN o ARN) el cual codifica el antígeno, que se sintetizará entonces in vivo. En cierto sentido son como las vacunas que presentan uno o unos pocos antígenos, excepto que el antígeno se produce dentro de las células del individuo a inmunizar. Hay dos aspectos únicos de las vacunas basadas en ADN que los hacen particularmente interesantes para perseguir. El primero es la posibilidad de la expresión duradera del gen resultando en una presentación mantenida de los antígenos en niveles estimulantes para el sistema inmune. Esto podría obviar la necesidad de las inyecciones de recuerdo, y pueden igualar o superar la respuesta inmunológica. Sin embargo, también puede resultar en una presentación crónica que acabe con alergia, tolerancia auto-inmune. El segundo aspecto de la inmunización basada en ADN se debe a la síntesis de antígeno in vivo dentro de las células (pero sin infección) y a su presentación al sistema inmune por proteínas de la clase MHC I. De este modo conseguiremos una respuesta celular, y si los antígenos pasan a sangre también obtendremos una respuesta humoral (36).

Las técnicas de DNA recombinantes son muy útiles en cualquier situación en la cual se necesite sintetizar antígenos proteicos en cantidades muy grandes,

con un elevado grado de pureza. Desafortunadamente las proteínas puras de este tipo a veces son malos antígenos, debido a que no son suministradas con eficacia al sistema de células sensibles a los antígenos (58).

El uso de microorganismos transportadores atenuados tienen algunas limitaciones intrínsecas, y todas las desventajas de las vacunas vivas modificadas (58).

La principal ventaja de estos vectores infecciosos del virus de la vacuna es la posibilidad de inducir respuestas mediadas por células insertando las proteínas víricas expresadas en la membrana de la célula hospedera en contexto con los antígenos de histocompatibilidad (4)

La inmunización genética tiene muchas ventajas comparando con vacunas convencionales en que éstos son posibles para expresar antígenos en una forma que promueve el procesamiento natural y presentación para los linfocitos. Además las vacunas de DNA son seguras, estables e inducen una respuesta más duradera (5).

Aunque las "vacunas ADN" no inducen respuesta citotóxica en los linfocitos T, tienen la propiedad de actuar contra la núcleo-proteína (NP). Los estudios indican que "las vacunas ADN" inducen las tres respuestas inmunes: humoral, celular y citotóxica. Hay indicios de que además la inmunidad persiste por mayor tiempo (22).

### **6.3. Péptidos sintéticos.**

Desafortunadamente es muy costoso sintetizar péptidos (58).

Un inconveniente importante de las síntesis de vacuna de péptidos será la posibilidad de que la estructura terciaria forme epítomos decisivos (un epítomo formado por yuxtaposición de dos secuencias de péptidos distintas). Estos epítomos complican los intentos para deducir la secuencia de péptidos y llevan a cabo estas configuraciones complejas en el producto sintético (4).

Bajo ciertas circunstancias, las vacunas sintéticas pueden ofrecer considerables ventajas para la estimulación de respuestas inmunes localizadas y definidas. Sin embargo, una mayor limitación del uso de péptidos como vacuna es la inestabilidad del péptido natural. Esta desventaja puede sobrevenir por la regresión de la dirección del péptido transformado al péptido original (39).

Por otra parte los péptidos sintéticos son pobres inmunógenos debido a su tamaño molecular pequeño y su vida media muy corta en suero (unos pocos minutos), así como su rápida degradación por enzimas proteolíticas. Así mismo, la cantidad mínima de péptidos requeridos para unirse a un número mínimo de las moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor clase II superficiales para activar células T es considerablemente alta para los antígenos procesados (5).

#### **6.4. Vacunas de subunidades.**

el costo de estos preparados ha impedido su obtención a escala comercial (4).

### **7. PRINCIPALES MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS.**

El éxito de toda posible vacuna depende principalmente de su inocuidad y de su eficacia. No obstante a la hora de idear y producir una vacuna, y en definitiva a la hora de producirla a escala comercial, el factor económico tendrá una importancia fundamental (4).

#### **7.1. INACTIVACIÓN.**

Cuando es necesario inactivar a los microorganismos para que formen parte de una vacuna, resulta deseable que, desde el punto de vista antigénico, los microorganismos inactivados sean tan similares a los microorganismos vivos como sea posible(58).

Los métodos más utilizados para inactivar un virus es a través del calor (25 C), mediante el uso de sustancias químicas como la Beta-propiolactona o el formaldehído, por métodos físicos como el ultrasonido o las radiaciones (23).

Un método agresivo para matar microorganismos como el calentamiento, el cual produce una desnaturalización proteica o la oxidación de los lípidos, no resulta satisfactorio. Si se utilizan sustancias químicas, es esencial que se produzcan pocos cambios en los endógenos que estimulan los mecanismos de inmunidad protectora. Un compuesto que puede utilizarse con este objetivo es el formaldehído fórmico, el cual actúa sobre los grupos amino y amida de las proteínas y sobre los grupos amino que no están unidos por hidrógeno en las bases purínicas y pirimídicas de los ácidos nucleicos. Su propósito es formar puentes cruzados y darles así rigidez estructural. Las proteínas también se desnaturalizan de manera leve mediante el tratamiento con acetona o con alcohol. Los agentes alquilantes, los cuales producen uniones cruzadas en las cadenas de los ácidos nucleicos, también son adecuados para matar a los microorganismos, ya que, al dejar sin modificaciones a las proteínas superficiales de éstos, no interfieren con su antigenicidad. Algunos ejemplos de agentes alquilantes son: óxido de etileno, etilenoimina y propiolactona beta, los cuales se han utilizado en la preparación de vacunas de uso veterinario (58).

## 7.2. ATENUACIÓN.

Existen tantos métodos de atenuación como laboratorios productores de vacunas, y cada método se encuentra basado en un protocolo previamente investigado y estandarizado; así por ejemplo podemos encontrar una atenuación a partir de pases en circunstancias que no corresponden a las naturales, o en un individuo no receptible con algunos pases en individuos receptibles o mediante la conservación por largo tiempo en el mismo medio o por la adaptación a otros tejidos (23).

Si bien la diferencia entre organismos "vivos" y "muertos" es sólo de carácter bioquímico, posee una profunda influencia en la efectividad de las vacunas. Como solución alternativa, resulta posible disminuir la virulencia de un microorganismo hasta llegar al punto en el que, si bien está vivo no es capaz de causar la enfermedad (atenuación). Los métodos simples de atenuación incluyen en calentar los microorganismos un poco por debajo del punto térmico en que mueren, o exponerlos a concentraciones cercanas a las subletales de sustancias químicas inactivadoras (58).

Los métodos de atenuación que se suelen utilizar implican la adaptación de los microorganismos a condiciones no acostumbradas, de manera que pierden su capacidad de adaptación a su hospedero habitual, por ejemplo la vacuna de Pasteur para el cólera aviario (*P. Multocida*) se cultivó en condiciones en las cuales había una restricción de nutrimentos (58).

Así como las bacterias pueden volverse no virulentas al ser cultivadas en condiciones anormales, también es posible atenuar los virus haciendo que éstos se desarrollen en aquellas especies hacia las cuales no han sido adaptados en forma natural. Otros métodos para atenuarlos consisten en vacunar los virus de mamífero en huevos. En el caso de algunos virus de las aves, la atenuación se logra cultivándolos en huevos de otra especie; por ejemplo, el virus de la influenza de los pavos se atenúa en huevos de paloma (58)

En el momento actual, el método que más se utiliza para la atenuación es cultivo prolongado de tejidos, y la mayor parte de las vacunas que se utilizan en veterinaria se atenúan por este método. Si bien el cultivo de tejidos puede hacerse en muchas especies, lo más frecuente es utilizar cultivos de células de la especie que será vacunada, a fin de disminuir los efectos colaterales ocasionados por la administración de tejidos exógenos. En estos casos la atenuación de los virus se logra con sólo cultivar los microorganismos en células a las cuales no esté adaptados. Por ejemplo, el virus de moquillo canino, cuando es virulento, ataca de manera preferencial a las células linfoides. Su preparación para formar parte de una vacuna, consiste en que este microorganismo se cultiva con pasajes repetidos en células renales de perro, en las que pierde su virulencia (58).

En lugar de microorganismos atenuados por métodos artificiales, algunos procesos de vacunación utilizan microorganismos que en condiciones normales, se adaptan a otras especies pero que, desde el punto de vista antigénico, están relacionados. Por ejemplo, el virus de sarampión protege a los perros contra el moquillo, y el virus de la diarrea de los bovinos (BVD) protege contra el cólera porcino (58).

Por último, en ciertas circunstancias, es posible utilizar microorganismos completamente virulentos en los procedimientos de vacunación, como lo hacían los chinos con la viruela; sin embargo, ello sólo se hace cuando no se dispone de ninguna técnica mejor (58).

