

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



EVALUACION SEROLOGICA DE CAMPO DEL GRADO
DE INMUNIDAD CONTRA LA ENFERMEDAD DE
NEWCASTLE CONFERIDO POR 4 VACUNAS
COMERCIALES TIPO VIRUS INACTIVADO Y
EMULSIONADO EN ACEITE, EN AVES PARA ABASTO

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

MA. DE LOURDES REYNOSO RAMIREZ

GUADALAJARA, JALISCO. 1984

CON AGRADECIMIENTO

A TODOS LOS QUE EN ALGUNA FORMA CONTRIBU
YERON A LA REALIZACION DE ESTA META.

Y TAMBIEN A USTEDES LA PROMESA DE NUEVAS
METAS POR ALCANZAR.

EVALUACION SEROLOGICA DE CAMPO DEL GRADO DE
INNUNIDAD CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE
CONFERIDO POR 4 VACUNAS COMERCIALES TIPO VI
RUS INACTIVADO Y EMULSIONADO EN ACEITE, EN-
AVES PARA ABASTO

I N D I C E

	Página
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	5
MATERIAL	6
METODOS	8
RESULTADOS	12
GRAFICAS	18
DISCUSION	26
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFIA	30

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

Existen infinidad de trabajos acerca de la enfermedad de Newcastle, desde que ésta hizo su aparición en 1926. Sin embargo, su estudio sigue siendo de gran importancia -- tanto científica como económica, no sólo por muertes que se registran a causa de ella, sino especialmente por su alto índice de morbilidad que afecta directamente la productividad. (2). Hechos que vienen a dar a esta enfermedad el lugar más importante en la Avicultura como entidad patológica y consecuentemente como causa primordial de cuantiosas pérdidas económicas.

Siendo pues éste un viejo pero aún grave problema, ha sido una preocupación constante la búsqueda de una vacuna ideal, cuyo efecto sea prolongado y sus desventajas mínimas. Desde luego ciertos adelantos técnicos derivados de la investigación científica han influido en la evolución de dichos productos (4, 5, 6), pero un examen general de la situación del control de la Enfermedad de Newcastle, nos permite deducir que aún existen problemas relacionados con el empleo de productos inmunizantes.

Cuando se demostró que el uso de vacunas con virus inactivado era un método práctico y relativamente seguro, -- fueron las primeras en ser preparadas comercialmente (22), -- a pesar de presentar las objeciones de un lento desarrollo y corta duración de la inmunidad inducida. La aparición en el mercado de vacunas con virus vivo de moderada virulencia rápidamente generalizó su uso bajo la creencia de que este tipo de vacuna proporcionaría pronta, completa y durable -- protección; sin embargo, estas vacunas no son tan seguras -- debido a la posibilidad de que transmitan otras enfermedades (Mycoplasma Gallisepticum y E. Coli) (9), no confieren-

la completa y duradera inmunidad esperada, por lo que existe la necesidad de revacunar para mantener el nivel de protección adecuado.

Además, estas vacunas pueden actuar como agentes - activantes de infecciones latentes del aparato respiratorio (16), y los métodos de administración en masa, tan cómodos - y económicos, suelen dar resultados irregulares. Como consecuencia se observó que ambos tipos de vacunas aún no proporcionaban resultados satisfactorios para obtener el con - trol de la enfermedad (2,4,5,25).

Por tales motivos, los investigadores y fabrican - tes se dedican al mejoramiento de las vacunas inactivadas - (26), las cuales son más seguras y compatibles con la prác - tica de erradicación, buscando incrementar el nivel y dura - ción de la respuesta inmunogénica por medio de la adición - de adyuvantes más estables y de composición más uniforme -- que el hidróxido de aluminio, usualmente utilizado en las - vacunas inactivadas contra la Enfermedad de Newcastle.

De ahí que en los últimos años se ha mostrado un - renovado interés científico y práctico por la aplicación y - uso de adyuvantes oleosos en la preparación de vacunas inac - tivadas; el descubrimiento de Freund (1942-1943) sobre la - notable acción adyuvante de las emulsiones tipo "Agua-Acei - te" para incrementar la respuesta de anticuerpos, dió lugar a numerosas investigaciones sobre el mismo, iniciándose así la vacuno-terapia experimental en la prevención de enferme - dades en animales (14).

Aunque en cada uno de estos estudios fue demostra - do que los antígenos con este tipo de adyuvantes dieron una protección altamente eficaz, se vió la posibilidad de que - se produjeran reacciones de hipersensibilidad. Esta situa -

ción no es de considerarse en el caso de las aves, ya que la vacuna emulsionada se prepara a partir de los líquidos embrionarios de pollo y, por lo tanto, el riesgo es mínimo con proteínas homólogas. Por estas razones se vió propicio el campo para el desarrollo y aplicación práctica, la elaboración de una vacuna con excipiente oleoso para la prevención y control de la Enfermedad de Newcastle. (12,13,18,20, 21,26).

Probablemente fueron Brandly y Col. (1946) los primeros en llevarla a cabo, continuando Mitcheli y Walker --- (1951-1952), Gagliardi y Giroto (1960), Jacottot y Vallée (1959-1963), Italo Clara (1964) y posteriormente Téllez Girón (1968) en México; cuyos estudios concluyen que la vacuna siempre produjo una significativa respuesta de anticuerpos y que la resistencia a la infección se inicia al décimo día de aplicada y su efecto se prolonga cuando menos doce meses; la vacuna es estable por varios meses y no provoca reacciones locales ni generales; pero cabe señalar la importancia del grado de viscosidad del adyuvante oleoso y las proporciones Agua-Aceite (tipo emulsión), ya que también se demostró que ambos factores físicos alteran visiblemente la efectividad de la respuesta inmunogénica. (3,13,21,23)

El interés en recapitular todas estas investigaciones es mostrar que existe suficiente evidencia científica de que las vacunas contra la Enfermedad de Newcastle preparadas con virus inactivado y emulsionado en aceite tienen la propiedad de inducir una alta y prolongada inmunidad que protege a las aves con alta eficacia contra los embates de la enfermedad. (6,18,20,27)

Así pues, el presente trabajo tiene por objeto realizar una prueba de campo para evaluar las diferentes vacunas que existen en el mercado del tipo virus inactivado y -

emulsionado en aceite, usando como parámetros principales - los niveles de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutina - ción y duración de la respuesta inmune; y como parámetros - secundarios el tipo de emulsión y estabilidad de la vacuna.

