

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Producción Agrícola y Animal
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Informe final de Servicio Social Legal:

“Control de calidad y constatación de inmunógenos veterinarios”
(Vacuna contra la Enfermedad de Newcastle).

Prestador del Servicio Social:
Hernández Medina Víctor Manuel
Matrícula: 204231516

Asesor interno
Dr. José Antonio Herrera Barragán
No. Económico: 25416

Asesor externo:
MVZ. Edgar Lujano Chávez.
Cédula Profesional: 6558116

Lugar de realización:
Laboratorio del Departamento de Vacunas y Reactivos e Instalaciones del Centro Nacional de Servicios de Diagnostico en Salud Animal (CENASA).

Fechas de inicio y terminación: Del 3 de Diciembre de 2010 al 3 de Junio de 2011.

INDICE.

1.- RESUMEN	3
2.- INTRODUCCIÓN	3
3.- JUSTIFICACIÓN	5
4.- MARCO TEÓRICO	5
5.- OBJETIVOS	16
5.1.- OBJETIVO GENERAL	16
5.2.- OBJETIVO PARTICULAR	17
6.- METAS	17
7.- MÉTODOS	17
8.- ACTIVIDADES REALIZADAS	21
9.- OBJETIVOS ALCANZADOS	22
10.- METAS ALCANZADAS	22
11.- RESULTADOS	23
12.- CONCLUSIONES	26
13.- RECOMENDACIONES	27
14.- BIBLIOGRAFIA	28

1.- RESUMEN

La finalidad de este estudio fue evaluar las características físico-químicas y biológicas de una vacuna experimental contra la Enfermedad de Newcastle durante su constatación. Se examinaron 10 viales del producto enviado por el fabricante durante todo el proceso. Algunas pruebas físico-químicas se llevaron a cabo al total de viales y el resto a solo algunos ejemplares. Simultáneamente fueron empleados diversos medios de cultivo para evaluar una posible contaminación biológica de la vacuna. Se emplearon 10 aves de 10 días de edad para las pruebas de seguridad vigilándolas durante 21 días post-vacunación. Para evaluar la potencia se utilizaron 20 aves de 2 a 6 semanas, formándose 2 grupos de 10 aves c/u, al primer grupo se le desafío con una cepa velogénica viscerotrópica del virus de la enfermedad de Newcastle y al otro grupo control se le inocularon solo solución salina IM. Las pruebas físico-químicas fueron exitosas en un 90% solo el pH estuvo ligeramente básico sin embargo no causó un daño aparente a las aves. Para los test de contaminación biológica la vacuna cumplió con los requisitos mínimos establecidos. Los parámetros señalados para la prueba de seguridad fueron satisfactorios y en cuanto a potencia el fármaco demostró ser protector en un 90% lo cual lo hace confiable. Por tanto se concluye que la vacuna experimental VENC-EXP cumple de manera satisfactoria con el total de requisitos señalados por la NOM-063-ZOO-1999 y es apta para su fabricación y proceso comercial.

2- INTRODUCCIÓN.

La enfermedad de Newcastle se reconoció por primera vez como entidad nosológica de las gallinas, después de las epidemias que se presentaron en Java (1926), Inglaterra (1927) y en Corea (1929). La epizootia descrita por Doyle en 1926, se propagó a lo largo de la costa Norte de Inglaterra alrededor de

Newcastle, de donde deriva su nombre común. De los años 1926 a 1940, casi todos los casos graves de esta enfermedad fueron detectados en o cerca de los puertos marítimos en el océano Índico (Moreno, 1994).

Cobró importancia en la industria avícola mexicana, desde el principio de la década de los 50's. Aunque probablemente el agente causante de la enfermedad fue introducido al país con mucha anterioridad a 1950 (Moreno, 1994).

La enfermedad de Newcastle (ENC), es una enfermedad viral, contagiosa y letal que afecta a las aves domésticas y silvestres, causando alta morbilidad y mortalidad en las mismas. Representando un serio problema sanitario, económico y de comercialización para la avicultura nacional (NOM-052-ZOO-1995).

El virus de la ENC se divide por su grado de patogenicidad y virulencia en cepas lentogénicas (baja patogenicidad), mesogénicas (moderada patogenicidad) y velogénicas (alta patogenicidad) y a las cuales México está expuesto, ya que existen cepas velogénicas mexicanas que favorecen su diseminación (Malo, 2011).

Un estricto manejo sanitario y el uso de vacunas son parte fundamental del éxito para evitar, controlar y mantener libre de enfermedades a la parvada o granja (Rivera, 2009)

3.- JUSTIFICACIÓN

La vacunación es una pieza clave en el control de esta enfermedad, para proteger a la avicultura nacional contra la (ENC), ya que es necesario verificar los requisitos mínimos para la producción de vacunas empleadas en la prevención y control de la enfermedad de Newcastle, a fin de garantizar que su producción sea de la más alta calidad. (NOM-052-ZOO-1995).

4.- MARCO TEÓRICO

La enfermedad de Newcastle (ENC), es una enfermedad viral, contagiosa y letal que afecta a las aves domésticas y silvestres, causando una infección que puede presentarse de forma subclínica hasta una de alta morbilidad y mortalidad con diversos grados de trastornos sistémicos, gastrointestinales, respiratorios y/o nerviosos (Cottral, 1996).