### **7.3. OTROS MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE VACUNAS.**

#### **7.3.1. Microorganismos genéticamente modificados.**

La atenuación se puede considerar como una forma primitiva de ingeniería genética. El resultado deseado está dado por el desarrollo de un agente que, de alguna manera, carezca de la capacidad para causar enfermedad. Esto puede ser difícil de lograr y la regresión a virulencia es un riesgo que está siempre presente. No obstante, las nuevas técnicas de ingeniería genética han hecho posible modificar los genes de microorganismos de manera deliberada, principalmente para que se puedan atenuar de manera irreversible. Por ejemplo, actualmente se dispone de vacunas manipuladas por ingeniería genética contra el herpes virus que causa la pseudorrabia en cerdos. La timidina cinasa es necesaria para que el herpes virus se replique en las células que no se dividen, como las neuronas. Aquellos virus a los que se les ha retirado el gen de la timidina cinasa han sido capaces de infectar a células nerviosas, pero no se pueden replicar y, por lo tanto, no pueden causar enfermedad (58).

Otro método para preparar virus avirulentos por ingeniería genética está dado por un rearrreglo de los segmentos genéticos en virus con genoma segmentado, como el rotavirus o la influenza. De manera alternativa, se pueden insertar un gen sin sentido, como el que se utiliza para generar mutantes sensibles a la temperatura, al genoma viral (58).

### **7.3.2. Vacunas recombinantes**

#### **a) Antígenos recombinantes.**

Las técnicas de recombinación de DNA se utilizan para aislar el material genético que codifica un antígeno de particular interés. Por lo tanto este DNA puede colocarse en una bacteria, levadura u otras células, y permitir que codifique dicha proteína. El primer intento por utilizar la clonación de genes para preparar una vacuna veterinaria se realizó con el virus de la glosopeda. Este virus es extremadamente simple. El antígeno protector (VP-1) está bien reconocido y ya se han mapeado los genes que codifican para este antígeno. El genoma RNA de virus se aisló de la glosopeda y fue transcrito a DNA por la enzima transcriptasa inversa. Posteriormente, el DNA se cortó con cuidado con endonucleasa de restricción de manera que contuviera sólo el gen que codifica para VP-1. Más tarde este DNA se insertó en un plásmido de *E. Coli*, dicho plásmido se insertó en una cepa de *E. Coli* y la bacteria se cultivó. La bacteria recombinante sintetizaba grandes cantidades de VP-1, el cual se cosechó, se purificó y se incorporó en una vacuna (4,58).

Otro método consiste en someter en clonación los genes interesantes en una microorganismo portador atenuado (58).

#### **b) Microorganismos recombinantes viables.**

Los genes que codifican una proteína específica pueden clonarse en forma directa en diversos microorganismos y en vez de ser posteriormente purificados, los microorganismos recombinantes mismos se utilizan como vacuna (4,58).

### **7.3.3. Péptidos sintéticos**

Si bien las moléculas de proteínas globulares pueden ser muy grandes, tienen un número limitados de epítomos pequeños. Además, sólo algunos epítomos son importantes para inducir inmunidad protectora, en tanto que otros pueden, en realidad, promover la supresión. Por ello si se conoce la estructura de un epítomo protector, se le puede sintetizar por medios químicos y se le puede utilizar como una vacuna. El procedimiento incluye una secuencia completa de antígeno de interés, seguido de la identificación de los epítomos importantes. Los epítomos se predicen mediante el uso de modelos computarizados de la proteína, o mediante el uso de anticuerpos monoclonales para identificar los componentes protectores críticos. Una vez identificados, los péptidos protectores se sintetizan y se utilizan como una vacuna (58).

Se han desarrollado vacunas sintéticas experimentales contra la hepatitis B, el fago MS2, la toxina diftérica, y el virus de la glosopeda y la influenza A, todas ellas provocan alguna inmunidad protectora (58).

#### **7.3.4. Vacunas antiidiotipo**

Los anticuerpos contra este idiotipo tienen la misma estructura tridimensional que el epítipo inductor. Para inmunizar a un animal, los anticuerpos antiidiotipicos se pueden preparar utilizando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo en cuestión. Los anticuerpos antiidiotípicos producidos se pueden utilizar, a su vez, para vacunar a otro animal (58).

Si bien el uso de estos antiidiotipos aun no ha sido ensayado en pruebas de campo, representa una estrategia de vacunación nueva (58).

### **8. PRUEBAS QUE SE UTILIZAN PARA EVALUAR UNA VACUNA**

La realización de pruebas que evalúen la calidad de los productos utilizados para la vacunación aviar tienen como objetivos garantizar que las vacunas utilizadas en los programas sean seguras y eficaces. En México, la legislación establece un sistema de control sobre las vacunas utilizadas en el país, las que deben ser sometidas a unas series de pruebas establecidas por la dependencia responsable, antes de ser autorizada su distribución (24).

Garantizar la calidad de las vacunas es un proceso complejo, ya que se piensa erróneamente que la calidad se establece en pruebas realizadas al envase final. La autoridad tiene la responsabilidad de verificar que el fabricante cumple con las buenas prácticas de fabricación, lo que implica el control desde las materias primas, hasta la distribución del producto entre otros (24).

La Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural emitió con fecha 17 de enero de 1995 la Norma Oficial Mexicana NOM-012-ZOO-1993, titulada Especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. Con una modificación en la misma con fecha 3 de junio de 1998, ambas normas son publicadas en el Diario Oficial de la Federación y lo establecido en las mismas son los requerimientos oficiales reconocidos en el país (24).

Según lo establece esta Norma, las pruebas que componen el control de calidad para productos biológicos son los que se enlistan en el siguiente cuadro:

**Cuadro 6. Pruebas que se realizan para el control de calidad de productos biológicos.**

Fisicoquímicos	Análisis de concentración. Análisis de inactivantes. Análisis de preservativos. Análisis de adyuvantes. Análisis de proteínas.
Biológicos	Titulación. Inocuidad o seguridad. Potencia en animales de laboratorio o métodos alternos reconocidos internacionalmente.
Microbiológicos	Pureza. Esterilidad. Identidad.
Inmunológicos	Titilación in vitro. Identidad serológica. Sensibilidad. Especificidad.

## BIOLÓGICOS

**Prueba de titulación-** Siempre se realiza cuando se trata de una vacuna viva, su objetivo es conocer la carga viral que contiene dicha vacuna, la Secretaría establece títulos mínimos que debe contener cada producto.

**Prueba de inocuidad y seguridad-** Se inoculan aves, por lo general, con una doble dosis de vacuna. Los animales son observados diariamente durante el desarrollo de la prueba. El objetivo de esta prueba es verificar que los animales no presenten signos de la enfermedad atribuibles al producto.

**Prueba de potencia-** salvo excepciones, por lo general esta prueba se realiza enfrentando aves vacunadas con cepas de desafío (altamente patógenos), y su objetivo es el de comprobar la capacidad de inmunogenicidad y de protección conferida por el producto.

## MICROBIOLÓGICOS

El objetivo de estas pruebas es verificar mediante la inoculación en medios para el desarrollo de bacterias, hongos y mycoplasma, la ausencia de cualquier contaminación microbiológica. De lo contrario se reporta contaminación en el producto biológico y éste se rechaza.

**Prueba de identidad-** Se realiza mediante pruebas serológicas, empleando sueros específicos.

Desde que el acuerdo sobre la aplicación de medidas sanitarias y fitosanitarias de la Organización Mundial de Comercio encomendara a la Oficina internacional de Epizootias (OIE) la tarea de proponer los criterios zoonos sanitarios aplicables al comercio internacional, la normalización de las técnicas de laboratorios reviste una importancia creciente a nivel internacional. El proceso de normalización comprende: la garantía de calidad, validación de ensayos, sueros y reactivos internacionales de referencia y modalidades estándar para los ensayos inmunoenzimáticos (46).

Actualmente, fronteras, continentes y océanos dejaron de constituir un obstáculo de relieve para el libre movimiento de bienes y servicios. En virtud de las disposiciones del Acuerdo General Sobre Aranceles Aduaneros y Comercio de la Organización Mundial de Comercio, los gobiernos nacionales ya no pueden oponerse a la importación de vacunas veterinarias sin demostrar científicamente que el producto en cuestión supondría una amenaza para la salud o la seguridad de su país. El origen y los modos de gestión de los laboratorios que fabrican vacunas veterinarias son tan diversas como los métodos basados en el control del proceso de fabricación como los empleados en el control de la eficacia e inocuidad del producto. A nivel internacional han visto a la luz siete iniciativas que responden al propósito común de revisar esos sistemas reglamentarios y, cuando sea posible armonizar normativas y/o reconocer equivalencias para facilitar el movimiento de productos. Un intercambio continuo de información, a nivel tanto regional como internacional, puede ser de gran ayuda para garantizar la calidad de vacunas veterinarias y asegurar que cualquier programa zoonos sanitario del mundo pueda realizarse (47).

## 9. PRINCIPALES VÍAS DE ADMINISTRACIÓN, CARACTERÍSTICAS Y FORMA DE APLICACIÓN DE LAS VACUNAS.

La aplicación de las vacunas en una parvada es variable dependiendo del tipo de vacuna. Elegir la ruta adecuada para su administración a veces no es tan sencillo pues cada forma de aplicación presenta sus ventajas e inconvenientes (48).

