

# EVALUACIÓN DE DOS PLANES DE VACUNACIÓN CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN POLLOS DE ENGORDE DE LA LÍNEA ROSS CRIADOS BAJO CONDICIONES DE CAMPO EN EL ESTADO ZULIA, VENEZUELA.

## 2. Respuesta Inmune y Protección ante un Desafío Experimental

Evaluation of Two Vaccination Programs against Newcastle Disease in Ross Line Broiler Chickens Reared under Field Conditions in Zulia State, Venezuela.

### 2. Immune Response and Protection against an experimental Challenge

*Francisco Perozo<sup>1</sup>, Jesús Nava<sup>2</sup>, Sergio Rivera<sup>1</sup>, Oswaldo Vale Echeto<sup>1</sup>, Darwin Arrieta<sup>2</sup> y Yaneth Mavárez<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Profesor Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. <sup>2</sup>Médico Veterinario. <sup>3</sup>Estudiante de Medicina Veterinaria. Apartado 15252, Maracaibo, 4005-A, estado Zulia, Venezuela. E-mail: frankperozo1@latinmail.com*

#### RESUMEN

Bajo condiciones de campo en el estado Zulia, se probó el efecto de dos planes de vacunación contra la enfermedad de Newcastle (ENC). Se usaron 3 grupos de 200 pollos Ross de un día de edad. El primer día se evaluaron serológica e histopatológicamente 20 pollos provenientes del lote a ser utilizado para determinar la calidad inicial y los anticuerpos maternos (AM) contra ENC. Los tratamientos aplicados fueron: T1 Control sin vacunación contra ENC; T2 Hitchner B1B1 por aspersión; T3 cepa enterotrópica (VG/GA) por aspersión + Oleosa subcutánea al día 1, ambos con refuerzos al día 7 y 14 con cepa La Sota en spray y agua respectivamente. En 16 aves de cada tratamiento se estudiaron semanalmente los anticuerpos posvacunales contra ENC a través de Inhibición de la Hemaglutinación (HI), la respuesta al desafío (día 37) con una cepa velogénica viscerotrópica de ENC (RD) y el grado de alteración histopatológica en las aves (GL). La data se analizó a través de ANOVA y LS means del paquete estadístico SAS. Los AM promediaron una media geométrica del título (MGT) de 120, no se observaron lesiones histopatológicas previas al ensayo. Para el T1, T2 y T3 los resultados promediaron una MGT de 7,5/ 10,7/ 13,5. En la variable GL no hubo diferencias entre tratamientos, sin embargo se observaron lesiones compatibles con Marek, Gumboro y Micotoxicosis; La RD fue 0%, 60% y 90% de protección respectivamente. La respuesta sero-

lógica a las primeras vacunaciones fue inhibida probablemente debido a los altos AM, mientras que la respuesta inmune primaria fue inducida por la tercera vacunación y afectada por las condiciones de campo. La respuesta inmune humoral y la resistencia al desafío fueron mayores en el T3. Se concluye que bajo condiciones de campo se debe utilizar el plan de vacunación correspondiente al T3.

**Palabras clave:** Enfermedad de Newcastle, planes de vacunación, respuesta inmune, pollos de engorde.

#### ABSTRACT

The effects of two vaccination programs against Newcastle disease (ND) were studied under field conditions in Zulia state. Three groups of 200 one-day-old Ross strain broiler chicks were used. At day one 20 chicks from the lot to be used in the assay were serological and histopathological evaluated in order to determine initial conditions and maternal antibodies titers (MAT). The treatments applied were: T1 Control with no vaccination against ND; T2 Hitchner spray B1B1 at day 1; T3 enterotropic spray (VG/GA) plus subcutaneous oleosa at day 1, both groups (2 and 3) were revaccinated at day 7 and day 14 with the La Sota strain by spray and water respectively. Weekly, in 16 birds from each group were evaluated for postvaccination antibody titers against ND, Haemagglutination inhibition (HI). The degree of histopathological lesions (DL) was studied, as well as recording the response to a Velogenic Viscerotropic strain challenge (RC) (day 37). Data was analyzed using ANOVA and Ls means

of SAS. MAT averaged a geometric mean titer (GMT) of 120 throughout the vaccination period; no histopathological lesions were observed previous to the assay; T1, T2 and T3 averaged GMT: 7.5 / 10.7 / 13.5 respectively; and no differences were observed for GL between treatments, however histopathological evidences of Marek disease, Gumboro and Micotoxins were founded. In relation to RC: 0% / 60% and 90% protection levels were observed. The serological response to first vaccinations was masked probably by the high MAT; the primary immune response induced by the third vaccination was impaired due to field conditions. Humoral immune response and resistance to challenge were higher in T3. Due to its protective capability under local field conditions, the T3 vaccination program is recommended for use.