Antecedentes

El Newcastle es una de las enfermedades más importantes de las aves domésticas, aunque también se presenta en aves silvestres. Se identificó por primera vez en 1926 en Indonesia y en 1927 en una población de Inglaterra llamada Newcastle-On Tine, de donde deriva su nombre (Gordon, 1990).

Es posible que el reservorio original haya sido alguna especie de ave silvestre del sudeste asiático, como lo sugiere el carácter explosivo y altamente mortal de los brotes en aves domésticas que hubo en Indonesia en 1926. Se le conoce también como. pneumoencefalitis, pseudopeste aviar, paramixovirus 1, peste de diarrea verde. (Rivera,2009)

A mediados del año 1950 se presentó una epizootia de la ENC en gran parte del territorio nacional, en donde prácticamente arrasó con las aves de corral en gallineros rurales, domésticos e industriales (Aragón, 1960).

La ENC es una zoonosis menor, tanto por el reducido número de casos como por la benignidad de la enfermedad en el hombre. Sin embargo, la enfermedad de Newcastle en las aves es muy importante por las grandes pérdidas que causa en la industria aviar y por los requerimientos de vacunaciones repetidas y vigilancia epidemiológica de las aves, que tienen, ambas, de considerable impacto económico (Aragón, 1960).

Agente etiológico y clasificación

El virus que causa la ENC o pneumoencefalitis aviar, es un miembro de la familia *Paramixoviridae* del genero *Paramixovirus*, el cual está integrado por 9 grupos de virus que son serológicamente distintos y que además tienen diferentes hospederos primarios. Los 9 grupos se designan como Paramixovirus 1 (PMV-1) que es el virus de la ENC considerado como el prototipo del género, los Paramixovirus 2 (PMV-2) hasta el Paramixovirus 9 (PMV-9) son representantes de los grupos de virus que causan influenza, en distintas especies aviares (Alexander, 1991).

Además la clasificación y la nomenclatura de Mathews en 1979 considera, en este género, a los virus de la parainfluenza 1-5 de mamíferos y al de la parotiditis humana (Mathews, 1979; Mohanty y Dutta, 1998).

Es un virus RNA con cadena sencilla en sentido negativo y lineal en su genoma de ácido ribonucleico, tiene simetría helicoidal y esta encapsulado, su tamaño varía de 125 a 250 nm. de diámetro, el virus completo de la ENC tiene un peso molecular promedio de 500×10^6 Daltones con una densidad en sucrosa de 1.18-1.20g/ml (Al-Garib *et al*, 2003).

Propiedades biológicas

El VENC posee dos antígenos de superficie, uno es capaz de aglutinar glóbulos rojos. La hemaglutinina está estructuralmente identificada con las proyecciones de la envoltura del virus, y químicamente se ha demostrado que está asociada con la neuroaminidasa (Gordon, 1990).

Esta última está relacionada con la elusión del virus de la superficie de los eritrocitos. Al igual que otros virus como el de la Influenza el VENC posee una hemolisina, que variara en su capacidad hemolítica dependiendo del tipo de cepa. (Cottral, 1996).

Propiedades Físico-químicas

Algunos agentes físicos y químicos como el calor, luz ultravioleta, rayos X y los procesos de oxidación y cambios de pH, por sustancias acidas o básicas, pueden afectar al VENC dependiendo de su proporción, las propiedades virales, además de la cantidad de virus expuesto, la naturaleza química del medio de suspensión y también de la interacción resultante entre las variables del tratamiento (Moreno, 1994).

Los virus de la familia *Paramyxoviridae* resisten a:

Temperatura: Inactivado a 56°C/3 horas, 60°C/30 min., 100°C/1 min.

pH: Inactivado a pH ácido

Productos químicos: Sensible al éter

Desinfectantes: Inactivado por formalina y fenol

Supervivencia: Sobrevive durante largos periodos a temperatura ambiente, especialmente en las heces (Mohanty, 1998).

Epizootiología, distribución geográfica y hospederos susceptibles

Todas las aves domésticas y silvestres son susceptibles al virus del Newcastle. Las tasas de morbilidad y mortalidad varían drásticamente entre especies y según la cepa viral, en ocasiones puede alcanzar mortalidades en más del 90% y morbilidades hasta del 10%. Las gallinas son las aves de corral más susceptibles; al contrario los patos y los gansos son los menos susceptibles y puede existir un estado portador en las psitácidas y en algunas otras aves salvajes (ICA, 2009).

Su distribución es mundial. Si bien es cierto que muchos países se consideran libres del Newcastle se han llegado a tener brotes esporádicos originados especialmente por el contrabando de aves exóticas, la importación de productos avícolas, gallos de pelea y aves migratorias (Rivera, 2009).

Transmisión

El VENC puede ser diseminado de una ave infectada a otras aves dentro de la parvada a través de todas sus secreciones (respiratorias principalmente) y de sus excreciones (heces sobre todo), el agua de bebederos comunales es un medio muy eficaz de transmisión del virus dentro de la parvada (Ritchie y Carter, 1998).

La ingestión de materiales contaminados o la inhalación de aerosoles son la más común causa de contagio. El VENC es estable fuera del hospedador por eso insectos, roedores y humanos deben ser considerados potenciales vectores, aves migratorias infectadas con la ENC particularmente aves acuáticas y passeriformes han sido sugeridas también como fuentes de transmisión (Ritchie y Carter, 1998).