O B J E T I V O S

En resumen, los objetivos que se pretenden alcanzar, son los siguientes:

- 1.- Evaluar las características inmunogénicas de las vacunas comerciales emulsionadas.
- 2.- Apreciar las diferencias físicas de las mismas y observar su efecto sobre la respuesta inmune.
- 3.- Aplicar el método científico a nivel de campo.
- 4.- Contribuir en forma modesta a la búsqueda de formas cada vez más seguras y eficientes para el control y de ser posible la erradicación de la Enfermedad de Newcastle.

M A T E R I A L

1.- Material Biológico:

- 5000 pollos de engorda variedad Hubbard
- Vacuna inactivada y emulsionada "A" (Lote N° 118-010-18 fecha expiración Mayo/83)
- Vacuna inactivada y emulsionada "B" (Lote N° 4; fecha expiración Julio/82)
- Vacuna inactivada y emulsionada "C" (Lote N° 0-3; fecha expiración Agosto/83)
- Vacuna inactivada y emulsionada "D" (Lote N° 201-095; fecha expiración Julio/83)

2.- Material Técnico:

Micro-equipos Básicos;

- Microplacas de fondo en "U"
- Microdiluidores (0.05 Ml.)
- Mango para microdiluidores
- Pipetas (graduadas a 0.05 Ml.)
- Puntas para pipetas
- Probadores de dosificación para 0.05 Ml. (Plantilla - "gonogo").

3.- Reactivos:

- P.B.S. (Solución Buffer Fosfatada)
- Suspensión de Glóbulos rojos lavados de ave al 0.75%
- Antígeno (Virus de Newcastle cepa la Sota, con 4 U.H.A.)
- Sueros de Ave para prueba

4.- Equipo Auxiliar de Laboratorio:

- Termómetro
- Centrífuga
- Microscopio
- Refrigerador

- Material de Cristalería
- Estufa de Incubación 37° - 40° C.

M E T O D O S

1.- Distribución de los Grupos de Prueba:

Los 5000 pollitos en engorda, de 1 día de edad, se dividen al azar en 5 grupos de 1000 aves cada uno, siendo alojados en un criadero convencional de piso, practicándose en todos ellos las mismas normas de manejo e higiene, exceptuando el quinto grupo que fungió como testigo.

2.- Obtención de las Muestras para Pruebas:

Con objeto de coleccionar las muestras de una manera significativa de cada uno de los productos inmunizantes antes citados, se procederá a obtenerlas de la manera siguiente:

- a) Una muestra (1 frasco de vacuna) proveniente de algún consumidor directo de estos productos (avicultor).
- b) Otra muestra se coleccionará de algún distribuidor que maneje estos productos.

Por tanto, para realizar las inmunizaciones se hará una mezcla de ambas muestras. En este caso no se recurre para obtener las muestras directamente del Laboratorio-productor, dado que este tipo de vacunas por ser de reciente preparación, no se deterioran en su potencia por el manejo y se considera más representativo su muestreo de este modo; ya que de esta manera se apreciarán las características de estabilidad de cada una de las vacunas de experimentación.

3.- Pruebas Físicas:

Dado que estas vacunas representan diferencias entre sí y quedando confirmado que determinadas características físicas pueden influir en la respuesta inmune, se realizarán un mínimo de pruebas físicas elementales, con el fin de determinar el tipo de emulsión, el grado de agregación de las partículas y su estabilidad, mediante las siguientes pruebas:

1) Prueba Física de Centrifugación:

Con objeto de observar la estabilidad física de la vacuna, se hizo centrifugar 10 Ml. de cada una a 1500 - R.P.M. durante 15 minutos, y se procedió a la lectura - midiendo aproximadamente el grado de separación que --- existe en cada muestra y expresándolo en porcentaje.

2) Prueba de Dilución:

Esta prueba física tiene como objeto determinar de manera sencilla y segura el tipo de emulsión de cada vacuna. La prueba se basa en la característica de la fase externa de la emulsión. Si la fase externa es la -- porción acuosa, como en el caso del tipo Aceite en Agua, una gota de la emulsión prontamente se dispersará en -- agua, porque los dos líquidos son miscibles; pero cuando la gota se pone en aceite entonces ocurre la dispersión porque la parte externa no es miscible. En cambio, si la emulsión fuera del tipo Agua en Aceite la gota no se dispersará en agua, pero sí en aceite.

3) Prueba Microscópica de las Emulsiones:

Además de la prueba anterior, las vacunas se sometieron a otra prueba para verificar el tipo de emulsión

de cada una. Esta valoración tiene como finalidad ob-servar el tamaño de las partículas de las vacunas emulsionadas y por tanto también verificar el tipo de emulsión, así como la agregación de estas partículas entre sí que se traduce literalmente a estabilidad de la vacuna.

Se realiza colocando 1 gota de vacuna emulsionada en un portaobjeto, a la que se le adiciona 1 gota de solución salina o algún emulsificador hidrofílico y se observa directamente al microscopio en seco débil.

4) Prueba de Estabilidad a Diferentes Temperaturas:

Se colocaron 10 Ml. de muestra de cada vacuna, en frascos de vidrio transparente a diferentes temperatu-ras (Temperatura ambiente, 37° C y 10° C) durante 6 meses, realizándose lecturas mensuales.

La ausencia de separación de la vacuna se traduce en estabilidad. El otro extremo será la ruptura de la emulsión o sea la coalescencia de las partículas dispersadas y por tanto la inversión de la fase dispersada. - Aunque en este caso una separación de menos de 20% que se mantenga por largos períodos indican estabilidad solo diferente formulación de la emulsión (en cuanto a --proporciones de la fase acuosa y la fase oleosa).

4.- Programa de Vacunación:

En todos los grupos de prueba se llevará a cabo el mismo programa de inmunización, la única diferencia radica en las vacunas comerciales emulsionadas que provienen de diferentes laboratorios, ya que se trata de valorar las quali

dades inmunogénicas de los productos elaborados.

Por tanto, el programa de vacunación a seguir será el implantado por el M.V.Z. responsable como norma fija, da das las características de la región, quedando adecuado de la siguiente manera:

A los 8 días de edad se les aplicará vacuna virus-vivo cepa la sota vía ocular, siguiendo el calendario de vacunación rutinaria.