A continuación se describe las posibles vías para la administración de vacunas, la metodología de las mismas, sus ventajas y desventajas:

### 9.1. Inyecciones subcutáneas e intramusculares.

El método más simple y más común para la administración de vacunas es la inyección subcutánea o intramuscular. Esta vía es excelente, para los grupos relativamente pequeños de animales y para enfermedades en las cuales es importante la inmunidad sistémica. Sin embargo, en algunos trastornos, la inmunidad sistémica no es tan importante como la local y es más probable que sea más adecuado administrar la vacuna en el lugar en que pueda producirse invasión potencial (58).

Estos medios de administración de vacunas precisan algo de experiencia, pues los errores de vacunación pueden ser elevados debido a fallos en las jeringas automáticas o a inoculaciones en lugares no adecuados. La vacuna intramuscular consiste en la inoculación del producto en el músculo, -pechuga, muslo, etc-, mientras que en la subcutánea la inoculación se realiza por debajo de la piel de la nuca, elevándola con los dedos para que quede un espacio entre ésta y las estructuras subyacentes (48).

Las ventajas de ambos métodos son:

- Buena uniformidad.
- Alta inmunidad tisular y humoral.

Las desventajas comprenden:

- Estrés al manipular las aves.
- Posibilidad de enquistamientos debidos a la incorrecta inoculación por pinchazos en otras estructuras.
- Mano de obra y costo elevado.

## 9.2. Agua de bebida.

Las aves pueden ser inmunizadas administrando vacunas de virus vivo con el agua de beber. De este modo, se vacunan gran número de aves sin necesidad de aumentar el personal para el manejo de las aves una por una. Los virus empleados en la vacunación por medio de agua de beber producen infecciones leves y sólo deben darse a las aves en buen estado de salud. Las que están enfermas o fuertemente parasitadas no siempre adquieren inmunidad suficiente para su protección. En tales circunstancias, es aconsejable demorar la vacunación hasta que la parvada haya recibido tratamiento y se haya establecido completamente (15).

La vacunación administrada en el agua de bebida puede ser inactivada (destruida por desinfectantes o sanitizadores como cloro y otros químicos) (34,48,59).

Se debe evitar usar un medicador para la administración de vacunas, si ésta ha sido usada para medicación o desinfectantes. La leche en polvo es frecuentemente sugerida como un diluyente para ayudar a proteger la vacuna de daños por desinfectantes y sanitizadores (59).

Este tipo de vacunación es el método más comunmente utilizado para la enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa y Gumboro. La vacunación a través de agua de bebida es el método más adecuado y económico para la aplicación de virus vivo (21).

Para su aplicación las aves deben estar lo suficientemente sedientas para que consuman inmediatamente la vacuna preparada en el agua. Para ello se suele dejarlos sin agua durante un cierto tiempo variable según la estación de año, ya que en épocas de calor puede ser suficiente con una hora, mientras que en otras épocas deben aumentarse el tiempo de privación. No es pertinente prolongar más el período en que no se les dé agua ya que si las aves están muy sedientas, pueden que acaben pronto con el agua con la vacuna y que ésta no alcance para todas, por lo que algunas de ellas se quedarán sin vacunar (15).

A la hora de preparar la dilución de la vacuna suele emplearse leche descremada para neutralizar los posibles desinfectantes y proteger a los virus vivos contra la ósmosis producida en su dilución en grandes cantidades de líquidos. Para ello se usan de 2.5 a 3 g/l de leche en polvo o de 25 a 30 cc de leche fresca/l de agua (15,48).

Las ventajas de este método de vacunación son:

- No hay apenas estrés para las aves ya que el manejo de las mismas es mínimo.
- No suelen producirse reacciones secundarias.

Los inconvenientes se traducen en:

- Protección limitada pues se alcanzan títulos de anticuerpos bajos.
- Baja inmunidad tisular.
- Distribución de la vacuna sobre la parvada no uniforme.

La mayoría de los agentes infecciosos se encuentran en las mucosas que están protegidas por anticuerpos producidos localmente más que de manera sistémica. Al presente, la mayoría de las vacunas se administran de modo sistémico en vez de oral, en gran parte debido al problema de degradación enzimática en el intestino. Los nuevos desarrollos se han dirigido a sobreponerse a este problema y el hacer el uso del hecho de que la inmunización oral proporciona una respuesta diseminada de IgA en la superficie de las mucosas del árbol respiratorio y otras áreas relacionadas con el sistema inmunitario de las mucosas. Uno de los enfoques más útiles es el empleo de la encapsulación de antígenos dentro de las partículas biodegradables tales como copolímeros poli-DL-láctico-co-glicerol. Las partículas protegen al antígeno después de la digestión y enfocan su distribución a las placas de Peyer (65).

En un trabajo desarrollado por Black (1996), donde aporta un proceso llamado microencapsulación, el cual consiste en la protección del agente inmunizante con poly (DL-láctico-co-glicerol), él dice que mediante el uso de este polímero, la liberación controlada del agente inmunizante que puede tardar por semanas o meses puede ser obtenido. El poly es totalmente biodegradable, no tóxico, y no inmunogénico. Los agentes revestidos con este polímero son protegidos contra el pH bajo del estómago y proteasas cuando se dan oralmente, el cual es muy importante para la estimulación inmunológica del intestino. Este también ha sido demostrado para potencializar la estimulación de secreción y circulación de anticuerpos. Estas investigaciones están en progreso actualmente (17).

### **9.3. Aspersión -Spray-.**

Constituye otro método de vacunación masivo en el que no existe una metodología de vacunación única, pues cada aparato tiene las suyas. Por esta razón es importante leer detenidamente las instrucciones del fabricante del aparato combinándolas con la que requiera la vacuna (48). Al igual que la de agua de bebida, también es frecuentemente utilizado para Newcastle, bronquitis infecciosa y Gumboro (21).

Es un buen método de vacunación para procesos respiratorios si se tiene la precaución de vigilar el tamaño de la partícula micronizada aplicadas ya sea en el aire, sobre el ave, o en el pico (45,48). Un tamaño excesivamente grande impedirá la asimilación de la vacuna por el ave o que ésta no penetre lo suficiente en las

vías respiratorias altas. En cambio, un tamaño demasiado pequeño posibilitará el acceso a zonas profundas del aparato respiratorio, con lo que aumenta la posibilidad del daño tisular y de reacciones secundarias (48).

Las ventajas de este método son:

- Poco manejo de las aves por lo que apenas hay estrés.
- Buena inmunidad y altos títulos de anticuerpos.
- Administrada correctamente, es mejor método que en el agua.

Las desventajas comprenden:

- Es preciso adquirir el equipo de administración.
- Reacciones severas o fallos de vacunación si el tamaño de partícula es inadecuada.

#### **9.4. Intraocular o intranasal.**

Consiste en depositar la vacuna en el ojo o en los orificios nasales, respectivamente. Es importante que la vacuna desaparezca después de un parpadeo -ocular- o inhalación -nasal-, antes de soltar a cada animal. Este método asegura una protección de casi el 100% y se aconseja que se realice cuando vayan a manejarse a las aves para otras operaciones como pesaje u otros manejos requeridos en la parvada (48).

Las ventajas son:

- Buena inmunidad tisular y elevado títulos de anticuerpos.
- Gran uniformidad en la respuesta inmunitaria.

Las desventajas:

- Las aves son sometidas al estrés de la captura.
- Penetración poco profunda en los tejidos respiratorio.
- El manejo una por una de las aves requiere mano de obra y repercute en un mayor costo.

#### **9.5. Punción alar.**

Se aplica por punción del pliegue del ala (45,48). Para ello hay que extender el ala y quitar las plumas debajo de la membrana alar y punzar con el aplicador -una lanceta de dos puntas- en la membrana y no en el músculo. Hay que embeber perfectamente el aplicador en la vacuna y cambiarlo cada cierto número de aves para evitar contaminaciones bacterianas. Su eficacia se realiza

examinando al cabo de algunos días –de 5 a 10- las pústulas de reacción –para ver si han “prendido”- en el punto de aplicación (48).

Las ventajas son:

- Buena uniformidad inmunitaria del lote.
- Posible de ver si han “prendido” o no.

Desventajas:

- Reacciones secundarias si se aplican en el músculo.
- Exigencia de mano de obra y costo elevado.

### **9.6. Vacunación in ovo.**

Un nuevo enfoque en la vacunación a edad temprana lo constituye la vacunación durante el estado embrionario del pollito, antes de nacer. Este es el sistema conocido como in ovo pues realmente se vacuna mientras el pollito está “dentro del huevo” (62).

Inovoject es el nombre del sistema patentado por Embrex (1986) para inyectar huevos automáticamente a la transferencia, eliminando la necesidad de vacunar al nacimiento. Este sistema de alta velocidad está diseñado para inyectar vacunas, estimulantes del sistema inmune, promotores de crecimiento y otros medicamentos que necesitan calibración precisa, las cuales son inyectados en el huevo sin causar ningún daño ni trauma al embrión (25).

El sistema es un diseño basado en principios eléctricos, mecánicos y biotecnológicos que opera con aire comprimido y electricidad, elementos siempre disponibles en la plantas de incubar. El sistema propiamente tal es una combinación de tecnología de vacunación con un sofisticado proceso de inyección cuyo resultado es un eficaz sistema de inyectar huevos a la transferencia (25).