Por otra parte, existen varias formas de importación y diseminación del virus a otras granjas, como lo son las vacunas contaminadas con cepas virulentas de campo, aves importadas portadoras y eliminadoras asintomáticas del virus, alimentos contaminados con órganos o tejidos de pollos infectados, como las vísceras crudas y equipo avícola como las criadoras y la introducción del virus a

una granja mediante el tránsito de vehículos no controlados sanitariamente (Moreno, 1994)

La ENC adquiere características de epizootia en zonas de elevada población avícola debido a la presencia de aves de diferentes edades, alta densidad de población cercanía entre granjas, falta de control sanitario, tránsito del personal vehículos y equipo; cuando hay un elevado número de aves infectadas, aumentan las posibilidades de la transmisión aérea. Su transmisión es más efectiva durante la época de estío (Ritchie y Carter, 1998)

Tipos de cepas

Una de las principales características de las diferentes cepas de los virus que producen la enfermedad de Newcastle es la gran variabilidad para causar daños en las células. En este sentido, las cepas se han clasificado en cinco grupos de acuerdo a la patogenicidad en base a los signos clínicos observados en las aves infectadas:

- Velogénica viscerotrópica. Caracterizada por su alta patogenicidad. Se observan lesiones hemorrágicas intestinales
- Velogénica neurotrópica. Esta forma se presenta con una alta mortalidad que usualmente es antecedida por signos respiratorios y neurológicos
- Mesogénica. Es una forma que se presenta con signos respiratorios y ocasionalmente se observan signos neurológicos pero con baja mortalidad.
- Lentogénica o respiratoria. Es una forma que se presenta con leves signos respiratorios o subclínica.

- Entérica asintomática. Es una forma que usualmente consiste en una infección entérica subclínica.

Los grupos de patogenicidad se encuentran raramente definidos en campo e incluso en infecciones de aves libres de patógenos no se diferencian fácilmente. Es frecuente observar la sobreposición de los signos clínicos característicos de cada grupo. Adicionalmente, un aumento de los signos clínicos se presenta cuando cepas menos fuertes se encuentran simultáneamente con otro tipo de organismos infecciosos o cuando se presentan condiciones ambientales adversas. Por lo anterior, los signos clínicos por si mismos no son confirmatorios del diagnóstico de la enfermedad; pero la evaluación del cuadro clínico, las lesiones y alteraciones de los parámetros productivos permiten declarar una granja como sospechosa para la enfermedad de Newcastle. Por otra parte, dependiendo de la secuencia genética de los virus, y de la posición de aminoácidos en la posición 117, los virus se clasifican en baja y alta virulencia. Los virus de alta virulencia tienen el aminoácido fenilalanina en la posición 117, mientras que los de baja virulencia tienen el aminoácido leucina en esta posición (ICA, 2009).

Signos clínicos

Las características clínicas de la ENC estarán determinadas por la interacción entre la susceptibilidad del hospedero y la patogenicidad de la cepa del virus infectante.

Los signos clínicos que podemos observar en casos de ENC son: dificultad respiratoria, boqueo, descarga mucosa nasal, diarrea verde esmeralda, disminución drástica de la postura, decaimiento, edema facial de la cabeza y barbillas, trastornos nerviosos con torticolis, opistótonos, incoordinación de movimientos, parálisis de piernas o alas y muerte (Moreno 1994).

Puede observarse también cianosis de la cresta, algunos de los huevos producidos tienen cascara delgada, rugosa o carecen de él, la producción de huevo puede suspenderse por completo. La severidad de los signos está relacionada con el tipo de cepa actuante, dosis, estado inmune del ave, ruta de exposición, presencia de otros agentes infecciosos y condiciones ambientales (OIE,2005).

En los casos agudos se presenta mortalidad sin otras manifestaciones clínicas. Cuando la enfermedad es causada por cepas altamente patógenas, se observa disnea, tristeza, debilidad, postración y muerte, la cual puede alcanzar 100%. Las aves que no mueren en la fase aguda, pueden presentar diarrea verdosa, tortícolis, temblores musculares, parálisis de alas y patas (Moreno,1994).

En la forma nerviosa, hay trastornos respiratorios severos, seguidos por signos nerviosos, caída de la producción de huevos, generalmente ausencia de cuadros gastrointestinales; la morbilidad puede alcanzar 100%, con una mortalidad en aves jóvenes de hasta 90% y en adultos 50%. En brotes de campo causados por cepas menos patógenas, se pueden producir cuadros respiratorios, caída de la producción de huevos, que puede durar varias semanas, mortalidad generalmente baja, excepto en aves susceptibles muy jóvenes (Moreno, 1994).

Lesiones macroscópicas

Cuando el sistema respiratorio está afectado se observan lesiones hemorrágicas y congestión de la tráquea con exudado mucoso, aerosaculitis. En aves de postura se observan óvulos flácidos y degenerados, hemorragia y palidez de otros órganos reproductores y retención de huevos en la cavidad abdominal. La presencia de lesiones hemorrágicas en el tracto gastrointestinal, es un criterio que se ha empleado para diferenciar las cepas velogénicas-viscerotropicas de las neurotrópicas, y estas lesiones son frecuentes en proventrículo, ciegos, cloaca, tonsilas cecales, y tracto intestinal (Gordon, 1990).