A los 21 días de edad se procederá a la aplicación por vía subcutánea, de las diferentes vacunas inactivadas y emulsionadas a los 4 grupos de prueba, quedando el quinto grupo como testigo.

5.- Método de Evaluación:

Para evaluar serológicamente la respuesta inmune - se procederá a muestrear el 10% de aves de cada grupo antes de la vacunación (20 días de edad) y a los 35, 50 y 75 días de edad. Para este efecto se utilizará el método standard-Beta de inhibición de la hemoaglutinación por microtitulación en placa mediante microplacas de fondo en "U", microdiluidores de 0.05 ml., glóbulos rojos lavados de ave al 0.75% y 4 unidades hemoaglutinantes de un virus cepa la sota inactivado y glicerinado al 25%.

RESULTADOS

1.- Pruebas Físicas:

Con objeto de encontrar una explicación a las diferentes curvas de inmunidad y tal como lo expresa el protocolo previo a las pruebas de campo, se procedió a realizar -- pruebas físicas con las diferentes vacunas que comprendieron:

A) Pruebas Físicas de Centrifugación:

VACUNAS	GRADO DE SEPARACION %
VACUNA "A"	5 %
VACUNA "B"	0 %
VACUNA "C"	0 %
VACUNA "D"	15 %

B) Prueba Física de Dilución:

VACUNAS (5 Ml.)	PRUEBA EN AGUA (200 Ml.)	PRUEBA EN ACEITE (Aceite Min. NF-60 200 Ml)	TIPO DE EMULSION
VACUNA "A"	NO SE DISUELVE	SE DISUELVE	AGUA EN ACEITE
VACUNA "B"	SE DISUELVE	NO SE DISUELVE	ACEITE EN AGUA
VACUNA "C"	SOL. PARCIAL \pm 20%	SE DISUELVE	AGUA EN ACEITE
VACUNA "D"	NO SE DISUELVE	SE DISUELVE	AGUA EN ACEITE

C) Prueba Microscópica de las Emulsiones:

	TAMAÑO DE LAS PARTICULAS (en micras aprox.)	UNIFORMIDAD
VACUNA "A"	3 - 6	Gotas con cierta uniformidad, - existen algunas de mayor tamaño aproximadamente 20%.
VACUNA "B"	1 - 3	Se observan sólo gotas de acei- te de pequeños diámetro rodea- das de la fase acuosa.
VACUNA "C"	3 - 4	Gotas de tamaño uniforme.
VACUNA "D"	5 - 12	El tamaño de las gotas muy va- riable, presentándose desde go- tas pequeñas (aprox. 40%) has- ta muy grandes (aprox. 25%).

D) Pruebas de Estabilidad a Diferentes Temperaturas (Durante 6 meses)

(Grado de Separación entre fases expresado en por ciento (%) o ruptura de la emulsión).

V A C U N A "A"

MESES	TEMP. AMBIENTE	37° C	10° C
0	5%	5%	5%
1	7%	15%	12%
2	15%	RUPTURA TOTAL	15%
3	15%	---	IDEM.
4	RUPTURA PARCIAL	---	IDEM.
5	RUPTURA TOTAL	---	IDEM.
6	---	---	IDEM.

V A C U N A "B"

MESES	TEMP. AMBIENTE	37° C	10° C
0	SIN CAMBIOS	SIN CAMBIOS	SIN SEPARACION
1	SIN CAMBIOS	SIN CAMBIOS	SIN SEPARACION
2	SIN CAMBIOS	Formación de Grumos	IDEM
3	SIN CAMBIOS	Mayor Formación de Grumos	IDEM
4	Grumos Parte Inferior	RUPTURA TOTAL	IDEM
5	Grumos Parte inferior	---	IDEM
6	RUPTURA	---	IDEM

V A C U N A "C"

MESES	TEMP. AMBIENTE	37° C	10° C
0	SIN CAMBIOS	SIN CAMBIOS	---
1	SIN CAMBIOS	---	---
2	IDEM	Grumos en la Parte Inferior y una zona más clara.	---
3	IDEM	"	---
4	IDEM	"	---
5	Ligera formación de Grumos en la parte Inferior.	RUPTURA	---
6	Sedimento y Grumos en la parte Inferior.		---

V A C U N A "D"

MESES	TEMPERATURA AMBIENTE	37° C	10° C
0	15 %	15 %	15 %
1	15 %	RUPTURA PARCIAL	20 %
2	18 %	RUPTURA TOTAL	28 %
3	20 %	---	28 %
4	RUPTURA PARCIAL SOBRENADANTE OPACO	---	IDEM
5	RUPTURA TOTAL	---	IDEM
6		---	IDEM

2.- Pruebas de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH)

Respuesta de Anticuerpos a las Vacunas Emulsionadas.- Los resultados de estas pruebas, expresados en medida geométrica Logaritmo 2, de 4 lotes inmunizados con diferentes vacunas, se encuentran expresados en las tablas y gráficas siguientes:

TABLA N° 1

DIAS	GRUPO VAC. "A"	GRUPO VAC. "B"	GRUPO VAC. "C"	GRUPO VAC. "D"
1º 35	2.4	3.5	3.5	3.5
2º 50	6.1	2.4	5.2	3.6
3º 75	5.8	3.0	4.9	4.3