La vacunación in ovo se realiza durante la transferencia, es decir, en el momento cuando los huevos embrionados se pasan de la máquina incubadora a la nacedora. Bajo condiciones normales, los huevos se colocan en las bandejas de las nacedoras a los 18 días de incubación para permanecer en la nacedora los últimos tres días del período de incubación. El sistema de vacunación embrionaria aprovecha este “traspaso” para el proceso de la vacunación que consiste en inyectar, a través de un orificio hecho en la cáscara, los huevos embrionados (62).

Una de las principales ventajas de este sistema es que tiene la capacidad de vacunar de 20,000 a 50,000 huevos por hora (dependiendo de la configuración de las bandejas de huevos) y, sólo se necesitan dos operadores, además de transferir los huevos a las bandejas de la nacedora (25,33,57).

Entre las ventajas de las vacunas in ovo, además de disminuir mano de obra, mejoran los nacimientos, proporcionan una tasa de mortalidad más baja, mejora la eficacia de conversión, el tamaño de las aves al nacer y reduce el número de decomisos (25). Los pollitos son más sanos debido a que el sistema vacuna consistentemente el 100% de los embriones con absoluta precisión, eliminando el problema de dosis incompleta, lo cual es muy común en los métodos de vacunación manual. La disminución en la manipulación del pollito después del nacimiento contribuye a los mejores resultados (25,42).

Una gran ventaja es una reducción hasta del 90% de la labor de vacunación (12).

Una desventaja de la inyección de los huevos es el desarrollo de enfermedades causadas por hongos por la perforación de la aguja que no es cerrada, por lo tanto las nacedoras tiene que estar libres de hongos cuando es usada esta tecnología (12).

El principal problema es *Aspergillus*, el cual se puede controlar con una higiene y bioseguridad adecuada, sin tener que cerrar el hueco producido (57).

Las vacunas administradas por esta ruta es la de la enfermedad de Marek y recientemente iniciado la de Gumboro. En la actualidad aproximadamente el 80% de los pollos de engorda en los Estados Unidos de Norteamérica son vacunados vía inovoject (equivalente a 6 billones de inyecciones por año) (6,33).

En lo que se refiere a las vacunas, Embrex busca por este sistema, poder eliminar completamente la necesidad de inyectar a los pollitos al nacer (25).

Actualmente se trabaja en el desarrollo de nuevas vacunas de virus "muerto" o inactivado para inyectar a los huevos fértiles para proteger a los pollitos de la enfermedad de Newcastle e Influenza aviar. Las vacunas in ovo de hoy son vivas (19,60).

Los científicos del departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA) han realizado experimentos con vacunas in ovo contra Newcastle que utiliza virus muerto y han obtenido resultados positivos, teniendo ventajas como: es más seguro para los pollos, no hay síntomas de la enfermedad, la dosis es más pequeña que la que se suministraba a los pollitos (60).

En el mercado solamente la vacuna de Marek está en uso, no se vende una vacuna in ovo para múltiples enfermedades (6).

Recientemente Rosenberger, et al (1997). Ha demostrado en experimentos repetidos que la vacunación in ovo contra la enfermedad de Marek interviene en la inmunización de un día de edad contra bronquitis infecciosa en pollo de engorda. Ellos han demostrado que la vacunación con dosis completa de la vacuna de enfermedad de Marek in ovo compromete la habilidad de los pollos para responder

a la administración de la vacuna de bronquitis infecciosa a un día de edad. También demostraron que la respuesta a la vacuna de la enfermedad de Newcastle no fue afectado ni tampoco fue reforzado por la vacunación in ovo de la enfermedad de Marek (20).

Otros métodos, pocos usados son:

### **9.7. Escarificación.**

Es un método que consiste en realizar un raspado de la piel del ave aplicando la vacuna en la zona mediante un pincel o aplicadores tópicos multidosis comerciales (45).

Las ventajas de este método son:

- Se consigue niveles altos de inmunidad.
- Buena uniformidad inmunitaria del lote.
- Puede apreciarse la reacción vacunal.

Las desventajas son:

- Estrés causado por el manejo.
- Exigencia de mano de obra y costo elevado.

### **9.8. Polvo.**

Vacunación en el aparato respiratorio por medio de los orificios nasales (45).

### **9.9. Folículo plumoso.**

Por el desplazamiento de varias plumas y frotar o esparcir la vacuna sobre la zona (45).

### **9.10. Cloacal.**

En los tejidos de la porción superior de la cloaca (45).

Por último, se ha propuesto otro sitio de administración de vacunas al pollo de un día de edad, ésta es en la región abdominal usando un inyector automático

modificado. Este inyector, según resulta describiendo eficacia y seguridad de las vacunas usadas comunmente, por ejemplo vacunas de virus del herpes para pavos (VHP) para Marek. Los resultados demuestran que la ruta de inyección abdominal es un método aceptable de administración de sustancias a pollos de un día de edad (54).

Otra vacuna aplicada por vía intraabdominal a un día de edad es contra *E. tenella* (vacuna con 100,000 esporozoitos o 10,000 oocitos) han dado como resultado una inmunidad aceptable (55).

## 10. PROGRAMA DE VACUNACION

En la práctica, no existe un programa de vacunación rígido e infalible que pueda ser utilizado en cualquier parvada de pollo o reproductoras de cualquier región. Los programas varían de acuerdo con las enfermedades presentes en la zona, el grado de desafío, la aparición de nuevos serotipos o variantes, la experiencia de los individuos responsables del programa, la disponibilidad de productos, las prácticas de manejo y las políticas propias de la empresa (61).

De tal manera, las necesidades de cada empresa son diferentes y por lo tanto, sus objetivos en materia de prevención de enfermedades por medio de prevención (61).

Un programa de inmunización designado para hacer frente tanto al área como los requerimientos propios del ave es esencial para mantener la salud de la parvada, por lo que los programas de inmunización requieren de revisión periódica (44).

El programa de vacunación debe realizarse de acuerdo a:

- Las enfermedades presentes en el país o alguna región lo cual nos permite identificar los principales problemas.
- El historial de la granja en cuanto a enfermedades y de las enfermedades de las zonas aledañas.
- Conocimiento de los mecanismos de inmunidad y el papel de la inmunización.
- Monitoreo serológico (perfil de la parvada).

Esto no se debe ignorar a la hora de realización de programas de vacunación (37).

Otro aspecto para definir un esquema de vacunación es considerar los factores divididos en básicos y complementarios. Los aspectos básicos incluyen las características de las vacunas, la de la enfermedad infecciosa y las del sujeto

que va a recibirlas. Los aspectos complementarios son la vía de administración, la utilización de dosis múltiples de la misma vacuna y el intervalo de aplicación entre éstas, así como el suministro simultáneo de diferentes vacunas (23).

Al diseñar un programa de vacunación, la lógica de aplicar primero las vacunas vivas y después las vacunas muertas, consiste en inducir al inicio una máxima expansión del sistema inmune aplicando un estímulo vivo y duradero que imite lo más cerca posible a la infección natural, desatando una respuesta primaria que resulte en el establecimiento de una memoria inmunológica robusta y duradera. Una vez que esto se logra, se procede a la aplicación de vacunas muertas de “refuerzo” con el propósito de lograr, un mayor estímulo del sistema inmune, induciendo una inmunidad que proteja permanentemente a la parvada (9).

Si el programa de vacunas no ha sido bien estudiado y ejecutado podría hacerles más daño que bien a las aves. Si no sabemos cuales son las enfermedades prevalentes en el área podríamos infectar a las aves con virus innecesarios cuando los vacunamos. Se ha llegado a creer que los brotes más serios de laringotraqueítis en los Estados Unidos han sido causados por las mismas vacunas. Las vacunas para los virus equivocados o serotipos pueden causar reacciones respiratorias serias. La situación podría volverse más compleja impidiendo tratarla con antibióticos debido a la resistencia de los microbios por el uso indiscriminado de algunos antibióticos (44).

## **11. ADMINISTRACIÓN SIMULTÁNEA DE VACUNAS**

Existen varios criterios a cerca de la administración simultánea de vacunas.

Para esto se debe tener presente el fenómeno de la interferencia. Si se administra una vacuna viral viva y después se administra una vacuna viva diferente, la segunda inmunización puede quedar inhibida. Este efecto parece ser mediado por el mecanismo antiviral del interferón (3).

Los resultados de ensayos en los que se han administrado simultáneamente dos o más vacunas (al mismo día pero en sitios diferentes) han demostrado que la seroconversión, protección y efectos adversos son similares cuando cada una se administra en forma separada (24).

### **11.1. Vacunas mixtas**

Debido a la complejidad de varios síndromes y enfermedades de los animales, se ha vuelto una práctica común el usar mezclas complejas de microorganismos en vacunas únicas (58).

Investigaciones realizadas han demostrado que concentraciones bajas de baytril tienen efecto negativo sobre la vacuna de Marek, mientras que concentraciones altas es trágico para dicha vacuna. Por lo anterior se debe ser prudente para la realización de dichas combinaciones (29).

Actualmente la vacunación y la medicación in ovo (tecnología Embrex) está reemplazando el manejo de los pollitos a un día de edad (12).