Las cepas lentogénicas y mesogénicas solo producen traqueítis catarral. Con la cepa velogénica y mesogénica se observan lesiones de tipo septicémico hemorragias en la grasa coronaria y abdominal, así como en proventrículo, folículos ováricos flácidos, congestionados y hemorrágicos, los que con frecuencia se rompen dejando escapar el fluido vitelino hacia la cavidad abdominal, dando lugar a peritonitis. (OIE;2005). Las cepas velogénicas viscerotrópicas producen aves susceptibles, además de las lesiones mencionadas, edema facial, opacidad de la córnea, úlceras de tipo botonoso a lo largo del intestino delgado, en las tonsilas cecales y en el recto así como necrosis de la bolsa de Fabricio (OIE,2005)

Lesiones microscópicas

No existen lesiones características de la enfermedad. La presencia y severidad de las mismas, están relacionadas con diferentes factores (Gordon, 1990).

Las lesiones microscópicas son variables y abundantes, pero tiene importancia para el diagnóstico solo cuando va acompañado de datos anamnésicos, signos y lesiones de ENC, ya sea que no son patognomónicas. Es frecuente observar traqueítis proliferativa no purulenta, neumonía intersticial no supurativa, gliosis, vasculitis e infiltración linfocitaria perivascular (Gordon, 1990).

Las lesiones que se pueden encontrar son: Edema del tejido intersticial o peritraqueal del cuello, especialmente cerca de la entrada torácica ó congestión y algunas veces hemorragias en la mucosa traqueal y/o petequias y pequeñas equimosis en la mucosa del proventrículo, concentradas alrededor de los orificios de las glándulas mucosas y/o edema, hemorragias, necrosis o ulceraciones del tejido linfoide en la mucosa de la pared intestinal, también edema, hemorragias o degeneración de los ovarios (OIE, 2005).

Diagnóstico

El Diagnóstico de la ENC se lleva a cabo de diferentes formas y estas son:

Diagnóstico clínico de campo.- Se debe tener cuidado en el enfoque para el diagnóstico de la enfermedad de Newcastle, ya que la variación en el estado inmune de la parvada y el amplio espectro de virulencia de la población mundial de virus puede combinarse para obviar una imagen muy variable. Algunos signos que nos ayudan a diagnosticar la enfermedad de Newcastle son: síntomas respiratorios y/o nerviosos, interrupción parcial o completa de la producción de huevos, huevos deformados, de cascara rugosa y fina y que contienen albumina acuosa, diarrea verde esmeralda acuosa y tejidos hinchados en torno a los ojos y el cuello (Moreno, 1994).

Diagnóstico de laboratorio.- La enfermedad de Newcastle (ENC) puede diagnosticarse en el laboratorio, aislando el virus en un sistema biológico como el embrión de pollo o en monoestrato de células, identificándolo luego con un método serológico apropiado, como la inhibición de la hemoaglutinación (HI) a la virus-neutralización (VN). Para el diagnóstico de la ENC también se ha utilizado la prueba de inmunofluorescencia. Esta no nos permite determinar la cepa involucrada, las aves que han sido vacunadas con el virus dentro de 10 días anteriores a la prueba pueden producir resultados positivos falsos (OIE,2005).

Se puede sospechar de un brote de ENC cuando las aves muestran títulos elevados de anticuerpos, los que se miden por la prueba HI; o por la VN. Estas pruebas son especialmente útiles cuando se realizan con suero colectado al inicio del brote y con el suero obtenido 2 o 4 semanas después. Se sospechara de ENC cuando el título de la muestra sea más elevado que en la primera (OIE,2005). También se puede realizar el diagnostico serológico, identificando al anticuerpo y valorando comparativamente los títulos de anticuerpos de la fase inicial y/o aguda de la enfermedad, con los títulos de anticuerpos de la fase convaleciente, para que podamos inferir si existió o no la infección activa del virus.

Otras pruebas de laboratorio que pueden utilizarse para el diagnóstico de la enfermedad son: Seroneutralización de placas, inmunodifusión, fijación del complemento e inmunofluorescencia, que pueden satisfacer necesidades muy específicas (Calnek *et al*, 1997).

Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial se debe hacer para evitar confundir la enfermedad con otras infecciones virales que también afectan el sistema respiratorio como lo son la bronquitis infecciosa, cólera aviar, influenza aviar, laringotraqueítis, viruela aviar, micoplasmosis, enfermedad respiratoria crónica y coriza infecciosa, principalmente. Pero también puede haber errores de manejo tales como falta de agua, aire y alimento (OIE, 2005).