**Key words:** Newcastle disease, vaccination programs, immune response, broiler chicks.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle (ENC) es una enfermedad que afecta grandemente la industria avícola, al extremo de constituirse en la preocupación principal de las explotaciones avícolas en países en vías de desarrollo [3, 11, 12, 32]. Durante el año 2002 se registró en el estado Zulia, Venezuela, un brote de ENC, donde se demostró la presencia de un virus de alta patogenicidad (velogénico viscerotrópico) [12]. Para enfrentar la contingencia se propuso la sustitución del plan de vacunación contra ENC que venía utilizándose en las explotaciones comerciales de la zona, el cual consistía en aplicar en incubadora una dosis de virus vivo de baja patogenicidad (B1B1) por aspersión, para luego aplicar a nivel de campo cepa La Sota a los 7 días en el agua de bebida y refuerzo de la vacunación al día 14 con cepa La Sota en el agua. Este se cambió por la vacunación a nivel de la incubadora con una vacuna oleosa (virus inactivado) subcutánea a nivel del cuello más una vacuna a virus vivo de replicación entérica (VG/GA) por aspersión, seguido el día 7 de un refuerzo con virus vivo de Newcastle cepa La Sota (aerosol) que se repite el día 14 a través del agua de bebida [12].

La actividad viral persiste por largo tiempo en las zonas afectadas, por lo que las medidas de emergencia que se tomen durante el brote, deben ser evaluadas para determinar la pertinencia de las mismas a lo largo del tiempo [22]. Las evaluaciones individuales de las cepas vacunales utilizadas en el presente ensayo, han sido realizadas principalmente en aves libres de anticuerpos contra ENC y bajo condiciones de laboratorio [2, 5, 6, 9, 13, 16, 21, 28]. Las condiciones ambientales, de manejo y la genética del ave condicionan las variables utilizadas para clasificar la inmunocompetencia de las aves, determinando una gran variabilidad en cuanto a su capacidad de respuesta a los planes de vacunación [30]. Por lo antes expuesto es inadecuado extrapolar los datos y patrones provistos por la literatura, sin tener claro si se repiten bajo condicio-

nes ambientales propias de Venezuela, donde prevalecen altos anticuerpos maternos y la exposición a factores inmunosupresores como micotoxinas, Marek o Gumboro, [8]. El objetivo básico de este ensayo fue medir la respuesta inmune humoral, realizar una evaluación histopatológica y determinar el grado de protección ante un desafío con una cepa velogenica viscerotrópica (cepa Zulia), en aves inmunizadas con dos planes de vacunación contra ENC bajo condiciones de campo, en una zona de alta incidencia para la ENC en el estado Zulia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Zona de estudio

El experimento se llevó a cabo en el Centro Experimental de Producción Animal (CEPA) ubicado en el municipio La Cañada de Urdaneta del estado Zulia, zona clasificada como bosque muy seco tropical [10] con una temperatura promedio de 30°C y una precipitación que oscila entre 250 y 500 mm/año. En la zona, con una densa población avícola se registró un brote de Newcastle durante el año 2002. Se utilizaron tres galpones divididos en dos filas de 4 cubículos de 2 x 1,5 m, separados por un pasillo central de dos metros de ancho, todos los galpones fueron cubiertos con una cama de concha de arroz, cada corral contenía un comedero plástico, tipo tubular y un bebedero de galón para los primeros días, que luego fue sustituido por bebederos tipo Plasson.

### Diseño del Experimento

El diseño corresponde a un experimento completamente aleatorizado, con medidas repetidas semanalmente y tres tratamientos con 8 repeticiones por tratamiento: T1= control, sin vacunación contra ENC; T2= plan A de vacunación contra ENC; T3= plan B de vacunación contra ENC (TABLA I). El 100% de las aves se vacunaron contra la enfermedad de Marek (Herpes virus de pavo) y Bronquitis infecciosa en incubadora, así como contra Gumboro al día 1, 7 y 14. Se asignó de manera aleatoria un galpón con 200 aves por tratamiento. Las unidades experimentales tomadas en cuenta para la recolección y análisis de la data fueron cada uno de los 8 corrales con 25 aves en los que se subdividieron los galpones, para un total de 600 pollitos. Con la finalidad de evaluar el status inmunológico y la calidad inicial de las aves a ser utilizadas en el ensayo se emplearon 20 pollitos de un día de edad, pertenecientes al mismo lote de donde se obtuvieron las aves, 10 fueron necropsiados y 10 sirvieron para determinar los títulos de anticuerpos maternos contra ENC (días 1, 4, 8, 12) y contra Micoplasma (día 1).

### Toma de muestras

El séptimo día se realizó una selección de dos pollos al azar, correspondientes a cada uno de los ocho corrales en los tres galpones, para totalizar 16 aves por tratamiento, lo cual se repitió semanalmente hasta completar las seis semanas del ensayo. Se realizó un sub-muestreo de cuatro aves semanales

**TABLA I**  
**PLANES DE VACUNACIÓN CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE**

Grupos	Nº de aves	Tipo de vacuna	Edad (En días)	Vía de vacunación
T1 (Control)	200	Sin vacuna contra ENC	–	–
T2 (Plan A)	200	Viva B1B1	1	Aspersión
		Viva La sota	7	Aspersión
		Viva La sota	14	En agua
T3 (Plan B)	200	Viva (VGGA)+ Inactivada	1	Aspersión/ SC.
		Viva La sota	7	Aspersión
		Viva La sota	14	En agua

B1B1: Cepa viva Hitchner; VG/GA: Cepa enterotrópica Villegas y Glisson de la Universidad de Georgia. SC: Subcutáneo.

por tratamiento para su evaluación histopatológica. Los días de muestreo las aves fueron pesadas y separadas. Inmediatamente se procedió a tomar muestras de sangre, obtenidas por punción cardíaca, utilizando para tal fin tubos colectores estériles rotulados. Una vez coaguladas las muestras, se obtuvo suero los cuales fueron conservados en refrigeración a 5°C (2 horas) hasta su procesamiento, los títulos de anticuerpos contra ENC se determinaron por inhibición de la hemaglutinación (HI).