Experimentos recientes han demostrado que los resultados de estos tipos de inyección (in ovo) varían entre los antibióticos. Por ejemplo, ceftiofur (Exenel) usado in ovo a los 18 días de incubación, incrementó la habilidad de nacimiento y después a un desafío a *E. coli*, al día (el cual fue tres días después de la inyección de ceftiofur), redujo la mortalidad temprana del pollito. También se ha demostrado que los antibióticos pueden reducir la PFU (unidades formadoras de placas) cuando son inyectadas en combinación con la enfermedad de Marek. Estos antibióticos no afectan la potencialidad de la vacuna (12).

### **11.3. Dosis múltiples de la misma vacuna e intervalo entre su aplicación.**

Varias vacunas requieren administrarse en más de una dosis para producir una respuesta inmunológica que brinde protección; al mismo tiempo para algunas deben usarse dosis de refuerzo para mantener un nivel adecuado de anticuerpos protectores. La necesidad de aplicar múltiples dosis de una vacuna se explica por la naturaleza de los antígenos que contiene y por la respuesta inmunológica del receptor. La aplicación de una dosis de vacuna inactivada confiere una respuesta inferior que una sola dosis con un biológico con capacidad de replicación (24).

El intervalo mínimo entre la aplicación de dosis de la misma vacuna es de 4 a 6 semanas, debido a que es el tiempo conocido en el que se estimulan las células de la respuesta inmunológica, interaccionan entre sí y producen los elementos responsables de la protección (24).

## **12. FRACASOS DE LA VACUNACIÓN**

Existen muchas razones por las cuales una vacuna no logra conferir inmunidad protectora a un animal. En algunos casos la vacuna es realmente ineficaz. Esto se debe a que contiene una cepa equivocada de microorganismos o que los antígenos no son los adecuados. El método de fabricación puede haber destruido los epítomos protectores, o puede ser simplemente que la vacuna contenga cantidades insuficientes de antígeno. Tiene mayor importancia el fracaso de una vacuna eficaz para estimular la inmunidad protectora. En algunos casos, ello puede atribuirse a una administración no satisfactoria. Una vacuna de

microorganismos vivos puede haber “muerto” ya sea debido a un mal almacenamiento, al uso de antibióticos junto con vacunas bacterianas vivas, al uso de sustancias químicas para esterilizar las jeringas. En ocasiones, los animales que reciben las vacunas por vías no convencionales pueden no lograr una protección (58).

Cuando se vacunan poblaciones grandes de aves, es común administrar la vacuna como aerosol o en el agua para beber. Si el aerosol no se distribuye de manera uniforme en un edificio o si algunos animales no consumen agua, pueden recibir cantidades insuficientes de vacuna. Aquellos animales que posteriormente presentan la enfermedad, pueden interpretarse como casos de fracaso de la vacuna (58).

Incluso aquellos animales que han recibido una dosis adecuada de una vacuna eficaz, pueden no resultar protegidos. Si el animal vacunado incubaba la enfermedad antes de la inoculación, entonces la vacuna puede recibirse demasiado tarde y no podrá modificar su evolución. En forma más común, el animal puede fallar en montar una respuesta inmunitaria (58).

La respuesta inmunitaria, con el sólo hecho de ser un proceso biológico, nunca confiere una protección absoluta, y nunca es igual en todos los miembros de una población vacunada. Esta respuesta se ve influida por muchos factores genéticos y ambientales (58).

Existe otro grupo de fracasos de la vacuna cuando se suprime la respuesta inmunitaria normal. Por ejemplo, los animales muy parasitados o desnutridos pueden tener una inmunosupresión y no deben vacunarse. Algunas infecciones virales inducen una inmunosupresión profunda. El estrés en general, incluyendo temperaturas extremas, la fatiga o la desnutrición, hacen que disminuya la respuesta inmunitaria. La causa más importante de este tipo de fracaso de la vacunación se debe a la presencia de la inmunidad pasiva procedente de la madre de los animales de poca edad (58).

Los errores en la vacunación de las parvadas no es poco común dando como consecuencia un fracaso de la vacunación (28).

Los siguientes puntos son algunos de estos problemas comunes:

a. Manejo de la vacuna.

1. Vacuna almacenada en un refrigerador inapropiado.
2. Demasiadas vacunas mezcladas antes de usarlas (más de dos horas).
3. Traslado de la vacuna a la granja sin refrigeración.

b. Vacunación en agua.

1. La línea principal del agua no está limpia, por lo que hay inactivación de la vacuna.
2. Insuficiente agua usada para la vacunación.
3. Las líneas de agua no son llenadas antes del comienzo de la vacunación.
4. El agua de las líneas sanitizadas no son removidos en tiempo adecuado antes de la vacunación.

c. Vacunación por aspersion.

1. Tamaño incorrecto de la gota usada para la aspersion.
2. Muy poco mezclada la vacuna aplicada (no todas las aves expuestas a la vacuna).
3. Parvada manejada inapropiadamente antes de la vacunación por aspersion.
4. Luz no tenue durante la aspersion.
5. Sistema de ventilación no apagado durante la aspersion.
6. Sistema de ventilación no activado después de la aspersion.

d. Vacunación en la membrana del ala o por gota en el ojo.

1. Los inoculadores adecuados no se mantienen verticales durante su uso.
2. Demasiada vacuna mezclada antes de usarse.
3. Vacuna de la membrana alar aplicada por medio de gota al ojo y vacuna de gota para el ojo aplicada por la membrana alar.

e. Administración de vacunas inactivadas.

1. Vacuna no atemperada a 32 C antes de su uso.
2. Vacuna no administrada en el sitio adecuado.
3. Tamaño inadecuado de la aguja usada.
4. Calibración no continúa de la dosificación.
5. Aguja no cambiada cada vez que sea necesaria.

f. Horario de vacunación y elección de la vacuna.

1. equivocación al leer la etiqueta e inadecuadamente usada la vacuna.

2. Vacuna no administrada el día programado.
3. Falla de la vacunación debido al horario inadecuado de la administración.
4. Falla de la vacunación debido a la falta de una planeación adecuada.
5. Vacuna permitida para fecha de experimentación pasada (control deficiente del inventario).

Por lo tanto cabe mencionar, que cuando las vacunas no son manejadas y/o administradas adecuadamente las aves no desarrollan la inmunidad esperada y, por lo tanto, son susceptibles a sufrir infecciones y enfermedades (61).

### **13. CONSECUENCIAS DESFAVORALES DE LA VACUNACIÓN.**

Los riesgos más importantes que acompañan al uso de las vacunas son: presencia de virulencia y toxicidad residuales, efectos alérgicos, producción de enfermedad cuando el receptor tiene una deficiencia inmunitaria, y complicaciones neurólicas. Además de las dificultades vinculadas a la virulencia y a la toxicidad, las vacunas, como cualquier antígeno, provocan reacciones de hipersensibilidad (58).

Es más frecuente que cualquier forma de hipersensibilidad acompañe a las inyecciones múltiples de antígeno y, por esa razón, tienda a asociarse con la utilización de las vacunas con microorganismos inactivados (58).

Ciertas vacunas pueden causar efectos adversos en la salud y productividad de las parvadas cuando se administran inapropiadamente. Algunas vacunas o parvadas vacunadas pueden convertirse en la fuente de infección y enfermedad clínica para parvadas jóvenes o más susceptibles (61).

Las aves se vacunan para asegurar títulos adecuados y prevenir brotes pero si las vacunas no se manejan bien la enfermedad puede propagarse (44).

### **14. RECOMENDACIONES PARA EVITAR UNA FALLA EN LA VACUNACIÓN.**

No obstante la perfección de la fabricación de una vacuna y las detalladas explicaciones para su uso, existen muchas fallas. En la mayor parte de los casos éstas pueden deberse al manejo y la administración del producto (45).

La historia nos ha enseñado que una vacunación correcta evita a la empresa avícola la pérdida de importantes cantidades económicas, por lo que

debemos supervisar que el proceso de vacunación sea llevado a cabo correctamente:

a). Tenemos que asegurarnos que las aves en quienes se aplicará el inmunógeno se encuentren en buen estado de salud.

b). Utilizar solamente biológicos aprobados y producidas con embriones SPF, además verificar que las cepas y/o serotipos que contiene el biológico sean Las adecuadas para la región avícola a donde se aplicará.

c). Verificar que la cantidad mínima de partículas virales que estipula la Secretaría de Agricultura y desarrollo Rural estén contenidas en los viales de la vacuna, además del certificado de control de calidad que proporciona el laboratorio productor.

d). Asegurar que el producto siempre se mantenga en las condiciones de almacenamiento que recomienda el fabricante.

e). Administrar el volumen de dosis que el fabricante de la vacuna recomienda, así como la vía de administración.

f). No administrar el biológico en agua con residuos de desinfectante.

g). Las vacunas que se administran en el agua de bebida deberán usar un producto que asegure la viabilidad de las partículas virales (leche descremada o caseínas comerciales con colorantes vegetales marcadores), esto nos permitirá evaluar si la mayoría de las aves consumió la vacuna.

h). Administrar la vacuna en el agua de bebida lo más temprano por la mañana, además dietar a las aves de agua de dos a tres horas o más (dependiendo de la época del año y edad de las aves), previo a la administración, provocando que el biológico se consuma en menos de una hora.

i). El veterinario responsable de la parvada deberá enseñar al personal operativo sobre el buen manejo del biológico, lo cual incluye, la reconstitución de la vacuna y el tiempo que debe pasar ésta en el medio ambiente, no es conveniente que el producto permanezca más de 20 minutos en manos del vacunador durante su administración.

j). Es conveniente que durante el proceso de vacunación se cambie las agujas por unas nuevas y desechables cada 1000 aves.