La Coriza Infecciosa y bronquitis infecciosa, no producen signos nerviosos ni digestivos, laringotraqueitis y micoplasmosis, son de difusión lenta, no producen signos nerviosos ni digestivos e influenza aviar que produce signos respiratorios y un cuadro hemorrágico, en los periodos finales puede ocurrir signos de parálisis y movimientos convulsivos y se diferencia por medio de la HI. (Moreno,1994)

Control

El objetivo del control es prevenir la infección o reducir la cantidad de aves susceptibles a la ENC. Los factores fundamentales para prevenir la introducción de la ENC y su diseminación durante los brotes, están en las condiciones en las cuales se crían las aves, y el grado de bioseguridad que se practica en la granja. Como prevención casi todos los países tienen restricciones de comercialización en productos avícolas, huevos y aves domésticas. En muchos países se ha legislado y adoptado políticas de erradicación con el sacrificio obligatorio de las aves infectadas, sus productos y desechos. Tales políticas, comprenden restricciones del movimiento o comercialización de aves de una área de cuarentena definida

alrededor de un brote. Otros requieren vacunación profiláctica de las aves aun en ausencia de brotes (Calnek *et al*, 1997).

Vacunación

La finalidad de la vacunación es proteger activamente a las aves. Existen tres tipos de vacunas disponibles comercialmente para la ENC: Lentogénicas vivas, mesogénicas vivas y mesogénicas inactivadas. Las primeras por lo general, se derivan de cepas de campo de las que se ha demostrado tienen baja patogenicidad para las aves, pero no producen una adecuada respuesta inmunitaria, las cepas típicas de las vacunas son: Hitchner, B1, Cepa F, LaSota, y V4. (Selbitz y Moos, 1997) (Jordan y Pattison, 2000).

La inmunización básica se logra por lo general con 2 aplicaciones, una en la 1ª semana de vida y otra al cumplir las aves 4 semanas y la revacunación en su caso se realiza con todas las vacunas a las 16 semanas. Las aves jóvenes pueden inmunizarse con algunas vacunas a partir del primer día de vida. (Selbitz y Moos, 1997)

Vacunación virus activo

Las vacunas lentogénicas vivas se pueden administrar de manera individual con una gota en el ojo ó inmersión del pico, aunque es mas práctico usar métodos de aplicación masiva como agua de bebida ó aspersores. Estos últimos se emplean en particular durante las epizootias para enfrentar una diseminación rápida de la enfermedad; así mismo la administración de cepas vacunales lentogénicas permite la vacunación de grandes cantidades de aves y en general la respuesta inmunológica rápida (Jordan y Pattison, 2000).

Las vacunas mesogénicas como Roakin, Komarov y H se obtienen de cepas muy virulentas en laboratorio, su uso se restringe a países donde existe un problema por virus virulentos enzoóticos. Los métodos de aplicación varían con

cada cepa, se pueden administrar en el pliegue del ala. Los virus vacunales son capaces de causar la enfermedad grave por lo que solo deben emplearse después de una vacunación previa con virus lentogénicos (Jordan y Pattison, 2000).

Vacunación virus inactivado

Las vacunas inactivadas se preparan a partir de virus que crecen en embrión de pollo, los cuales se inactivan por medio de un tratamiento con formalina ó betapropiolactona. Las vacunas inactivadas acuosas que se utilizaban, se han sustituido en años recientes por las que emplean aceite como base. La inmunogénicidad de tales vacunas puede variar de manera considerable. Se utilizan virus virulentos como no virulentos. Estas vacunas se deben aplicar de manera individual mediante inyección intramuscular o subcutánea por lo tanto su aplicación resulta mas cara y tardada que la de las vacunas vivas y las cepas mas utilizadas para su fabricación son : Ulster, Roakin y LaSota (Jordan y Pattison, 2000).

Cuando la enfermedad de Newcastle se ha manifestado en la parvada de un establecimiento avícola, no existe algún tratamiento específico aplicable; sin embargo, puede lograrse alguna recuperación significativa de las aves, realizando algunas prácticas zootécnicas que eviten cualquier tipo de estrés en la parvada, asegurando además del control adecuado de la ventilación y de los cambios de temperatura en las casetas de cría, intentando en lo posible, las mejores condiciones ambientales favorables a la recuperación de la parvada enferma. Además de las iniciativas anteriores la suplementación alimenticia con vitamina “A” que se suministra en el alimento al doble de lo recomendado, para influenciar en la recuperación del epitelio mucoso traqueal y bronquial del aparato respiratorio (Lucio, 1994)

5.- OBJETIVOS

5.1.- Objetivo general

Verificar que la vacuna VENC-EXP (Confidencial) reúna las características óptimas de calidad, seguridad e inocuidad.

5.2.- Objetivo particular

Comprobar la calidad de la vacuna VENC-EXP ante el desafío con virus velogénico viscerotrópico de la enfermedad de Newcastle.

6.- METAS

- _ Realizar las pruebas físicoquímicas de: pureza, pH y vacío, a una muestra de 10 viales.
- _ Realizar las pruebas biológicas de: esterilidad en 10 Viales
- _ Realizar las pruebas biológicas de desafío en un grupo de 10 aves.

7.- METODOS

Las diversas pruebas para la constatación de la vacuna se llevaron a cabo en el laboratorio y las instalaciones del Centro Nacional de Servicio de Diagnostico en Salud Animal (CENASA) ubicado en el Km 37.5 en la carretera México-Pachuca en Tecámac de Felipe Villanueva, Estado de México. C.P. 55740.

