

ESTUDIO DE LA VACUNACIÓN EXPERIMENTAL EN GALLINA DE GUINEA (*NUMIDA MELEAGRIS*) CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE E INVESTIGACIÓN DEL ESTADO DEL PORTADOR DE VIRUS

**F.S. Lima¹, A.C. Paulillo^{1*}, L. Doretto Junior², N.M.S.Q. Gama³, M. Nishizawa¹,
D.M. Alfaro¹, E. Santin⁴, J.M. Campioni¹, R.P. Shocken-Iturrino¹**

¹Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Departamento de Patologia Veterinária, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/nº, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

RESÚMEN

El trabajo tuvo como objetivo estudiar la importancia de la vacunación contra la enfermedad de Newcastle en pintadas (*Numida meleagris galeata*), como también investigar el estado de portador del virus en esta especie. Fueron usadas 300 gallina de guinea, distribuidas, aleatoriamente, en 5 grupos vacunados o no. A las 5 y 12 semanas, todos los grupos fueron desafiados con una suspensión de virus patogénico (NVD), $EID_{50} = 10^{8.15}/0,1$ mL. Para aislamiento viral, realizado en huevos embrionados LPE, después de 5, 10, 15, 20 y 30 días (5 colectas) para el grupo testigo y 15 días (colecta única) después de cada desafío para los demás grupos, fueron usados hisopados de cloaca. Las gallina de guinea de todos los grupos no demostraron síntomas de la enfermedad de Newcastle. Las gallina de guinea entonces se mostraron refractarias a la enfermedad clínica con el NVD. En las gallina de guinea del grupo testigo, el aislamiento viral se obtuvo de 5 hasta 30 días después de cada desafío. Quedó demostrado así el estado de portador de NVD de la gallina de guinea. En las pintadas de los grupos vacunados, el aislamiento viral fue nulo. Quedó demostrado también así la importancia de la vacunación en la supresión del estado de portador del NVD de la gallina de guinea.

PALABRAS CLAVES: Gallina de guinea, *Numida meleagris galeata*, vacunación, enfermedad de Newcastle, estado de portador del virus.

RESUMO

ESTUDO DA VACINAÇÃO EXPERIMENTAL EM GALINHAS D'ANGOLA (*NUMIDA MELEAGRIS GALEATA*) CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE E INVESTIGAÇÃO DO ESTADO DE PORTADOR DE VÍRUS. O trabalho teve como objetivo estudar a importância da vacinação contra a doença de Newcastle em galinhas d'angola (*Numida meleagris galeata*), bem como investigar o estado de portador de vírus nesta espécie. Foram utilizadas 300 galinhas d'angola, distribuídas, aleatoriamente, em 5 grupos vacinados ou não. As 5 e 12 semanas todos os grupos foram desafiados com uma suspensão de vírus patogênico (NVD), $EID_{50} = 10^{8.15}/0,1$ mL. Para isolamento viral, realizado em ovos embrionados de galinhas livres de patógenos específicos (SPF), depois de 5, 10, 15, 20 e 30 dias (5 colheitas) para o grupo controle e 15 dias (colheita única) depois de cada desafio para os demais grupos, foram colhidos suabes de cloaca. As galinhas d'angola de todos os grupos não demonstraram sinais da doença de Newcastle. As galinhas d'angola então se mostraram refratárias à doença clínica com o NVD. Nas galinhas d'angola do grupo controle, o isolamento viral se obteve de 5 até 30 dias depois de cada desafio. Ficou demonstrado assim o estado de portador de NVD das galinhas d'angola. Nas galinhas d'angola dos grupos vacinados, o isolamento viral foi nulo, demonstrando-se assim a importância da vacinação na supressão do estado de portador de NVD em galinhas d'angola.

PALAVRAS-CHAVE: Galinhas d'angola, *Numida meleagris galeata*, vacinação, doença de Newcastle, estado de portador de vírus.

²Laboratório de Referência Animal, Campinas, SP, Brasil.

³Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos, Bastos, SP, Brasil.

⁴Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

*Pesquisador do CNPq.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle permanece como principal virosis de la avicultura y es altamente infecciosa, afectando aves domésticas y silvestres. La vacunación de rutina y sacrificio combinado con la cuarentena han ayudado a controlar la muy virulenta enfermedad causada por el NVD, clasificado como un *Parainfluenzavirus aviario tipo 1*. La enfermedad de Newcastle ha sido, y es hasta ahora, la principal barrera sanitaria para el libre comercio de aves y sus productos entre los países en todo el mundo (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTES, 1996). Actualmente, la enfermedad tiene una distribución mundial con un amplio rango de hospederos en que 27 de las 50 órdenes de aves han sido reportadas como infectadas por su agente etiológico (KALETA & BELDAUF, 1988). En este contexto, se inserta la especie *Numida meleagris galeata*, popularmente conocida como pintadas, cuya crianza comercial, visando el mercado de carne de elevado valor nutritivo, viene desarrollándose en Brasil, especialmente en la región Nordeste del país. Esto es probable debido al potencial de retorno económico. Estos animales son fácilmente adaptables al cautiverio, con elevado potencial zootécnico; no obstante, hasta el presente, no se han realizado trabajos en relación al control sanitario para su preservación en confinamiento. De este modo, la crianza intensiva de estas aves, sus movimientos y el aumento de la concentración de los planteles podrá sobretodo favorecer la diseminación del NVD. Por esta razón, fue proyectada esta investigación con el objetivo de estudiar la importancia de la vacunación en esta especie contra la enfermedad de Newcastle, como también investigar el estado de portador de las pintadas del NVD.