El éxito para que las parvadas alcancen los parámetros productivos ideales radica en parte en un buen proceso de vacunación, para lo cual se sugiere tener presente los puntos antes mencionados (26).

## 15. REACCIÓN POSTVACUNAL

La reacción vacunal se refiere a la replicación exitosa de una vacuna a virus vivo en el hospedador, con el consiguiente desarrollo de la inmunidad (14).

En términos generales, la mejor protección es dada por vacunas con dosis altas usando un agente invasor (virus o bacterias). Desgraciadamente, estas son las vacunas que también producen las reacciones muy fuertes (40).

Para que produzca una reacción protectora, los agentes vivos tienden a multiplicarse en los tejidos del pollo en cantidades muy grandes para estimular el sistema inmune. Al multiplicarse en los tejidos, estos agentes causan daño, tanto la presencia de agentes como la destrucción de células provoca una respuesta del sistema inmune del pollo (40).

En algunas enfermedades es posible observar estas reacciones. Por ejemplo, la vacuna contra la viruela aviar aplicada en el pliegue del ala permite a los pocos días después de aplicada la vacuna, la observación de una pequeña cicatriz o escara en el sitio de la inyección (14).

Una reacción vacunal respiratoria es la presentación de signos respiratorios suaves en aves vacunadas contra Newcastle y bronquitis infecciosa. Esta reacción se debe presentar pocos días después de la vacunación. Es importante reconocer estas reacciones vacunales, a nivel de campo, ya que es una forma de controlar la replicación exitosa del virus igualmente como en la viruela aviar se puede controlar la escara o cicatrices en el pliegue del ala. Esta puede ser la única forma de evaluar la administración a nivel incubadora de vacunas contra enfermedades respiratorias, puesto que las aves no muestran una respuesta inmune a las vacunas de tipo respiratorio administradas al día de edad que pueda ser detectada por medio de pruebas serológicas como la prueba de ELISA (14).

La ausencia de reacciones puede ser un indicio de mal manejo de la vacuna, mala administración, o una excesiva disminución en la dosis de la vacuna; reacciones muy fuertes pueden conducir a una alta mortalidad y a un mal rendimiento (14).

Las reacciones respiratorias en una parvada pueden ser evaluadas en base al porcentaje de aves con ruidos respiratorios, movimientos bruscos de cabeza y lagrimeo. Este sistema es fácil de usar y ofrece resultados confiables y repetibles cuando es usado por el personal de campo con o sin experiencia. Después de la aplicación de la vacuna contra Newcastle y bronquitis infecciosa por aspersión con gota gruesa al día de edad, la reacción normal alcanza su máximo a los 7 días después de la vacunación, cuando la mayoría de las aves muestran signos clínicos moderados que deben terminar alrededor de los 11 y 12 días (14).

Ciertas vacunas causan reacciones postvacunación severas, si son administradas durante períodos de estrés e inmunosupresión (61).

La efectividad de la vacunación al día de edad y la severidad de las reacciones producidas por vacunas contra enfermedades respiratorias, dependen de varios factores tales como el manejo de la vacuna y el método de aplicación, la cepa vacunal usada, la calidad del medio ambiente donde las aves son colocadas y la severidad de un desafío temprano en el campo con enfermedades que causan inmunosupresión (14).

Durante el período de reacción (postvacunal) las aves deben ser protegidas contra cualquier tipo de agresión o estrés (37).

## **16. MONITOREO SEROLÓGICO**

Los laboratorios veterinarios de diagnóstico de los países en desarrollo se enfrentan a varios tipos de problemas, desde los más simples (como la carencia de fondos para contratar a personal competente, obtener instrumental, suministro y reactivos o capacitación continua) hasta los más complejos (concepción y ejecución de buenos programas de muestreo para la epidemiología o evaluación del rendimiento de una nueva prueba de diagnóstico). Aunque muchos países en desarrollo intenten solucionar esos problemas por su cuenta, y aunque varios organismos nacionales o internacionales les presten apoyo externo bajo diversas formas, la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) debe perseverar en su importante labor, elaborando directrices sobre las pruebas de diagnóstico más adecuadas en el ámbito de comercio internacional y preparando reactivos primarios de referencia para dichas pruebas. Por otra parte, es preciso que la OIE lleve la iniciativa en la elaboración de directrices de gestión de calidad para los laboratorios veterinarios de diagnóstico. A falta de tales directrices y estándares, será difícil que los laboratorios de diagnóstico de los países en desarrollo obtengan la credibilidad necesaria para contribuir al progreso de sus países en los que al comercio internacional de ganado y productos pecuarios se refiere (49).

La efectividad de los programas de vacunación puede medirse o evaluarse mediante seguimientos o encuestas serológicas. Existen diferentes métodos para evaluar la respuesta de anticuerpos en las aves, como resultado de la vacunación (61).

Las técnicas serológicas usadas en el diagnóstico aviar fueron inicialmente desarrolladas para el uso en el diagnóstico humano. Como su nombre lo indica, la serología es una rama de la inmunología aplicada a la detección de anticuerpos en el suero; es decir, en la solución protéica de la sangre de la cual se ha eliminado por coagulación sus componentes celulares. En el suero se encuentran los anticuerpos secretados por las células plasmáticas que radican principalmente en

los tejidos linfoides secundarios: los ganglios, el bazo y los núcleos linfoides diseminados en el tracto digestivo y respiratorio. Es por eso que la concentración de anticuerpos en el suero es un fiel reflejo del nivel de la inmunidad humoral que posee el ave, en otras palabras, entre más alta es la concentración de anticuerpos en el suero, mayor es la capacidad del ave para neutralizar y destruir determinado agente infeccioso (9).

Es importante tener en mente que el monitoreo serológico aplicado a la industria avícola está dirigido a evaluar la protección de toda la parvada y no el diagnóstico individual de pocas aves. En la práctica, se procede a tomar muestras de sangre de aves pertenecientes a una parvada de la misma edad, la cual a sido sometida a determinado programa de vacunación y manejado bajo las mismas medidas de higiene y bioseguridad. De tal manera que los resultados de análisis de pocas aves, usualmente de 18-45, pueden extrapolarse a parvadas de 5,000 a 20,000 aves. En la industria avícola de hoy en día, dicho monitoreo serológico se denomina perfil serológico de la parvada, el cual pone especial atención a la intensidad y uniformidad de respuesta inmune (10).

Las técnicas serológicas más usadas en la industria avícola son las siguientes, en orden de menor a mayor sensibilidad de detección: Inmunoprecipitación en agar (IPA), aglutinación (AG), neutralización viral (VN), inhibición de aglutinación (HI) y enzima inmunoensayo (ELISA). Todas ellas detectan la presencia de anticuerpos en el suero al hacerlos reaccionar con el agente infeccioso (antígeno) que los indujo y para el cual son específicos (10).

### **16.1. La inmunoprecipitación en agar.**

Es una técnica cualitativa de poca sensibilidad que nos da un resultado positivo o negativo, sin cuantificar la concentración de anticuerpos. En dicha técnica, el suero y el antígeno se ponen a reaccionar en un medio gelatinoso de agar y si hay anticuerpos en el suero, se forma una banda de precipitación visible debido a la reacción entre moléculas de antígeno y anticuerpo, siendo su ventaja principal su bajo costo y sus desventajas, su baja sensibilidad y la necesidad de tener que esperar un mínimo de 24 horas para obtener resultados.

### **16.2. Técnica de aglutinación directa o aglutinación en placa.**

Los anticuerpos en el suero reconocen la superficie molecular de las bacterias y se adhieren a ellas, uniéndolas unas con otras, causando el efecto macroscópico de aglutinación. La técnica es barata y se puede utilizar en el campo. El resultado se interpreta como positivo o negativo.

### **16.3. Neutralización viral.**

En la práctica, la mayor desventaja de la técnica de neutralización viral es que requiere de personal especializado y equipo de laboratorio caro y sofisticado. Sin embargo, todavía se considera como la técnica de referencia para Gumboro, Reovirus y Laringotraqueítis infecciosa. La técnica consiste en incubar primero una suspensión del virus con el suero de ave, si dicho suero contiene anticuerpos, éstos se adhieren al virus recubriendo su superficie externa y neutralizando su capacidad de invadir células en cultivo de tejido. Su principal ventaja es que detecta específicamente la concentración de aquellos anticuerpos que evitan que el virus penetre a las células, por lo tanto mide la concentración de anticuerpos "neutralizantes", lo cual determina el serotipo del virus infectante.

### **16.4. Inhibición de aglutinación.**

Es una técnica barata, por medio de la cual se puede determinar el serotipo o cepa del virus infectante, ya que las estructuras moleculares de la hemaglutinina y neuraminidasa son características de la cepa del virus. Sus desventajas son principalmente los frecuentes problemas de reproducibilidad y estandarización que se encuentran al tratar de comparar resultados obtenidos por diferentes laboratorios y tal vez más importante, no es una técnica con la que fácilmente se puede procesar con eficacia y rapidez, el alto número de sueros que se requiere analizar en el monitoreo serológico de la industria avícola. El resultado es un título de inhibición de aglutinación que refleja directamente el nivel de anticuerpos específicos para dichas moléculas.