Cabe mencionar que los procedimientos utilizados son los descritos en la Norma Oficial Mexicana NOM-063-ZOO-1999, Especificaciones que deben cumplir los biológicos empleados en la prevención y control de enfermedades que afectan a los animales domésticos. Las pruebas que se realizaron para la constatación de la vacuna se dividen en dos grupos, físicoquímicas y biológicas

A continuación se presentan las pruebas que se verificaron en el inmunógeno:

Pruebas de control físico-químico:

pH

La prueba se efectuó empleando un instrumento potenciométrico calibrado con la sensibilidad para reproducir valores de pH de 0.05 unidades. Las mediciones deben efectuarse a determinadas temperaturas constantes. El potenciómetro debe calibrarse usando soluciones certificadas. Los productos deben mantenerse dentro de un rango de pH que permita conservar su estabilidad durante su vigencia; de acuerdo con las condiciones del fabricante.

Inspección física

Los productos y sus diluentes deben estar libres de partículas extrañas. Aquellos que presenten uno o más de los siguientes defectos deben ser separados: mal sellado, mal llenado y objetos extraños como vidrios, pelusa y otros.

Vacío

Los biológicos liofilizados sellados al vacío deben probarse al 100% con auxilio del detector de vacío de alta frecuencia, eliminando aquellos que no presenten vacío. Los biológicos liofilizados de cada lote sellados con gases inertes quedan exentos de esta prueba, lo cual debe especificarse en el protocolo de calidad. (Norma Oficial Mexicana NOM-063-ZOO-1999 Especificaciones que deben cumplir los biológicos empleados en la prevención y control de enfermedades que afectan a los animales domésticos)

Pruebas biológicas:

Seguridad ó inocuidad

Material:

- 10 aves de 1-10 días de edad
- Vacuna de prueba
- Aplicador de la vacuna

Metodología:

Se utilizó un mínimo de 10 aves susceptibles de la misma edad de 1 a 10 días. Se inoculó por vía ocular un equivalente a 10 dosis del producto terminado. Se observó por un periodo de 21 días posteriores a la inoculación, tiempo en el cual no se debe presentar reacciones atribuibles a la vacuna.

Prueba de potencia

Material:

- 20 aves de 2-6 semanas de edad
- Cabinas ó unidades de desafío
- Jeringas de 1 ml.
- Virus viscerotrópico velogenico de la enfermedad de Newcastle

Metodología:

Se empleó un grupo de 20 aves susceptibles de 2 a 6 semanas de edad. Se formaron dos grupos, grupo de prueba (A) y grupo control ó testigo (B). Al grupo A se le aplicó la vacuna vía intramuscular y la dosis recomendada por el laboratorio productor y al lote testigo se le aplicó una solución salina fisiológica por la misma vía y en el mismo volumen que al lote de prueba. Se observaron de 15 a 21 días después de la vacunación. Se desafiaron ambos grupos mediante la inoculación por vía intramuscular con 0.2 ml de virus virulento de Newcastle cepa velogénica,

con un título de 10^6 DIEP 50% por ml. capaz de matar o enfermar al 90% de las aves del grupo B. Se observaron por 14 días registrándose la mortalidad. Se considerará satisfactorio cuando más del 90% de las aves del grupo B murieron y las restantes del grupo (B) presentaron signos de la enfermedad o cuando más del 90% de las aves del grupo A sobrevivieron y no presentaron ningún signo atribuible a la enfermedad.

Esterilidad

Material:

- Agar Saboureaud
- Caldo tioglicolato
- Caldo soya tripticaseina
- Agar nutritivo
- Agar Mc Conckey
- Medio Hayflick
- Medio Frey
- Cajas Petri
- Pipetas de 1 y 5 ml
- Asa bacteriológica
- Estufa bacteriológica
- Viales de la vacuna a constatar

Esta prueba consiste en determinar que el producto vacunal se encuentre libre de contaminantes.

El producto debe reunir las siguientes características:

1. Deberá mediante análisis bacteriológico cuantitativo no contener más de una colonia de contaminantes por dosis.

2. El análisis bacteriológico cualitativo deberá demostrar que está exento de cualquier bacteria patógena, utilizando medios para crecimiento aerobio y anaerobio.
3. Deberán utilizarse medios de enriquecimiento y selectivos para determinar que el producto no se encuentra contaminado con cualquier especie de *Salmonella*.
4. Es necesario realizar las pruebas necesarias a fin de demostrar que el producto no contenga dentro de la cuenta bacteriana más de una colonia de hongos y levaduras por dosis.
5. Se requiere realizar pruebas que demuestren que el producto está libre de *Mycoplasmas*
6. Se inocularon cajas de Petri con los diferentes medios con la vacuna que se analizó.
7. Se observaron durante un periodo de incubación de 14 a 28 días post inoculación y se anotaron los resultados obtenidos.

8.- ACTIVIDADES REALIZADAS

- Preparación de medios biológicos de cultivo para la realización de pruebas de esterilidad.
- Ejecución de pruebas fisicoquímicas a las vacunas muestra.
- Vacunación de aves por diferentes vías.
- Toma de muestras faríngeas en aves vacunadas.
- Recepción de animales, alimentos, fármacos y materiales en el área cuarentenaria.
- Acondicionamiento de corraletas, jaulas y criadoras.
- Colaboración en el desafío en ratones durante la constatación de una vacuna contra la rabia.

- Toma de muestras sanguíneas en cerdos para la titulación de anticuerpos vacúnales.