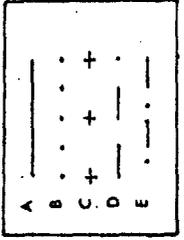
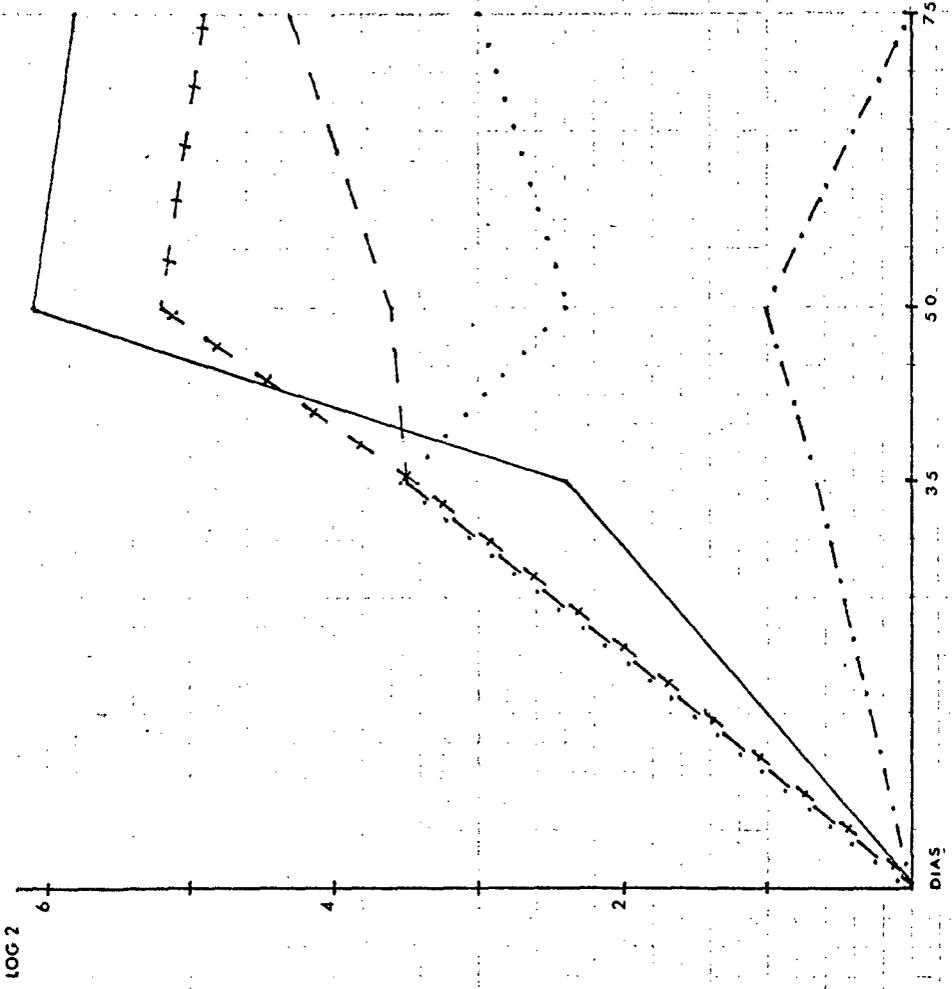
Tanto la Tabla N° 1, como la Gráfica N° 1, resumen los resultados de las pruebas de IH, de cada vacuna y en los 3 periodos post-vacunales. El estudio de estos datos permite señalar los siguientes hechos, los cuales son ilustrados más detallados en las Gráficas 2, 3 y 4:

- 1) El rápido ascenso en el primer muestreo de las vacunas "B", "C" y "D" mientras en la vacuna "A" subió más lentamente.
- 2) En el segundo muestreo se observa un desarrollo muy heterogéneo, mientras "A" y "C" continúan el ascenso, las 2 restantes "B" y "D" se mantienen o bajan.
- 3) La última prueba nos señala que 3 de las vacunas ("B", "C" y "D") dieron como resultado una inmunidad promedio de $4(\log. 2)$ mientras que "A" estuvo muy por encima con-

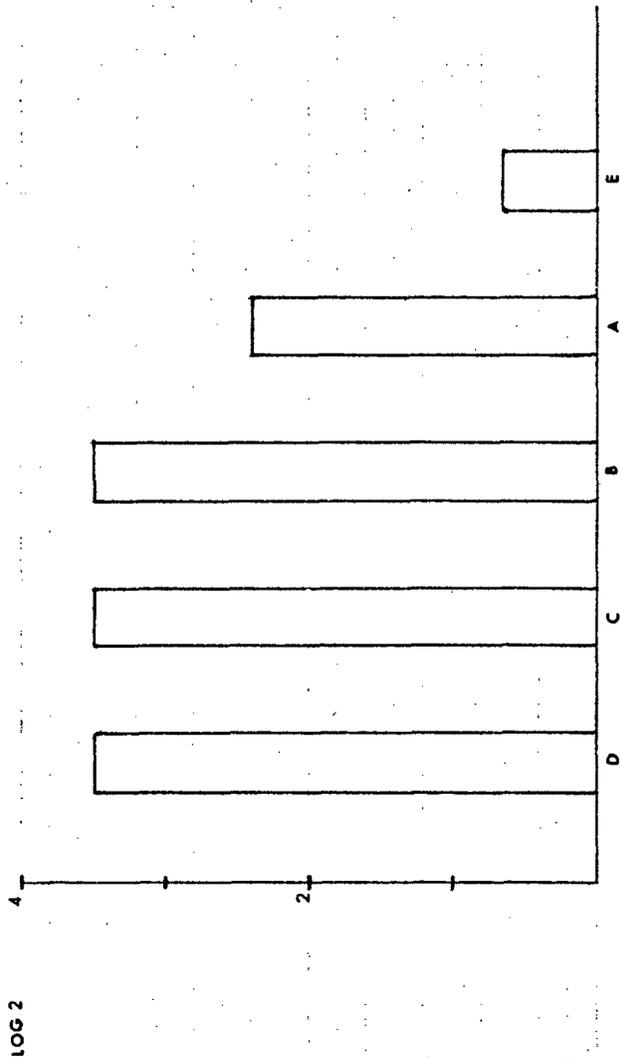
5.8 logaritmo base 2.

En las siguientes gráficas se observa el comportamiento independiente de cada vacuna.