### **16.5. Prueba de ELISA.**

El antígeno (usualmente una fracción molecular purificada del microorganismo infeccioso) está físicamente ligado a los 96 pocillos de una microplaca plástica, en los cuales se colocan diluciones apropiada de los sueros que se quieren analizar. Si los sueros contienen anticuerpos contra el microorganismo, estos se adhieren al antígeno de los pocillos y son detectados al añadir un segundo anticuerpo específico para los anticuerpos del ave. Este segundo anticuerpo está marcado con una enzima, de tal manera que en aquellos pocillos en el que se adhirieron anticuerpos al antígeno, también se adhire el segundo anticuerpo marcado con la enzima, y al añadir el sustrato a la microplaca, la enzima lo digiere y se revela un color visible. Entre más intenso el color, mayor es la concentración de anticuerpos en el suero. Usando la técnica de ELISA, el título de un suero se determina objetiva y cuantitativamente al medir la intensidad del color en un espectrofotómetro, la cual se expresa en unidades de densidad óptica.

Hoy en día la técnica de ELISA es ampliamente usada en el monitoreo serológico de los programas de vacunación y de salud avícola. ELISA es una técnica muy sensible, con capacidad de detectar concentraciones muy bajas de anticuerpos y, aunque no es capaz de determinar el serotipo del virus infectante, identifica con alta especificidad a cada uno de los agentes infecciosos que afectan a la industria avícola. Sin embargo, su mayor ventaja radica en su reproducibilidad y capacidad de analizar muchos sueros en un corto tiempo (9).

La intensidad de la respuesta se refleja en los títulos individuales y en el promedio aritmético de los títulos de la parvada. Por ejemplo, al analizar la respuesta contra Gumboro de una parvada usando la técnica de ELISA y un programa de computación para evaluar los resultados, se ha establecido que el título de protección mínimo deseado es de 3,000. Esto significa que experimentos realizados bajo situaciones controladas han determinado que una parvada con títulos inferior a 3,000, un desafío experimental con una dosis de determinada cepa del virus de Gumboro causa patología en un alto porcentaje de las aves. Por lo tanto, analizando el título promedio de la parvada se puede inferir si la protección inducida por la vacunación ha sido la suficiente para protegerla de una infección de campo. Es decir, una parvada con un título promedio de 1,500 es más susceptible a una infección de campo que otra parvada con un título promedio de 4,500 (10).

Otro aspecto importante de analizar es la uniformidad de la respuesta inducida, es decir, la magnitud de la variación de los títulos de las aves analizadas, alrededor del título promedio de la parvada. Un coeficiente de variación menor del 30% se considera excelente e indica que todas las aves de la parvada han correspondido uniformemente a la vacunación, mientras que un coeficiente de variación mayor del 90% refleja que hay aves en la parvada que han respondido muy bien, pero también que hay aves que han montado una respuesta muy pobre a la vacunación. Lo deseado es encontrar aves con alto título de protección que poseen un coeficiente de variación bajo, lo cual significa un nivel de protección adecuado y una respuesta uniforme (10).

El perfil serológico de la parvada se vuelve mucho más significativo cuando la misma se analiza a través del tiempo mientras es sometida a su correspondiente programa de vacunación. El análisis por computación determina cuáles son los niveles normales de la respuesta y se elabora una base de datos que sirve de patrón para comparar la respuesta de subsecuentes parvadas, identificando a las que no han correspondido adecuadamente a la vacunación, permitiendo tomar a tiempo las medidas correctivas que pudiesen reducir al máximo las pérdidas económicas causadas por infecciones de campo (10).

En lo que se refiere al tiempo de monitoreo, se debe esperar tres semanas para sangrar la parvada después de aplicar una vacuna, con el propósito de permitir que la concentración de anticuerpos llegue al máximo en el suero (10).

Los métodos para monitoreos de la efectividad de las nuevas vacunas virales recientemente desarrolladas requieren ser probadas en el animal vivo (in vivo). Sin embargo, durante las primeras etapas de desarrollo, los métodos en laboratorios menos caros y rápidos son requeridos (in vitro) (16).

En un intento a suplir esta necesidad, Henry Hunt y su grupo en el laboratorio de oncología y enfermedades aviares (ADOL) han desarrollado en un sistema in vitro por medio de ingeniería celular que expresa tanto al hospedador como proteínas virales necesarias para detectar inmunidad mediada por células. Esta tecnología quiere ser finalmente usada para el desarrollo de medios para el monitoreo de la inmunidad mediada por células para varios virus tales como el virus de la enfermedad de Marek (16).

#### IV. CONCLUSIONES

Actualmente existe mucha investigación en el área de las vacunas, por lo que se ha revolucionado nuevas formas de producción de las mismas, aplicación efectividad y posibles desventajas. De todo esto podemos concluir lo siguiente:

- Las nuevas vacunas (ingeniería genética, vacunas recombinantes DNA, péptidos sintéticos, vacunas de subunidades) presentan nuevas alternativas, pero así como tienen ventajas, tienen sus desventajas comparados con las convencionales o tradicionales y el costo y la poca disponibilidad de información en la mayoría de los casos han impedido su producción a nivel comercial. Sin embargo, son nuevas alternativas que no se descarta que en el futuro a corto plazo se expanda su uso a nivel internacional en la industria avícola.

- En cuanto al nuevo método de administración de vacunas que es el sistema "in ovo", representa muchas ventajas en cuanto a manejo y vacunación del huevo (embrión), pero cabe aclarar que actualmente este método de vacunación sólo se está usando para vacunar contra la enfermedad de Marek y todavía se está experimentando nuevas vacunas para ser aplicadas por este sistema, por lo que no se ha generalizado su uso.

- En México la industria avícola no está usando actualmente estos recientes avances, tal vez porque los métodos convencionales siguen dando buenos resultados, y porque el uso de las vacunas se ha reforzado bastante con buenos programas de bioseguridad, sin embargo, en nuestro país existe suficiente información y experimentación por lo que no descartamos la adopción de estas nuevas técnicas en cuanto a vacunas en el futuro, ya que como buen productor avícola a nivel mundial, México debe estar revolucionando constantemente para seguir progresando.

- Se debe tener muy en cuenta que las vacunas no trabajan por sí solas. Si no son administradas adecuadamente (tiempo propicio, método de administración, salud de las aves en el momento de administrar la vacuna) no van a funcionar, aún y cuando las vacunas sean de mejor calidad.

- Antes de implementar un calendario de vacunación se debe de tener en mente lo siguiente: región o zona donde se localiza la granja, enfermedades presentes en el país o región, un historial de la granja y granjas aledañas en cuanto a enfermedades; de lo contrario dicho programa fracasará.

- Existen diferentes criterios a cerca de la aplicación de vacunas simultáneas (varias vacunas, vacuna con antibiótico, dosis múltiples), sin embargo, la mejor opción es realizar las propias pruebas en la granja en aves aisladas experimentales, ya que cada parvada, incluso cada individuo reacciona diferente inmunológicamente.

- En lo que se refiere al monitoreo serológico, se debe de implementar de forma obligatoria en toda granja, ya que es una forma de evaluar si el programa de vacunación es el adecuado.

- Por último, Se debe seguir siempre al pié de la letra las instrucciones del uso de las vacunas que indique la casa comercial o el Médico Veterinario Zootecnista encargado de la granja, de lo contrario en vez de un beneficio con la vacunación, se va a provocar posibles problemas, las cuales posteriormente se reflejará en la economía de la granja.

## V. LITERATURA CITADA

1. Abbas A. K., Jordan P., Lichtman A. H. Inmunología celular y molecular. Segunda edición. Edit. Interamericana. Méx. D.F. Pp 229-233.
2. Bains B. S. 1994. Immunity –Disease Interaction. World Poultry-Misset. Vol. 10. # 6. E.U.A. Pp 49.
3. Bellanti J. A. 1994. Inmunología. Tercera edición. Edit. Interamericana. Méx. D.F. PP 563-570.
4. Biberstein E. L., Chung Zee Y. 1994. Tratado de microbiología veterinaria. Edit. Acribia SA de CV. Zaragoza, Esp. Pp. 55-57,481-487.
5. Bona C. A., Casares S., Brumeanu T. D. 1998. Towards Development of T- cell Vaccine. Immunology Today. Vol. 19 #3 March. E.U.A. Pp. 126- 132.
6. Broiler industry. 1998. Single In Ovo Effective Against thre Poultry Disease. Broiler Industry Vol. 61. #9. September. E.U.A. Pp 14.
7. Calnek B. W. 1995. Enfermedades de las aves. Novena edición en inglés. Edit. El manual moderno. Méx. D. F.-Santa Fé de Bogotá. Pp.23-24.
8. Contreras M., Fernández R. J. 1999. Entidades inmunosupresoras y su correlación con otras condiciones patológicas. Industria avícola. Marzo. E.U.A. Pp. 29-34.
9. Cosenza H. 1997. Monitoreo serológico: una herramienta para optimizar la productividad de la industria avícola. Tecnología avipecuaria. Año 9. #108. Méx. D.F. Pp. 15-19.
10. Cosenza H. 1997. Monitoreo serológico: una herramienta para optimizar la productividad de la industria avícola. Segunda parte. Tecnología avipecuaria. Año 10. #109. Méx. D.F. Pp. 11-12
11. De Jawetz, Melnick, Adelberg. 1996. Microbiología médica. 15 a edición. Edit. El manual moderno. Méx. D. F.-santa Fé de Bogotá. Pp 120-123.
12. De Kick M. A. 1995. Broiler Production is about Preventing Disease. Misset World poultry. Vol. 11. # 10. E.U.A. Pp. 36-37.
13. Departamento técnico de fort dooge animal healt 1999. La respuesta inmunologica a la vacunación. Los avicultores y su entorno Méx. D.F. Año 1. # 6. Pp 32-33.