9.-OBJETIVOS ALCANZADOS

- Se verificó de manera satisfactoria que la vacuna VENC-EXP cumpliera con las características óptimas de calidad, seguridad e inocuidad durante su constatación. La cual cumplió con las evaluaciones oficiales.
- La calidad en la potencia de la vacuna VENC-EXP fue comprobada mediante el desafío con un virus velogénico viscerotrópico de la Enfermedad de Newcastle. Mostrando alta efectividad.

10.- METAS ALCANZADAS

- Se realizaron exitosamente las pruebas fisicoquímicas a un total de 10 viales.
- Los ensayos biológicos de esterilidad se efectuaron de forma eficaz a 10 muestras.
- Se llevaron a cabo de manera satisfactoria las pruebas biológicas de Desafío en un grupo de 10 aves.

11.- RESULTADOS

PRUEBAS FÍSICO-QUÍMICAS

pH

Se realizó la prueba de pH obteniendo el siguiente resultado 7.74 pH, el pH que maneja el laboratorio productor es ≤ 6.0 a 7.5 pH, lo cual es alto, sin embargo no causo daños a las aves.

INSPECCIÓN FÍSICA

Se realizó la prueba de inspección física obteniendo un resultado SATISFACTORIO porque cumplió todos los requerimientos de la NORMA ZOO 063 para un producto biológico, como lo es libre de partículas extrañas.

PRUEBA DE VACIO

Se efectuó la prueba de vacío a 16 viales de la vacuna VENC-EXP enviados por el laboratorio fabricante, con el detector de vacío de alta frecuencia (Lámpara de Tessler) de los cuales el 100% resultó SATISFACTORIO.

PRUEBAS BIOLÓGICAS

PRUEBA DE SEGURIDAD O INOCUIDAD

La prueba de seguridad se realizó al par de las pruebas de potencia, esta prueba resultó SATISFACTORIA ya que no presento reacciones secundarias al ave que pudiera causar la vacuna.

PRUEBA DE POTENCIA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE (Tabla 1).

Día	Control (+)	Vacunado (VENC-EXP)
1	***	***
2	***	***
3	***	***
4	***	***
5	2	***
6	6	1
7	2	***
8		***
9		***
10		***
11		***
12		***
13		***
14		***
Total	10	1
% Mortalidad	100	10

*** Ave viva

Resultados de la prueba de potencia para enc
Grupo vacunado con la vacuna activa venc-exp

Se obtuvo el 100% de protección de la vacuna contra la Enfermedad de Newcastle. Se utilizó para el desafío el Virus Mesogénico de la ENC, En vial de 10 ml.

GRUPO CONTROL POSITIVO (AVES SIN VACUNAR):

Se observó un 100% de mortalidad de este grupo en un menor tiempo esperado por la prueba por lo que se considera que el virus vacunal protegió adecuadamente a las aves. Se utilizó el Virus Mesogenico de la Enfermedad de Newcastle, vial de 10 ml.

ESTERILIDAD (Tabla 2).

MEDIO	INOCULACIÓN	TEMP.	DÍAS DE OBSERVACION													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CALDO TIOGLICOLATO	1 ml 2ml	37 °C 22°C	**	**	**	//	//	**	**	**	**	**	//	//	**	**
CALDO SOYA TRIPTICASEINA	1ml	22 °C	**	**	**	//	//	**	**	**	**	**	//	//	**	**
AGAR NUTRITIVO	ASADA	37 °C	**	**	**	//	//	**	**	**	**	**	//	//	**	**
AGAR SABOUREAUD	ASADA	22 °C	**	**	**	//	//	**	**	**	**	**	//	//	**	**
OTRO (Mc) CONCKEY	ASADA	37 °C	**	**	**	//	//	**	**	**	**	**	//	//	**	**
CONTROL DE PIPETA	N/A	37 °C	**	**	**	//	//	**	**	**	**	**	//	//	**	**
CONTROL DE MEDIO Y PRUEBA	N/A	37 °C	**	**	**	//	//	**	**	**	**	**	//	//	**	**

CLAVE: **: Sin Contaminación //: Día no Hábil

Prueba de Esterilidad (Bacterias)

RESULTADO: SATISFACTORIO. Se observó durante 14 días la inoculación para bacterias aerobias, anaerobias, hongos y levaduras y los medios utilizados, no presentaron contaminación de ningún tipo.

ESTERILIDAD (MICOPLASMA) (Tabla 3).

MEDIO	DÍAS DE OBSERVACIÓN																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
HAYFLICK	**	**	**	//	//	**	**	**	**	**	//	//	**	**	**	**	**	//	//	**	**	**	**	**	//	//	**	**
FREY	**	**	**	//	//	**	**	**	**	**	//	//	**	**	**	**	**	//	//	**	**	**	**	**	//	//	**	**
CONTROL	**	**	**	//	//	**	**	**	**	**	//	//	**	**	**	**	**	//	//	**	**	**	**	**	//	//	**	**

CLAVE: **: Sin Contaminación //: Día no Hábil
Prueba de Esterilidad (Micoplasma)

RESULTADO: SATISFACTORIO. Se observó durante 28 días la inoculación para micoplasmas y los medios utilizados, no presentaron contaminación.