GRAFICA GENERAL N1



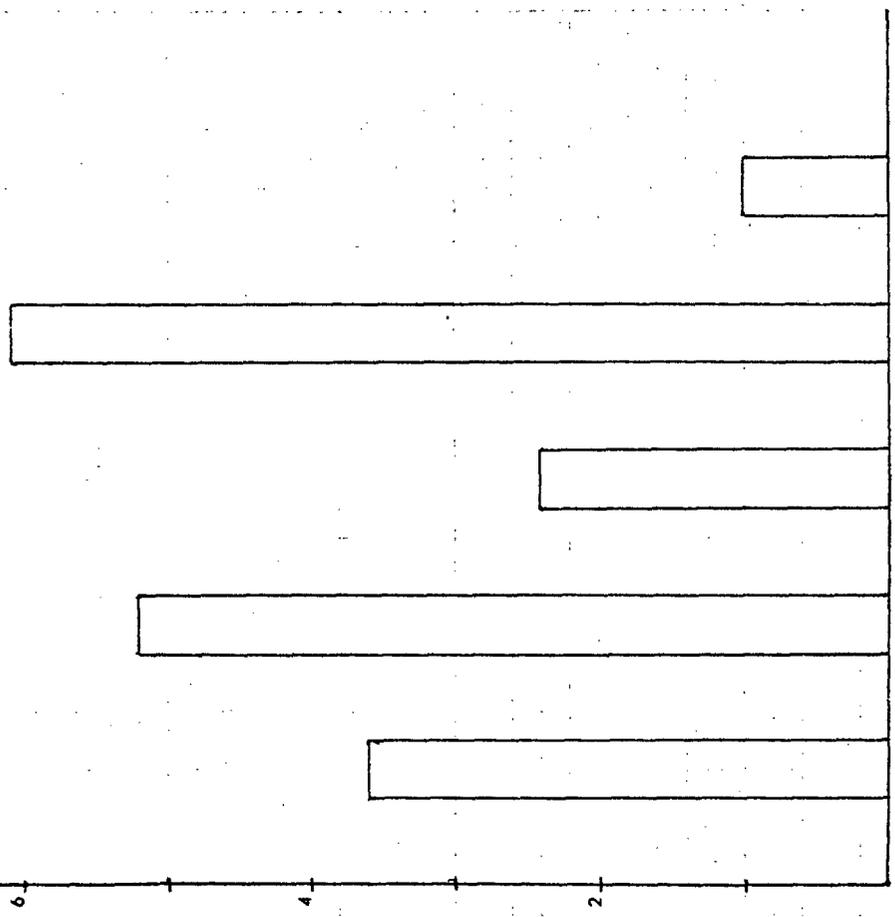
GRAFICA N 2



PRI MER MUESTRO
35 DIAS DE EDAD

LOG 2

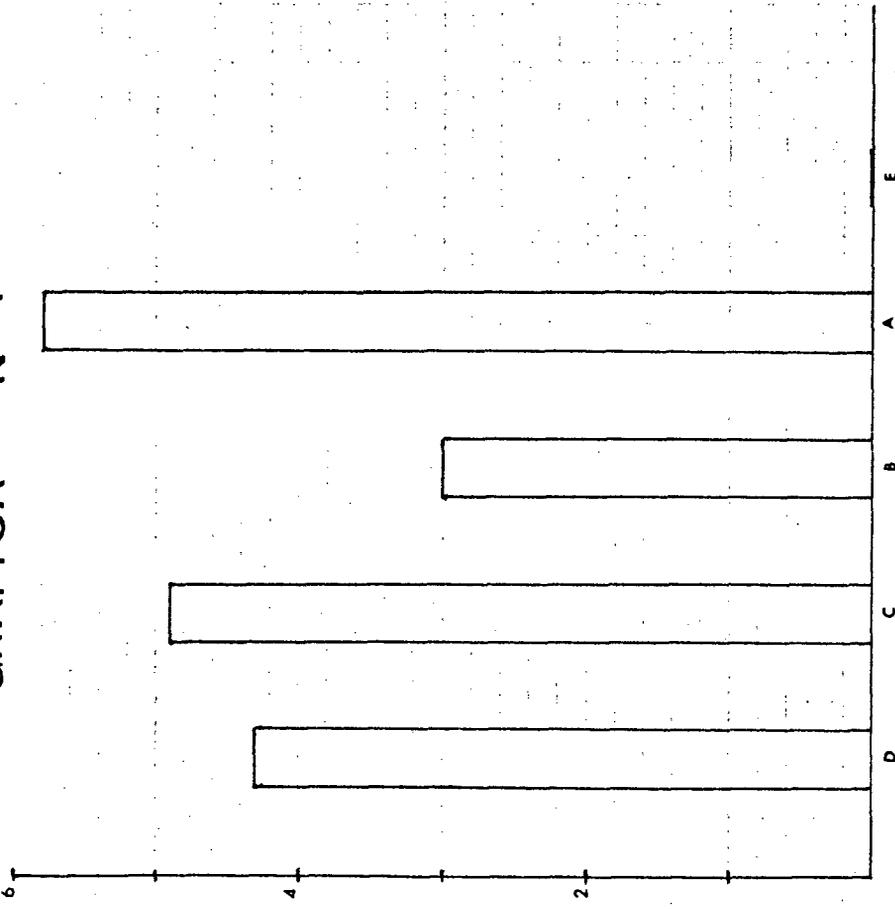
GRAFICA N 3



2º MUESTREO 50 DIAS DE EDAD

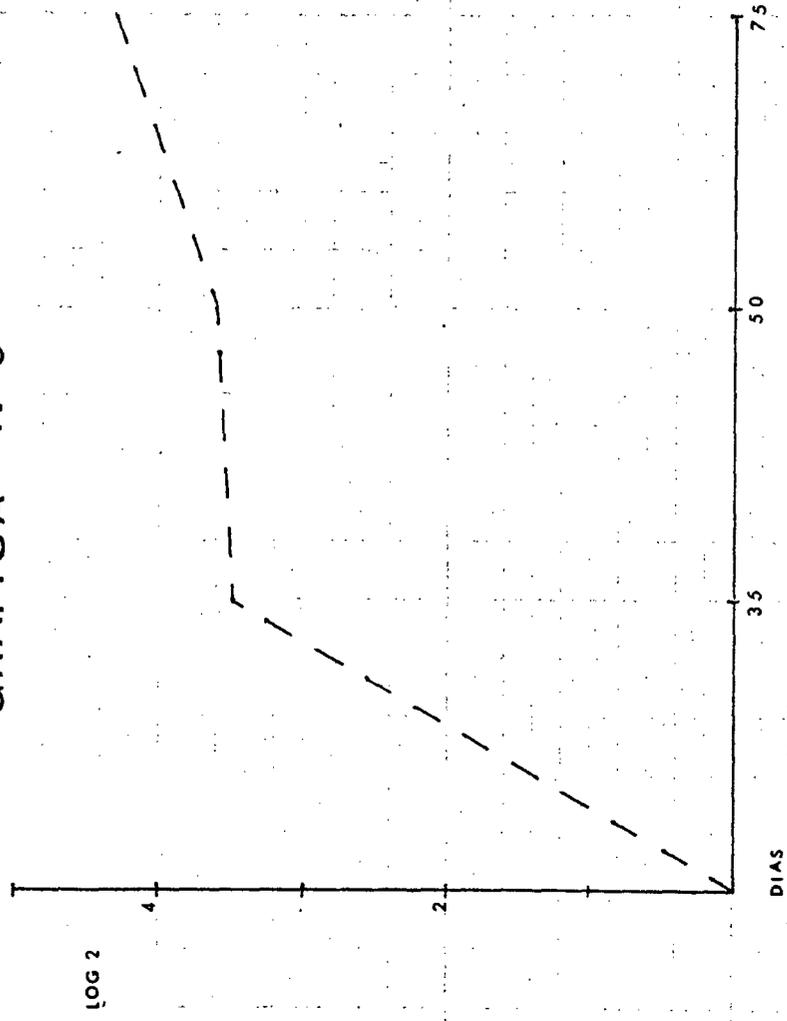
LOG 2

GRAFICA N 4



3° MUESTREO 75 DIAS EDAD

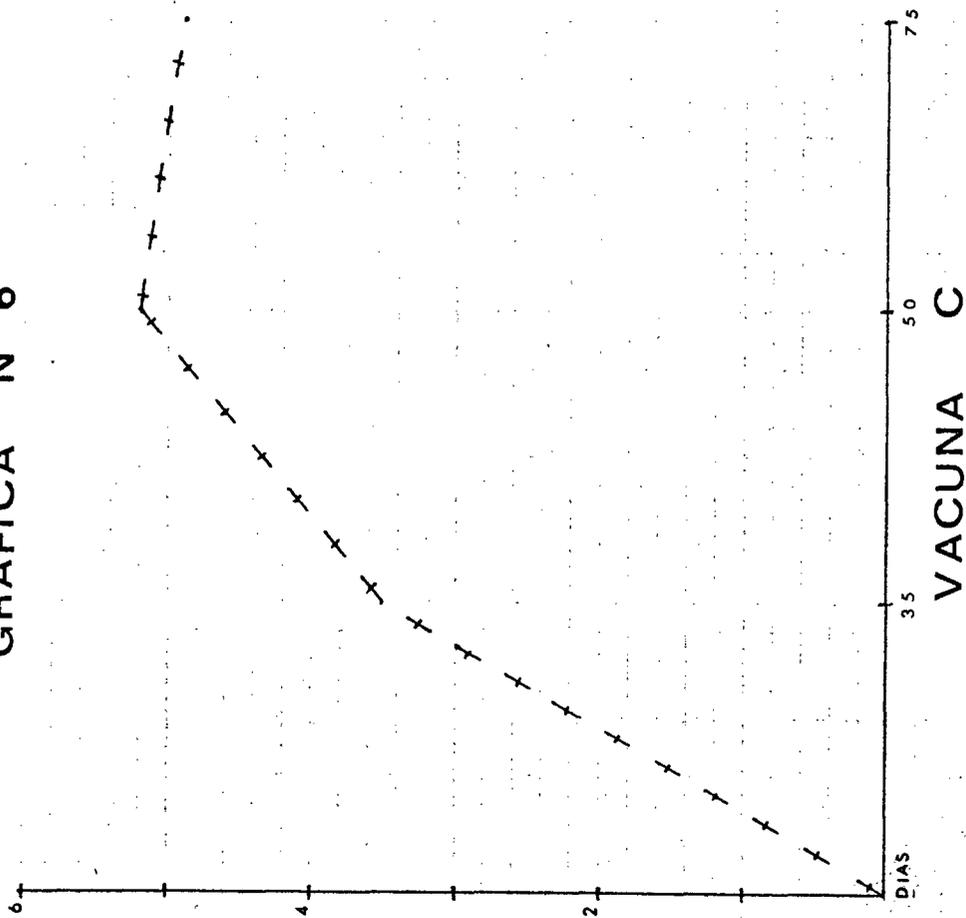
GRAFICA N 5



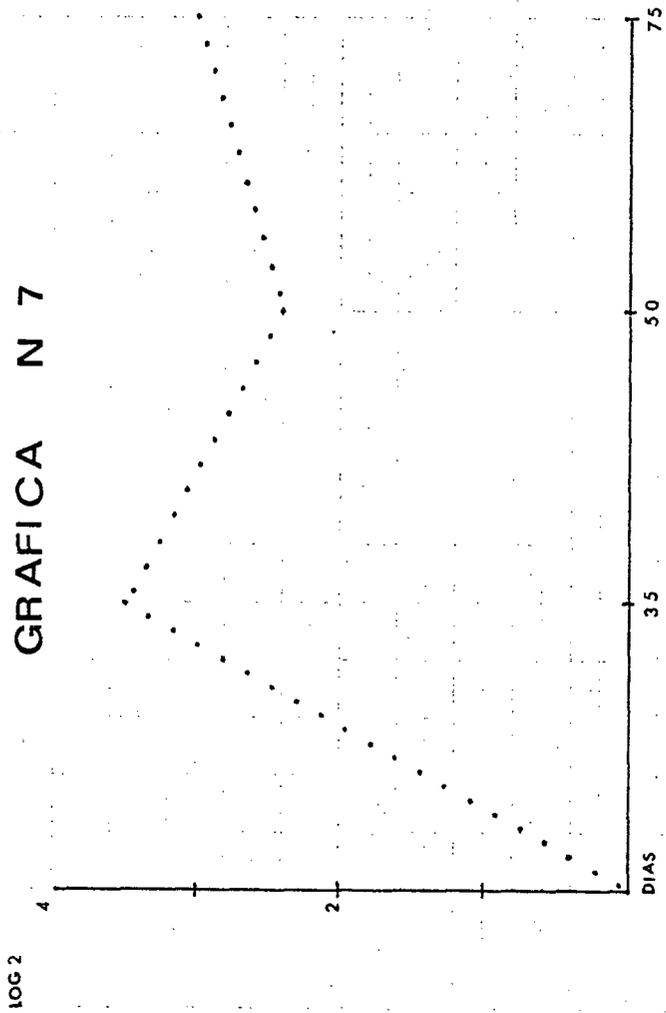
VACUNA D

LOG2

GRAFICA N 6

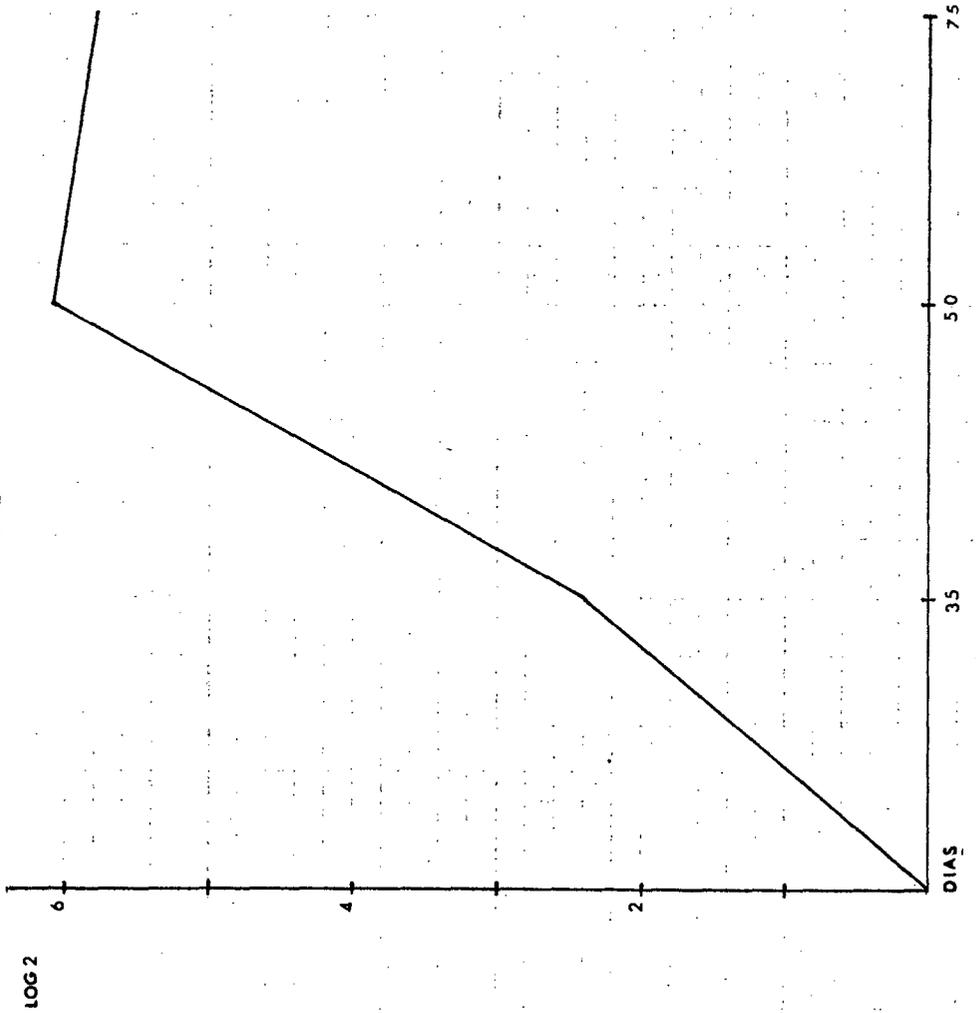


GRAFICA N 7



VACUNA B

GRAFICA N 8



VACUNA A

D I S C U S I O N

De las pruebas físicas previas a la vacunación, se puede determinar que no todas las vacunas emulsionadas comerciales poseen las mismas características físico-químicas tanto en el tipo de emulsión, estado de agregación y estabilidad a los diferentes rangos de temperatura probados.

Lo cual indica definitivamente que cada Laboratorio tiene una formulación propia que difiere en algunos casos ligeramente, pero la diferencia más significativa encontrada es en lo que se refiere a la vacuna "B", la cual es un tipo diferente de emulsión (Aceite en Agua) al resto de las vacunas.

Respecto a las diferencias a los títulos en la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI) que mostraron las aves como resultado a la vacunación, ésta es debida también posiblemente a su elaboración, ya que es conocido que las vacunas emulsionadas responden en el ave de acuerdo a varios factores:

- a) Tipo de emulsión.- Siendo mejores para estimular la formación de anticuerpos las formulaciones del tipo Agua en Aceite, por producir en el ave un efecto más duradero por el depósito en el sitio de inyección.
- b) Las proporciones entre las fases.- Si bien las formulaciones hechas con proporciones 50/50 se muestran ideales en estabilidad, no es igual su comportamiento en el ave por su alta biodisponibilidad dentro del organismo.
- c) Cantidad de antígeno contenido en la dosis vacunal.- Este factor es tal vez el más importante ya que múltiples referencias mencionan que existe una marcada correlación entre la cantidad y persistencia de antígeno por

dosis y la magnitud de la respuesta inmune. Obviamente este valor no fue medido ya que para esto se requeriría haber efectuado pruebas de dosis protectoras 50% sobre-ave para cada vacuna y correlacionarlo con las curvas de inmunidad obtenidas en este trabajo.

Por los resultados obtenidos en las pruebas de HI, puede verse que:

La Vacuna "A", si bien tarda más tiempo en obtener los niveles mínimos de inmunidad asociados a protección --- ($\text{Log}^2 5$) a los 50 días de edad supera este nivel y se mantiene hasta los 75 días fecha en que se dió por concluida la prueba. Esto es importante dado que confiere una mayor protección a las aves durante el tiempo que mayor costo representa al avicultor.

Las Vacunas "A" y "D" mostraron un más rápido despegue en la inmunidad pero no alcanzaron superar en mucho el nivel asociado a la protección.

La Vacuna "B" por su tipo de emulsión demostró una rápida elevación de anticuerpos a los 35 días de edad pero posteriormente declinaron notoriamente.

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

Sintetizando el comportamiento independiente de cada vacuna durante el desarrollo de la prueba, podemos definir que:

- 1) La Vacuna "A", siguió una trayectoria con el ascenso -- más lento pero alcanzó los niveles máximos (6.1 Log^2)-- a 50 días y en la última lectura aún conservaba niveles de protección satisfactorios (5.8 Log^2), superando a los otros 3 grupos.
- 2) La Vacuna "B", alcanzó a los 35 días su máximo nivel de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (3.5 Log^2) siendo éste muy por debajo del límite asociado con resistencia a la infección (5 Log^2). Para luego decrecer.
- 3) La Vacuna "C", fue constante en el incremento del nivel de anticuerpos, alcanzando su máximo nivel en la segunda valoración y manteniéndose al final muy cercano el límite de protección (4.0 Log^2).
- 4) La Vacuna "D", tuvo un ascenso proporcional pero sin -- llegar a los niveles mínimos de protección.