### Desafío Experimental

Se seleccionaron 12 aves de 35 días de edad del grupo control y de cada uno de los tratamientos; éstas fueron distribuidas en tres cestas plásticas debidamente diferenciadas, para ser trasladadas hasta el Instituto de Investigaciones Veterinarias en la ciudad de Maracay, estado Aragua (secciones de patología aviar y control de productos). Al día 37 de edad fueron sangradas 10 aves de cada grupo y necropsiadas 2 aves de cada tratamiento para evaluación anatomopatológica. Las muestras de sangre fueron tomadas al nivel de la vena braquial aproximadamente en una cantidad de 3 mL, utilizando viales estériles que se mantuvieron en forma inclinada hasta la retracción del coágulo, y una vez formado, se extrajo el suero para ser centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm y se procedió a inactivarlo a 56°C por 30 minutos; posteriormente fue congelado (-10°C) hasta el momento de realizar la prueba de HI. Todos los grupos fueron desafiados con una cepa velogénica viscerotrópica del virus de ENC, identificada con el protocolo 6184 (cepa Zulia), inoculando una gota (0,03 mL) por vía ocular, con un índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) y un índice de patogenicidad intravenosa (IPIV) de 1,9 y 2,2 respectivamente. La cepa utilizada provenía de un brote de campo y presentó un título de  $10^{8,7}$  DL50/mL. Las aves fueron observadas los 10 días posteriores al desafío, al cuarto día se sacrificaron 2 aves de cada grupo para la toma de muestras (traquea, pulmón, cerebro, timo, bazo, nervio, bursa, proventrículo, tonsilas cecales e intestino) para histopatología y reisolamiento viral.

Las lesiones microscópicas en todos los órganos excepto la bursa de Fabricio se describen en función a los hallazgos en una escala binomial 0= sin lesión; 1= con lesión. Por su parte para la bursa, los grados de lesión fueron trasladados a la escala ordinal de la siguiente forma: Grado 0= normal, Grado 1= folículos aislados con necrosis leve, Grado 2= depleción linfoide moderada y generalizada o folículos aislados con depleción linfoide severa, Grado 3= depleción linfoide severa en más del 50% de los folículos, Grado 4= folículos con escasos linfocitos y con quistes, aumento del tejido conectivo, epitelio engrosado y con pliegues, Grado 5= pérdida total de la estructura folicular y marcada fibroplasia. El reisolamiento viral se realizó a partir de macedrados de traquea utilizando para ello huevos embrionados libres de patógenos según técnica descrita por Villegas [33].

Para evaluar la respuesta a la exposición se consideraron dos parámetros: la morbilidad y mortalidad. En cuanto a la morbilidad se llevó un registro acerca de la aparición de diferentes signos clínicos de la enfermedad, tales como: presencia de moco, aves tristes, alas caídas, incoordinación, plumas erizadas y cabeza hinchada, con el objetivo de evidenciar el porcentaje de aves enfermas durante el periodo de observación. Se realizó un control de mortalidad diaria durante los 10 días post desafío [19].

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados empleando un análisis de la varianza para un diseño completamente aleatorizado con medidas repetidas en el tiempo, a través del procedimiento General Linear Model (GLM) disponible en el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS) [29]. Las comparaciones de las medias de los tratamientos se realizaron a través de la prueba MDS de mínimos cuadrados (LsMeans). Todos los criterios relacionados con significancia fueron basados en una probabilidad de  $P < 0,05$ .

**TABLA II**  
**PROMEDIO SEMANAL DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS CONTRA ENC DETERMINADOS POR INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (HI) EN AVES SOMETIDAS A DOS PLANES DE VACUNACIÓN CONTRA ENC**

Tratamiento	Semana					
	1	2	3	4	5	6
T1	31,7 <sup>a</sup>	11,8 <sup>a</sup>	1,2 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
T2	38,3 <sup>a</sup>	11,3 <sup>a</sup>	1,8 <sup>a</sup>	10,2 <sup>b</sup>	2,0 <sup>b</sup>	1,1 <sup>b</sup>
T3	33,6 <sup>a</sup>	11,7 <sup>a</sup>	1,2 <sup>a</sup>	20,6 <sup>a</sup>	10,0 <sup>a</sup>	3,7 <sup>a</sup>

Los valores en cada caso corresponden a la media de 16 observaciones expresados MGT; T1= Control sin vacuna contra ENC T2= Plan de Vacunación A; T3= Plan de vacunación B. Letras iguales dentro de columnas no difieren significativamente entre si.