14. Dufour L. 1992. Influencia de las reproductoras sobre las reacciones vacunales de la progenie. Avicultura profesional. Vol. 10. Vol. 1 Holanda. Pp. 44-46.
15. Dwight Schwartz L., 1992. Manual de sanidad avícola. Edit. UTEHA Méx. D.F. Pp24-26.
16. Eleazer T. H. 1996. Improved Monitoring Methods for Vaccines. Poultry digest. Vol. 55 #1. January. E.U.A. Pp 6
17. Eleazer T.H. 1996. Microencapsulation May Stabilize Vaccines. Poultry digest. Vol. 55. #9. September. E.U.A. Pp 10
18. Eleazer T.H. 1999. Recombinant MD Vaccines Showing Promise. Poultry digest. Vol. 58. #1. February/March. E.U.A. Pp 5
19. Eleazer. T. H. 1998. In Ovo Newcastle and Influenza Vaccines Effective. Poultry digest. Vol. 57. #4. August-September. E.U.A. Pp 11.
20. Eleazar T. H. 1998. In Ovo MD Vaccination Interfere With IB Inmunity. Poultry digest. Vol. 57. #5. October/November. EUA. Pp. 11.
21. Ellen Yazon M. 1998. Updates on Methods and Equipament for Waters and Spray Vacunation. Poultry digest. Vol. 57. #5. October-November. E.U.A. Pp 34.
22. <http://dge1.insp.mx/salvia/9267/salvia1.html>
23. Escorcía Martínez M., Téllez Isaias. 1999. Manejo y criterios para la aplicación de vacunas. Tecnología avipecuaria. Año 11. # 132. Méx. D.F. Pp 48-50.
24. Escorcía Martínez M., Téllez Isaias 1999. Manejo y criterios para la aplicación de vacunas. Tecnología avipecuaria Año 12 # 132. Méx. D.F. Pp 12-14.
25. Fenstermacher H, O'Dowd J. P., 1999. Tecnología de vacunación in ovo. Avicultura profesional. Vol. 12. # 1. Holanda. Pp. 32-33.
26. García A. 1998. La vacunación y sus consecuencias. Avicultores y su entorno. Año 1. #2. Méx. D. F. Pp. 8-11.
27. Giambrone J. 1996. Inmunosupresión en las aves: causas y prevención. Avicultura Profesional. Vol. 4 #5 Holanda. Pp 42-45.

28. Gingerich E. 1996. Common Poultry Vaccination Errors. Poultry digest. Vol. 55. #1. November. E. U.A. Pp. 23-33.
29. Goren E. 1992. Don't mix Marek Vaccine with Baytril in uno Solution. Misset-World poultry. Vol. 8. # 1. E.U.A. Pp 45
30. Grieve D. 1999. Programa de reproducción para reproductoras y ponedoras. Avicultura y su entorno. Año 2. #7. Febrero-Marzo. Méx. D.F. Pp15-18.
31. Gurria Treviño F. 1999. Semblanza del sector avícola mexicano. Avicultura y su entorno. Año 2. #9. Junio-julio. Pp 20-27.
32. Hellmut Woernle. 1996. Alojamiento de las aves. Edit. Acribia. Zaragoza, Esp. Pp. 53-55.
33. Embrex internationa. [http.zootecnia. it/industry/embrea/](http://zootecnia.it/industry/embrea/). 1997
34. <http://WWW.aaf.com/html/bromanm4.htm>
35. <http://WWW2.el-mundo.es/salud/306/N0002.html>.
36. [http://www.sendanet.es/exopol/circulares/32 circ. Html](http://www.sendanet.es/exopol/circulares/32_circ.html).
37. ISA Broiler. 1996. Guide Management. Francia. Pp 22-23.
38. James Lovell E. 1996. Métodos de inyección: vacunas oleosas. Industria avícola. Diciembre. E.U.A. Pp. 14-16.
39. Lecler C. , Ronco J. 1998. New Approaches in Vaccine Development. Immunology Today.. Vol. 19 #7. July. E.U.A
40. Lucio B. 1994. Protection Versus Vaccine Reactions. Poultry digest. Vol. 53. #8. E.U.A. August. Pp. 32.
41. Márquez M. A. 1999. Aportaciones de la industria farmacéutica veterinaria al bienestar Humano. Tecnología avipecuaria. Año 12 #138. Méx. D.F. Pp 28-32.
42. Miles A. M, Williams C. J., Womack C. K., Murray D. L., Gildersleeve R. P. 1993. Comercial Broilers Studies of Marek's Disease Vacunation In-Ovo. Abstracts Poultry Sci. Vol. 72. Supplement 1. Pp. 182.

43. Morilla González A. 1989. Inmunología veterinaria. Edit. Diana SA de CV. Méx. D. F. Pp. 361-363.
44. Nilipour A. H. 1995. Disfunción del sistema inmune. Industria avícola. Noviembre. E.U.A. Pp 34-35.
45. North M. O., Bell D. D. 1993. Manual de producción avícola. Tercera edición. Edit. El manual moderno. Méx. D. F. Pp. 681-703.
46. Oficina Internacional de Epizootias. 1998. Laboratorios veterinarios para las enfermedades infecciosas. Revista científica y técnica. Vol.17 (2). Agosto.
47. Raldall D. C. 1998. Laboratorios que frabrican vacunas veterinarias. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. Vol. 17 #2. Pp. 568-577.
48. Roca Froricesc LI. 1991. Higiene y patología aviares. Edit. Acribia. Barcelona, Esp. Pp. 370-382.
49. Robinson M. M., Jeggo M. H. 1998. Laboratorios veterinarios de diagnóstico de países en desarrollo: el reto de la creditibilidad. Rev. Sci. Off. Int. Epiz. Vol. 17. #2. Pp. 454-458.
50. Roth H. J. 1996. Regulatory Issues for Liceansing New Veterinary Vaccines in the US. Poultry digest. Vol. 55. #3. March. E.U.A. Pp 22-23.
51. Sharma J. M. 1996. Vaccines for the year 2000. Poultry digest. Vol. 55 #3. March. E.U.A. Pp 24.
52. Stites D. P., Teer A. I., Parslow T. G. 1996. Inmunología básica y clínica. Sexta edición. Edit. El manual moderno. Méx. D. F. Pp. 919-947.
53. Stone H. D. 1995. Mejoras en vacunas. Industria avícola. Septiembre Pp. 64.
54. Thaxton J. P. And Thompson J. R., 1993. Development of a day-old Vaccinations. Abstracts Poultry Science. Vol. 72. Supplement. 1. Pp. 181.
55. Thaxton J. P. And Thompson J. R. 1993. Development of a day-old Coccidiasis Vaccination Procedure. Abstracts Poultry Science. Vol. 72 Supplement 1. Pp. 181.

56. Thaxton J. P. 1995. El desarrollo de la inmunidad en las aves. Tecnología avipecuaria. Año 5. #49. Méx. D. F. Pp. 11-13.
57. Thonton G. 1995. La experiencia in ovo Industria avícola. Pp. 20-22. Febrero.
58. Tizard Ian. 1995. Inmunología veterinaria. Cuarta edición. Edit. Interamericana. Méx. D. F. Pp. 295-303.
59. University of Minnessota Avian Research Center. 1995. Water Vaccination Must be done Rigth. Poultry digest. Vol. 54 #11. November. E.U.A. Pp. 26.
60. USDA 1995. Vacunas in ovo. Industria avícola. Septiembre Pp. 64.
61. Villegas P., Rosales G., 1996. Calidad total en los programas de vacunación. Avicultura profesional. Vol. 14. #2. Holanda. Pp. 50-55.
62. Villegas P. 1991. Vacunación in ovo Perspectivas. Avicultura profesional. Vol. 5 # 4. Holanda. Pp. 153.
63. Villegas P. 1999. Para obtener el mayor provecho de las vacunas. Avicultura Profesional. Vol. 17. #4. Holanda. Pp 26-28.
64. Volk W. A., benjamin D. C. 1988. Microbiología médica. Tercera edición. Méx. D. F. Pp. 38-42.
65. Weir D. M., Stewart J. 1995. Inmunología. Segunda edición. Edit. El manual moderno. Méx. D. F.-Santa Fé de Bogotá. Pp 6-7,202-207.
66. Yamanouchi K., Barrett T., Kai C. 1998. Nuevas soluciones para el desarrollo de vacunas víricas de uso veterinario. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. Vol. 17. #3. Pp. 641-653.