De lo que se puede concluir que bajo las condiciones dadas y con el calendario establecido, la Vacuna "A" -- confirmó mejores niveles de protección a las aves, las diferencias en comportamiento de las vacunas es probablemente -- debido a la formulación de cada Laboratorio comercial.

Se sugiere un trabajo posterior de pruebas de Laboratorio para determinar la D.P.P. 50% para cada vacuna y correlacionar éstos con las curvas de inmunidad y su relación

con el grado de protección a la exposición con una cepa velogénica de la Enfermedad de Newcastle.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Allan, W.H. et al.
"A Standard Hemoagglutination Inhibition Test for Newcastle Disease.- A comparison of Macro and Micro Methods".
Veterinary Record - 1974

- 2.- Arteaga Ramos, A.S.
"Correlación entre el título de anticuerpos inhibidores de la hemoagglutinación pasivos y activos, título de la vacuna y resistencia contra la Enfermedad de Newcastle".
Tesis UNAM - 1976

- 3.- Bankowski, R.A. et al.
"Nature of Immunity to Newcastle Disease in vaccinated chickens.- Influence of residual resistance upon the level and duration of immunity following revaccination"
Avian Disease - 1962

- 4.- Bausone Valle R.
"Valor inmunológico de 4 vacunas comerciales contra la Enfermedad de Newcastle".
Tesis UNAM - 1962

5.- Becerra Díaz A.

"Valoración de la Inmunidad usando diferentes programas de vacunación para la prevención de la Enfermedad de Newcastle, en pollos para abasto".

Tesis UG - 1978

6.- Cessi D. and Nardelli L.

"Vaccination against Newcastle Disease Virus: Efficacy of an oil emulsion vaccine".

Avian Pathology - 1974

7.- Doll E.R. et al.

"Interpretation of Serologic Procedures for the Diagnosis of Newcastle Disease".

American Journal Veterinary Research - 1950

8.- Estrada Correa R.

"Estudio comparativo de la Micro y Macro Técnicas de la Prueba de la Inhibición de la Aglutinación con los Mixovirus de la Influenza Equina y la Enfermedad de Newcastle".

Tesis UNAM - 1968

9.- Gutiérrez Martínez C.

"Contribución al estudio de incidencia de Mycoplasma Gallisepticum en vacunas comerciales contra la Enfermedad de Newcastle".

Tesis UNAM - 1965

- 10.- Herbert, W.J.
"Immunologia Veterinaria"
Acricbia - 1972

- 11.- Hierholzer, J.C. and M.T. Suggs
"Standarized viral hemagglutination and hemagglutina -
tion-inhibition test. I. Standarization of erythrocyte
suspensions. II. Description and Statistical Evalua --
tion".
Applied Microbiology - 1969

- 12.- Katz D. and Kohn A.
"Antibodies in blood and secretions of chickens inmu -
nized parenterally and locally with Killed Newcastle -
Disease Vaccine",
Dev. Biol. Stand. - 1976

- 13.- Levy R. y Col.
"Immunization of chickens with an inactivated oil-adju
vant Newcastle Disease virus vaccine".
Avian Disease - 1973

- 14.- Lombardi, D.
"Contributo allo studio ed applicazione degli adjuvan -
ti oleosi".
Riv. Ist. Sioreter Italy - 1966

- 15.- Lozano, D.B; Romo G.L.; Lozano, D.J.:
"Evaluación serológica de dos sistemas de vacunación -
contra la Enfermedad de Newcastle en pollo de engorda"
1.- Sistema de virus vivo versus sistema simultáneo.
- 16.- Morán Durán, P.
"Efectos producidos por 2 cepas vacunales del virus de
la Enfermedad de Newcastle sobre la Enfermedad Respira
toria Crónica".
Tesis UNAM - 1973
- 17.- "Methods for the Examination of Poultry Biologics and
for Identifying and Quantifying Avian Pathogens".
National Academy of Sciences.- National Research Coun
cil, Washington, D.C. - 1971.
New castle.- IV. Immunology.- Hemagglutination, Hema
gglutination-Inhibition, Beta procedure.
- 18.- Quaglia, G.; Lombardi, D. and Ecanchini, A.
"The immune response of the chicken to vaccination ---
against Newcastle disease with live virus and killed -
emulsified virus in relation to the length of time bet
ween two vaccinations".
Folia Vet. Lat. 7:158-164 - (1977)

19.- Rumsey Reed, Dr.

"Cellular and Humoral immunity for the protection ---
against Newcastle Disease Virus in laying hens".

IV Congreso Latinoamericano de Avicultura, Venezuela.
1975

20.- Téllez Girón A.

"Experiencias con la Vacuna de Newcastle inactivada y-
emulsionada".

Avicultura Técnica Nº 83 - 1968

21.- Téllez Girón A.

"Vacuna Emulsionada contra la Enfermedad de Newcastle"
Symposium de las Enfermedades Respiratorias de las ---
Aves - 1964

Centro Nal. Inv. Pecuarias y Esc. Nal. Med. Vet. UNAM.

22.- Téllez Girón A.; Parada A.J.; Lozano D.B.

"Vías de Aplicación y Métodos de Vacunación contra la-
Enfermedad de Newcastle".

CECAFOA - 1982.

23.- Téllez Girón A. y Parada A.J.

"Comunicación Personal".

24.- Tizard Ian R.

"Inmunología Veterinaria"
Interamericana - 1979.

25.- Vega Martínez A.

"Estudio comparativo de varios Programas de Vacunación
contra la Enfermedad de Newcastle".

Tesis Q.F.B. - 1975

26.- Winterfield, R.W. and Hitchner, S.B.

"Revaccination of chickens against Newcastle disease by
vent, wing-web and intramuscular routes"

Avian Disease - 1961

27.- Zantinga, J.W.

"Duration of H.I. titres after injection of oil based -
inactivated Newcastle Disease Vaccine".

XV World's Poultry Congress

New Orleans - 1974