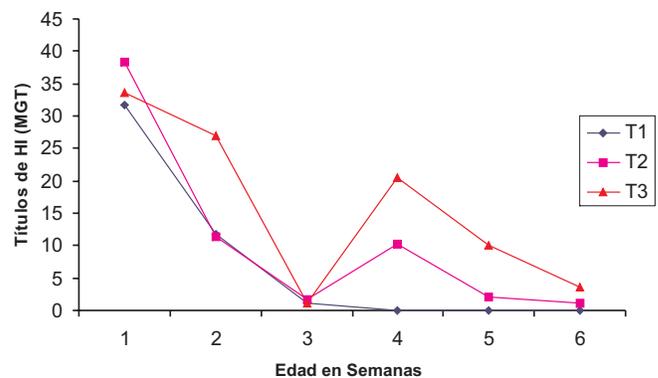
## RESULTADOS

El análisis de los resultados correspondientes a la evaluación por HI de las muestras pertenecientes a 10 aves pre-ensayo, mostró los siguientes títulos de anticuerpos maternos contra ENC: al día 1 una media geométrica del título (MGT) de 89,8; al cuarto día 253,9; al octavo 80, descendiendo a 56,5 el decimosegundo día, periodo que se corresponde con las vacunaciones aplicadas a las aves. La evaluación histopatológica resultó en aves completamente normales, sin lesiones aparentes en ninguno de los órganos evaluados, demostrándose un adecuado estado fisiológico de los pollitos y la presencia de altos títulos de anticuerpos maternos contra la enfermedad al revelarse títulos promedios de 120 MGT durante los primeros 12 días del ensayo.

El promedio global de MGT contra ENC durante el estudio fue mayor ( $P < 0,05$ ) en el T3 (13,5) que el T2 (10,7). Ambos grupos vacunados exhibieron mayores títulos que el grupo control (7,5). En la TABLA II se evidencian las medias, semana por semana de la MGT para cada uno de los tratamientos (16 aves x tratamiento x semana). Durante las primeras tres semanas no hay diferencia significativa entre tratamientos. A partir de la cuarta semana, todos los grupos difirieron entre si ( $P < 0,05$ ) siendo mayor el título exhibido por el grupo T3. En la FIG. 1 se representan los valores de MGT observados semana por semana.

La bursa de Fabricio evidenció el mayor porcentaje de daño tisular de los órganos linfoides. La aparición de las lesiones en la bursa se concentró en las últimas dos semanas del estudio, en consecuencia se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las semanas, sin embargo, no existieron diferencias entre tratamientos. La distribución porcentual de los grados de lesión indica que aproximadamente el 30% de las lesiones de todos los grupos, corresponden a bursas con daños serios, las lesiones son compatibles con un estado de inmunosupresión, relacionado probablemente con la presencia de la enfermedad de Gumboro de 5 a 8 días de evolución.

Tanto en el intestino delgado como en el grueso, se observaron alteraciones histopatológicas que corresponden a enteritis viral inespecífica tipo Reovirus y cambios morfológicos degenerativos inducidos por micotoxinas, comunes para los



**FIGURA 1. MEDIA GEOMÉTRICA SEMANAL DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS CONTRA ENC EN AVES SOMETIDAS A DOS PLANES DE VACUNACIÓN CONTRA ENC.**

tres grupos, pues todos presentaron porcentajes de alteración superiores al 20%. Por su parte en el Sistema Nervioso Central (SNC) el grado de lesión no difiere de forma significativa entre tratamientos, Sin embargo, dio pie a otros hallazgos consistentes: Encefalitis linfocítica, aguda, focal viral y Gliosis focal leve, las cuales al acompañarse del estudio del nervio ciático correspondiente donde se apreciaron focos de infiltración por linfocitos, constituyen lesiones compatibles con la enfermedad de Marek.

La morbilidad y mortalidad inducida por la exposición de los diferentes grupos a una cepa velogénica viscerotrópica de ENC y la media geométrica de los títulos de anticuerpos (HI) pre y post-desafío son mostrados en la TABLA III. Al desafío, el T1 presentó una morbilidad y mortalidad del 100%. El T2 evidenció morbilidad del 60% y mortalidad de 40%. En el T3 el porcentaje de morbilidad y mortalidad fue del 10%. A los 10 días postdesafío se observó seroconversión, los animales sobrevivientes del T2, pasaron de un MGT de 1,9 a 130, mientras el T3 pasó de 18 a 260.

En la TABLA IV se aprecia la gradación de las alteraciones histopatológicas en timo, bazo, bursa, traquea-pulmón, intestino, proventrículo-molleja, sistema nervioso central, previo al desafío y cuatro días posteriores al mismo.