12.- CONCLUSIONES

Se realizaron dos tipos de pruebas, las fisicoquímicas y las biológicas, de las cuales se obtuvieron resultados satisfactorios para la mayoría de ellas.

Para el caso de pruebas biológicas se realizó la prueba de seguridad en donde el resultado obtenido es SATISFACTORIO porque al inocularles el doble de la vacuna a las aves, estas no presentaron reacciones atribuibles a la vacuna después de su inoculación.

También se realizó la prueba de potencia para Newcastle que resulto SATISFACTORIA ya que murieron todas las aves, obteniendo un 100% de mortalidad del Grupo control positivo que es el que no encontraba vacunado y del que debería haber $\geq 90\%$ de mortalidad o de aves enfermas que presentaran signos atribuibles a la enfermedad como diarrea verdosa, plumaje erizado, etc., para el grupo vacunado con la vacuna de prueba debió de existir una protección $\geq 90\%$ de las aves de este grupo sin presentar signos que se atribuyan a la enfermedad, de este grupo solo hubo mortalidad de un 10% pasando SATISFACTORIAMENTE la prueba.

Con base en los anteriores resultados se concluye que la vacuna VENC-EXP cumple con los requisitos mínimos que exige la NORMA ZOO 063 para su producción comercial.

Así también los procedimientos y pruebas para su evaluación, resultan suficientes y adecuados para garantizar la efectividad y seguridad biológica del inmunógeno evaluado.

13.-RECOMENDACIONES

De acuerdo a las actividades realizadas y el tiempo transcurrido en este laboratorio de referencia se sugieren las siguientes recomendaciones.

- La remodelación de diversas zonas del área cuarentenaria sería de valiosa ayuda, ya que las actuales instalaciones resultan obsoletas.
- Se sugiere capacitación continua para el personal que trabajan de manera directa con los animales de experimentación.
- Implementación de un stock de reserva de fármacos, utensilios, materiales y alimento para el area cuarentenaria.
- Buscar la vinculación con universidades, ya que en este caso tuve una capacitación específica y especializada que brinda herramientas de utilidad laboral que en el transcurso de la carrera como estudiante de la uam-x escasamente me fueron proporcionadas.

14.- BIBLIOGRAFÍA

- AL-GARIB, S.O., GIELKENS, A.J., GRUYS, E: (2003) Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination. *World's Poultry Science Journal* 59:185-200.
- ALEXANDER, D.J.: (1990) Newcastle disease. Kluwer. Academic Publishers. USA. pp 253-280.
- ALEXANDER, D.J.: (1991) Newcastle Disease and other Paramixovirus Infection. En : *Diseases of Poultry*, 9 th ed. Chap. 19, Eds the Iowa State University Press. Ames, Iowa. pp. 496-512
- ARAGÓN, L.P.: (1960). Las Enfermedades de las Aves de Corral. Ed. La Prensa. México. Pp.182-201
- CALNEK, B.W. BARNES, H., BEARD, C,W : (1995) Enfermedades de la Aves. Ed Manual Moderno. México. pp. 607-627.
- COTTRAL, G. E.: (1996). Manual de Métodos Estandarizados en Microbiología veterinaria, Ed. La prensa médica mexicana S.A. pp. 180.
- GORDON, R.F.: (1990) Enfermedades de las Aves. Ed. Manual Moderno. México. pp. 91-105
- ICA.: (2009) Guía para la prevención, control y erradicación de la enfermedad de Newcastle. Bogotá, Colombia. pp.10-14.
- JORDAN, F.T., PATTISON, M.: (2000) Enfermedades de las Aves. ED. Manual Moderno. México. pp. 138-145.
- LUCIO, M.B: (1994) Ciencia Veterinaria Vol.6, México., pp.149-170
- MALO, A.: (2011). La enfermedad de Newcastle es una grave amenaza, *Revista Industria Avícola*, Vol. Julio. pp 16-17.
- MATHEWS, R.F.: (1979) Classification and nomenclature of viruses. 3th. Report of International *Committee on Taxonomy of viruses*. Pp. 216-218.
- MOHANTY, B.S., DUTTA, K.S.: (1998) Virología Veterinaria. Ed Interamericana. México. pp. 294-298.
- MORENO, R.: (1994) La enfermedad de Newcastle y algunos avances recientes de diagnóstico, *Ciencia Veterinaria* Vol. 6, México, UNAM, pp.49-72

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-052-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las vacunas empleadas en la prevención y control de la enfermedad de Newcastle.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-063-ZOO-1999, Especificaciones que deben cumplir los biológicos empleados en la prevención y control de enfermedades que afectan a los animales domésticos.

RITCHIE, S.W., CARTER, K.: (1998) Avian viruses (function and control). Wingers Publishings. pp. 253-280.

OIE.: (2005). Newcastle Disease. Disponible en http://www.oie.int/esp/maladies/fiches/e_A160.htm, Etiología de Newcastle, accesado el 10 de Octubre 2011.

RIVERA,G.O.: (2009), Newcastle. En curso on line Siglo XXI. Era de las zoonosis. Tema 5. Disponible en <http://www.cursosonline.net/cursos/zoonosis1/05.pdf>. Accesado el 5 de octubre de 2011.

SELBITZ, H.J., MOOS, M.: (1997). Vacunación de los Animales Domésticos. Ed. Acribia. España. Pp137-139.