**TABLA III**  
**MORBILIDAD Y MORTALIDAD RELACIONADA CON LA MEDIA GEOMÉTRICA DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS (HI) PRE Y POSAT DESAFÍO, CON UNA CEPA VELOGÉNICA VISCEROTRÓPICA DE ENC**

TRAT	TMG pre desafío	TMG 10 días post desafío	Morbilidad	%	Mortalidad	%
Control	0	0	10 / 10	100	10 / 10	100
T1	1,9	130	6 / 10	60	4 / 10	40
T2	18	260	1 / 10	10	1 / 10	10

T1= Plan de Vacunación A; T2= Plan de vacunación B. TMG= Media geométrica del título de anticuerpos contra ENC medidos a través de inhibición de la hemoaglutinación (HI); Predesafío: Cada observación corresponde al promedio de 10 aves; Post desafío: Cada observación corresponde con el promedio de las aves sobrevivientes.

**TABLA IV**  
**ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS <sup>1-2</sup> PRE Y POST DESAFÍO EN TIMO, BAZO, BURSA, TRAQUEA-PULMÓN, INTESTINO, PROVENTRÍCULO-MOLLEJA, SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

Trat	Día	Timo	Bazo	Bursa	Traq -pul	Intestino	Proven-molle	SNC
T1	(0) pre desafío	0	0	3	0	1	1	0
	(4) postdesafío	1	1	3	1	1	1	0
T2	(0) pre desafío	0	1	3	0	0	1	0
	(4) postdesafío	1	1	4	1	1	1	0
T3	(0) pre desafío	0	0	2	0	1	0	0
	(4) postdesafío	0	0	3	0	0	0	0

1. Cada observación corresponde al promedio de los hallazgos en dos aves de cada grupo y día.

2. Grados de lesión: El score de lesiones para la bursa de Fabricio se rige por el siguiente baremo: Grado 0= normal Grado 1= folículos aislados con necrosis leve, Grado 2= depleción linfóide moderada o folículos aislados con depleción linfóide severa. Grado 3= depleción linfóide severa en más del 50% de los folículos severa. Grado 4= folículos con escasos linfocitos y con quistes, aumento del tejido conectivo, epitelio engrosado y con pliegues. Grado 5= pérdida total de la estructura folicular y marcada fibroplasia. Para el resto de los órganos se estableció una distribución binomial: Grado 0= sin lesión. Grado 1= con lesión.

La distribución de la frecuencia de aparición de lesiones en los distintos tratamientos, difiere en función a la capacidad de protección de los planes de vacunación. Los órganos dañados por el desafío en el T1: timo, bazo, bursa, traquea-pulmón, intestino, proventrículo-molleja son los mismos afectados en el T2, indicando que en estos grupos, la patogenia y distribución del virus siguió un mismo curso. Por su parte en el T3, ninguno de los órganos afectados en los otros tratamientos mostró lesiones.

## DISCUSIÓN

Las evaluaciones de programas de vacunación contra ENC, realizadas en otras latitudes constituyen el banco de datos existente sobre el tópic, sin embargo, éstas han sido realizadas utilizando animales libres de anticuerpos específicos contra la enfermedad y bajo condiciones de laboratorio [5, 13, 14, 21, 23]. En este orden de ideas, Bell y col. [6] reportaron diferencias significativas en la respuesta inmune de aves vacunadas contra ENC criadas a campo o en el laboratorio. Las condiciones de campo que prevalecen en las explotaciones comerciales del estado Zulia, comprometen la respuesta inmune a las vacunaciones contra ENC, debido a la

presencia de altos títulos de anticuerpos maternos y la exposición a factores inmunosupresores como Gumboro, Marek, y Micotoxinas [4, 12, 22]. Los títulos de anticuerpos maternos contra ENC exhibidos por las aves del ensayo al momento de las vacunaciones, se consideran altos según lo reportado por varios autores [4, 24] quienes observaron que aves con medias geométricas de anticuerpos maternos elevadas comprometen su respuesta serológica a la vacunación. Por su parte, Eidson y col. [9] clasificaron como muy altos, títulos al día 1 por encima de 84 MGT, las aves del presente estudio promediaron 80 MGT al día de edad.

Cuando se presenta en la cantidad y calidad adecuada, la inmunidad pasiva es capaz de dar protección al ave contra desafíos de campo durante la primera semana de vida [7, 23], estos anticuerpos de origen materno son capaces de interceptar tanto virus de campo como virus vacunales. Se infiere que con altos títulos de anticuerpos maternos inducirán una interferencia en la instauración de la respuesta inmune primaria a las vacunaciones [23, 27]. En su ensayo, Hofacre y col. [16] reportaron que en presencia de altos títulos de anticuerpos maternos se recomienda la utilización de vacunas con altos títulos, para garantizar una mejor colonización y replicación del

virus vacunal. Por su parte, Ahmad y Sharma [1] señalaron que incluso en vacunaciones in-ovo la presencia de anticuerpos maternos ameritaba un incremento de los títulos de virus en la vacuna. Por esto, el monitorear los anticuerpos maternos y hacer seguimiento de los planes de vacunación de los padres para determinar la resistencia natural que será ofrecida por la progenie, es una recomendación muy útil para diseñar los planes de vacunación [9, 15].

El catabolismo normal de los anticuerpos maternos determina que para la tercera semana los títulos de anticuerpos alcancen niveles basales. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Morgan y col. [23], Andrade y col. [4] y Bennejean y col. [7] quienes reportaron un promedio de entre 13 y 21 días de duración para los anticuerpos maternos. En el ensayo, los altos niveles de anticuerpos maternos interfieren con la instauración de una respuesta inmune primaria, lo que se evidencia en el descenso de los títulos de anticuerpos contra ENC hasta la tercera semana, a pesar de las vacunaciones aplicadas. La caída de la curva es común tanto para el control como para los tratamientos, sin embargo, durante la segunda semana los títulos del T2 descienden en un 78% mientras que en el T3 desciende solo un 18%. Esta diferencia pudiera estar asociada a la cepa utilizada en los tratamientos, ya que ha sido reportado que las cepas viscerotrópicas, como la VG/GA utilizada en el T3 son menos afectadas por la inmunidad materna que las neumotrópicas [5, 34].

La respuesta serológica de las últimas tres semanas del ensayo se corresponde con el formato de respuesta inmune primaria, descrito por Janeway [17] según el cual los grupos T2 y T3 respondieron a la vacunación realizada el día 14 (cepa La Sota en agua) con un incremento en los títulos de anticuerpos en suero a la cuarta semana. La diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos, a favor del T3 pudiera explicarse por la sumatoria de partículas antigénicas provistas por la vacuna viva aplicada el día 14 y la liberación progresiva de polipéptidos antigénicos de la vacuna oleosa aplicada en la incubadora [16]. Este efecto se hizo evidente solo cuando la disminución de los anticuerpos maternos así lo permitió, pues con el descenso de los maternos disminuye la interferencia con la instauración de los virus vacunales (prendimiento) [9, 14, 23, 27, 34].

Otro factor relevante que explica el comportamiento de la curva de anticuerpos observada, es la existencia de desafíos de campo de enfermedades inmunosupresoras, cuya presencia se comprobó a través de la evaluación histopatológica, donde hallazgos compatibles con las enfermedades de Marek, Gumboro, y Micotoxicosis, impidiendo que se instaure el 100% de protección comúnmente reportado para las cepas vacunales evaluadas [9, 23, 27]. El éxito de la implementación de una combinación de vacuna oleosa y a virus vivo, observado en este ensayo, concuerda con lo reportado por varios autores: Alba y col [2]; Foltse y col. [13]; Samina y col. [28] comparando diversos planes de vacunación, concluyeron que tanto los títulos de anticuerpos espe-

cíficos contra la enfermedad, como el grado de protección conferido por la combinación viva-oleosa fueron los más altos.

La implementación de un desafío experimental utilizando cepas patógenas con la finalidad de evaluar la capacidad de protección de las vacunas es un procedimiento ampliamente utilizado [2, 4, 5, 6, 7, 9, 13, 14, 21, 23, 24, 26, 28, 33, 34]. Para el momento del desafío, los títulos de anticuerpos en el T3 fueron bajos y considerados no protectivos, al compararse con los reportados [21, 24, 28], sin embargo, se verificó una protección equivalente al 90% en este grupo. Los niveles de anticuerpos del T1 y del T2 con un MGT  $< 2$  denotan un comprometimiento de la respuesta inmunológica contra ENC de estos grupos, que se refleja en el 100 y 40% de mortalidad al desafío respectivamente. Los resultados para el T1 concuerdan con todos los reportes en los cuales se realizó un desafío, no así el alto porcentaje de mortalidad del T2 (aves con 3 dosis tempranas de vacunas vivas) que difiere de lo reportado por Bell y col. [6] y Andrade y col., [4] quienes reportaron 100% de protección al desafío en aves vacunadas con cepa Hitchner B1B1 y La Sota. Estas diferencias probablemente se expliquen por la presencia de factores inmunosupresores que determinan una pobre respuesta a la vacunación. Un 90% de protección y apenas un 10% de morbilidad en las aves pertenecientes al T3 indican un mejor desempeño de las cepas vacunales enterotrópicas y un efecto positivo de la oleosa utilizada. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura [2, 5, 26, 28].

Los niveles de anticuerpos presentes al momento del desafío no fueron representativos de una inmunidad sistémica adecuada, a pesar de ello, las aves vacunadas respondieron evidentemente mejor al desafío que el grupo control no vacunado, esto se explica con que el comprometimiento de la respuesta inmune humoral periférica, no descarta la estimulación de anticuerpos locales (IgA) y una respuesta inmune celular satisfactoria [18, 20, 22, 25]. La seroconversión observada en las aves sobrevivientes al desafío, corrobora que la vacuna aplicada al día 14 fue lo que despertó en las aves una respuesta inmune primaria, siendo el desafío del día 37, el equivalente a una segunda estimulación antigénica específica, que hizo ascender los títulos de 1,9 y 18 hasta 130 y 260 para el T2 y T3 respectivamente [17].

A la evaluación anatomopatológica posterior al desafío el T1 y el T2 respondieron idénticamente, acusando alteraciones histopatológicas en todos los órganos estudiados, exceptuando el sistema nervioso central. El T3 no se observaron lesiones indicativas de ENC aún después del desafío, esto concuerda con el planteamiento de Alba y col. [2], Beard y col. [5] y de Van Eck y Goren, [31] sobre la pertinencia de la utilización de cepas enterotrópicas, las cuales estimulan la inmunidad local a nivel de traquea e intestino impidiendo la replicación viral y estimulando la inmunidad celular en todo el organismo, con lo cual se explica la ausencia de lesiones posteriores al desafío.

## CONCLUSIONES

1. Las condiciones de campo en el estado Zulia, Venezuela incluyen la presencia de altos títulos de anticuerpos maternales contra ENC y exposición a enfermedades inmunosupresoras como Marek, Gumboro y Micotoxinas, estos factores afectan la respuesta inmune a los planes de vacunación.
2. Los títulos de anticuerpos generados por el plan de vacunación correspondiente al T3 son significativamente mayores debido a la sumatoria de la estimulación antigénica de la oleosa y de las vacunas vivas aplicadas.
3. Previo al desafío, la histopatología de los órganos estudiados no fue afectada por los tratamientos o sus interacciones. Independientemente del grupo, se observaron alteraciones relativas a las enfermedades de Marek, Gumboro y lesiones compatibles con micotoxicosis.
4. El 90% de supervivencia al desafío experimental con una cepa altamente patógena y la ausencia de alteraciones histopatológicas en las aves perteneciente al T3 versus un 60% de protección y lesiones características de ENC en las aves pertenecientes al T2, permite establecer la idoneidad de la combinación enterotrópica-oleosa en la estimulación de la respuesta inmune en zonas de alta incidencia para ENC.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda la utilización del plan de vacunación correspondiente al T3 en zonas de alta incidencia para ENC o con presencia de factores inmunosupresores reconocidos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AHMAD, J.; SHARMA, J. Evaluation of a Modified- Live Virus Vaccine Administered in Ovo to Protect Chickens against Newcastle Disease. **Am. J. Vet. Res.** 53 (11): 1999- 2004. 1992.
- [2] ALBA, M.; ICOCHEA, E.; SILVA, A.; VIDAL, O. Protección vacunal viva- oleosa en pollos Broilers contra una cepa velogenica viscerotropa del virus de la enfermedad de Newcastle. **Memorias del XIV Congreso latinoamericano de avicultura.** Lima 18 al 22 de Septiembre. Perú. 45-46 pp. 1999.
- [3] ALEXANDER, D. Newcastle disease. **British Poult Sci.** 42: 5-22. 2001.
- [4] ANDRADE, L.; FERNANDEZ, R.; RIVERA, S. Evaluación de diferentes métodos de vacunación contra la enfermedad de Newcastle en pollos de engorde en el estado Zulia, Venezuela. **Congreso Latinoamericano de Avicultura.** Acapulco, 26- 30 Abril, Mexico. 36-44 pp. 1986.
- [5] BEARD, C.; VILLEGAS, P.; GLISSON, R. Comparative Efficacy of the B-1 and VG/GA Vaccine Strains against Velogenic Viscerotropic Newcastle Disease Virus in Chickens. **Avian Dis.** 37: 222-225. 1993.
- [6] BELL, I.; NICHOLLS, P.; NORMAN, C.; COOPER, K.; CROSS, G. The Serological Responses of Chickens to Mass Vaccination with a Live V4 Newcastle Disease Virus Vaccine in the Field and the Laboratory. **Meat chickens. Aust. Vet. J.** 68 (3): 85- 9. 1991.
- [7] BENNEJEAN, G.; GUITTET, M.; PICAULT, J.; BOUQUET, J.; DEVAUX, B.; GAUDRY, D.; MOREAU, Y. Vaccination of One Day- Old Chicks against Newcastle Disease using Inactivated Oil Adjuvant Vaccine and/or Live Vaccine. **Avian Pathol.** 7: 15- 27. 1978.
- [8] CARABAÑO, J. Efecto de Tres Niveles (100, 200 y 300 ppb) de Aflatoxina B<sub>1</sub> sobre los Pollos de Engorde Durante la Etapa de Iniciación (0 a 4 semanas). FCV. UCV. **(Trabajo de ascenso)** 183 pp. 1999.
- [9] EIDSON, C.; THAYER, S.; VILLEGAS, P.; KLEVEN, S. Vaccination of Broiler Chickens from Breeders Folks Immunized with Live or Inactivated oil Emulsion Newcastle Disease Vaccine. **Poult. Sci.** 61(8):1621-9. 1982.
- [10] EWEL, J.; MADRIZ, A.; TOSI, Y. **Zonas de Vida de Venezuela.** MAC- FONAIAP. 2<sup>da</sup> Ed. Caracas. 266 pp. 1968.
- [11] FERNÁNDEZ, R. La enfermedad de Newcastle. Consecuencias y Repercusión Económica **Memorias del Curso de Actualización en Patología Aviar.** Maracaibo, 12 Marzo. Venezuela. 55-59 pp. 2000.
- [12] FERNANDEZ, R.; SOL, J.; RAMÍREZ, A. La enfermedad de Newcastle, Control y Experiencias de campo. **Memorias del I Seminario de Patología Aviar.** Maracaibo 20 y 21 de Octubre. Venezuela. 25 -28 pp. 2002.
- [13] FOLITSE, R.; HALVORSON, D.; SIVANANDAN, V. Efficacy of Combined Killed-in-Oil Emulsion and Live Newcastle Disease Vaccines in Chickens. **Avian-Dis.** 42 (1): 173-178. 1998.
- [14] GIAMBRONE, J. Laboratory Evaluation of Newcastle Disease Vaccination Programs for Broiler Chickens. **Avia. Dis.** 29(2): 479-487. 1984.
- [15] GIAMBRONE, J.; CLOSSER, J. Efficacy of live vaccines against serologic subtype of infections bursal diseases virus. **Avian Dis.** 34: 7-11. 1990.

- [16] HOFACRE, C.; VILLEGAS, P.; PAGE, R. Newcastle Disease Vaccination of Broilers with high and low-titered commercial vaccines. **Avian Dis.** 30:(3) 623-627. 1980.
- [17] JANEWAY, C. The Immune System. In: **Health and Diseases in Immunobiology**. By Elseivor Science Ltd/ Crand Publishing. 4<sup>th</sup> Ed. 363-366 pp. 1999.
- [18] JAYAWARDANE, G.; SPRADBROW, P. Cell-Mediated Immunity in Chickens Vaccinated with the V4 Strain of Newcastle Disease Virus. **Vete. Microbiol.** 46(1-3): 37-41. 1995.
- [19] JUSTACARA, I. Evaluación de la Protección Conferida por la Vacuna contra Newcastle Cepa La Sota en Pollos de Engorde, Utilizando Tres Programas. FCV. UCV. (**Tesis de Grado**) 79 pp. 2002.
- [20] KIRUBAHARAN, J.; ALBERT, A. Inactivated Vaccines against Newcastle Disease. 3. Cell Mediated Immune Response. **Indian-Vet-J** 79(4): 320-323. 2002.
- [21] KING, D. A Comparison of the Onset of Protection Induced by Newcastle Disease Virus Strain B1 and Fowl Poxvirus Recombinant Newcastle Disease Vaccine to a Viscerotropic Velogenic Newcastle Disease Virus Challenge. **Avian Dis.** 43: 745-755. 1999.
- [22] MONTIEL, E. Enfermedades Respiratorias de las Aves. **Memorias del I Seminario Zuliano de Patología Aviar**. Maracaibo, Venezuela, 20 -21 de Octubre. 29 -32 pp. 2002.
- [23] MORGAN, R.; GELB, J.; POPE, C.; SONDERMEIJER, P. Efficacy in Chickens of a Herpesvirus of Turkeys Recombinant Vaccine Containing the Fusion Gene of Newcastle Disease Virus: Onset of Protection and Effect of Maternal Antibodies. **Avian Dis.** Oct- Dec; 37 (4): 1032-40. 1993.
- [24] PARTADIREDDA, M.; EIDSON, C.; KLEVEN, S. A Comparison of Immune Response to Different Methods of Vaccination against Newcastle Disease. **Avian Dis.** 23 (3): 622- 33. 1979.
- [25] REYNOLDS, D.; MARAQA, A. Protective Immunity Against Newcastle Disease: The Role of Cell-Mediated Immunity. **Avian Dis.** 44: 145-154. 2000.
- [26] POLLARD, B. Immune response to simultaneous vaccination of day-old chickens with live and inactivated oil-based Newcastle disease vaccines. **Onderstepost J. Vet Res.** 49 (2):123-5. 2000.
- [27] SAKAGUCHI, M.; NAKAMURA, H.; SONODA, K.; OKAMURA, H. Protection of Chicken with or without Maternal Antibodies against both Marek's and Newcastle Disease by one Time Vaccination with Recombinant Vaccine of Marek's Disease Virus type 1. **Vaccine.** 16 (5): 475- 9. 1998.
- [28] SAMINA, I.; KHINICH, Y.; GUTTER, B.; MICHAEL, A.; PELEG, B. Day-Old Vaccination With Live-In-Oil Vaccines: Newcastle Disease (ND) and Infectious Bursal Disease (IBD) in Chicks and in Turkey Poults. **Avian Pathol.** 28 (1): 73-78. 1999.
- [29] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS) User Guide. **SAS**® Cary N.C. USA Version 2,02. 1986.
- [30] STURKIE, P. Body Fluids: Blood. In: **Sturkie's Avian Physiology**. Ed Springer-Verlag. New York. 102-120 pp. 1986.
- [31] VAN ECK, J.; GOREN, E. An Ulster 2C Strain derived Newcastle Disease Vaccine: Vaccinal Reaction in comparison with other lentogenic Newcastle Disease Vaccines. **Avian Pathol.** 20: 497-507. 1991.
- [32] VILLEGAS, P. Viral Diseases of the Respiratory System. **Poultry Scien.** 77: 1143- 45. 1998.
- [33] VILLEGAS, P. Avian Virus Diseases Laboratory Manual. The University of Georgia. 30-54 pp. 1995.
- [34] WETSBURY, H.; PARSONS, G.; ALLAN, W. Comparison of the Immunogenicity of Newcastle Disease Virus Strains V4 Hitchener B1B1 and La Sota in Chickens. Test in Chickens with maternal antibody to the virus. **Aust. Vet. J.** 61(1):10-13. 1984.