MATERIAL Y MÉTODOS

Instalaciones, aves experimentales, manejo y nutrición

La parte de campo fue realizada en la unidad experimental avícola y las pruebas de laboratorio en el Departamento de Patología Veterinaria de la Facultad de Ciências Agrarias y Veterinarias de la Universidad Estadual Paulista, sediada en el Campus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil y en el Laboratório de Referência Animal - LARA, Campinas, São Paulo, Brasil.

Fueron utilizadas 300 pintadas con un día de edad, distribuidas, aleatoriamente, en 5 tratamientos (grupos) de 60 aves cada uno, conforme la Tabla 1. Esos animales fueron vacunados (con excepción de las gallina de guinea del grupo testigo) contra la

enfermedad de Newcastle, durante el período experimental a los 15 días e revacunadas a los 35 y 58 días de edad.

Para la nutrición de las pintadas, se les ofreció ración balanceada compatible con las diferentes fases de su ciclo de vida. De una manera general, las aves fueron sometidas a condiciones similares al manejo usual en avicultura.

Vacunas

Fueron usadas vacunas vivas o inactivadas, conforme el grupo experimental, por la vía ocular o subcutánea, de acuerdo con PAULILLO (1980, 1984 y 1989), PAULILLO *et al.* (1982), PAULILLO *et al.* (1987) y PAULILLO *et al.* (1996). El título de las vacunas fue expresado a través de su dosis infecciosa 50% (DIE₅₀) en embriones de pollos libres de patógenos específicos (LPE).

Las vacunas vivas (liofilizadas) fueron preparadas con las estirpes LaSota y Ulster 2C (EID₅₀ = 10^{7.15}/0,1 mL) y aún B1 (EID₅₀ = 10^{7.35}/0,1 mL). La vacuna oleosa fue preparada con la cepa LaSota (EID₅₀ = 10^{9.50}/mL), inactivada y emulsionada en aceite mineral.

Pruebas de desafío

A las 5 y 12 semanas de vida de los animales, 12 pintadas de cada grupo fueron desafiadas inoculándolas con 200 microlitros de una suspensión del virus patogénico, cepa velogénica viscerotrópica (VENC), con tiempo promedio de muerte del embrión (TPM) y el índice de patogenicidad intracerebral en pollitos de uno día de edad (IPIC), respectivamente, de 48 horas y 1,78 y aún con EID₅₀ = 10^{8.15}/0,1 mL, por la vía oculo-nasal, según PAULILLO (1989) y de acuerdo con lo que recomienda el code of federal regulations. Para el control de la patogenicidad de la estirpe virulenta del NVD fue usado un grupo de aves libres de patógenos específicos. Las aves permanecieron en cámara de aislamiento con presión negativa, aire filtrado, agua y alimento "ad libitum".

Tabla 1 - Distribución de las pintadas en grupos experimentales.

Grupo	Vacunación (15 días)	Vía de administración	Revacunación vía ocular (35 y 58 días)
I	Ulster 2C	Ocular	Ulster 2C
II	B1	Ocular	B1
III	LaSota	Ocular	LaSota
IV	Oleosa	Subcutánea	---
V*	Control	---	---

* Grupo testigo - no vacunado

Aislamiento viral

Para el aislamiento viral (virus patógeno), realizado en huevos embrionados de gallinas LPE, pasados 5, 10, 15, 20 y 30 días (5 colectas) para el grupo testigo (control) y 15 días (colecta única) después de cada desafío para los otros grupos, fueron usados hisopados de cloaca.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los desafíos con el virus velogénico viscerotrópico de la enfermedad de Newcastle, en las pintadas, respectivamente, en las 5 y 12 semanas de edad, se encuentran en la Tabla 2.

Principalmente, en el grupo de las aves libres de patógenos específicos, como se observa en la Tabla 2, 100% de las aves murieron a los desafíos.

Los síntomas clínicos más frecuentes, con inicio 72h después de la inoculación del NVD, fueron caracterizados a principio por depresión, anorexia, plumas erizadas y conjuntivitis, seguidos de estornudos y por estertores húmedos de la tráquea. En la secuencia, fueron observados signos clínicos más severos, como disnea intensa, diarrea profusa y verdosa, corrimiento oculo-nasal abundante y mucoso, terminando con prostración y muerte.

Las alteraciones anatomopatológicas más comunes en el grupo de las aves libres de patógenos específicos (lote control de la patogenicidad del NVD) fueron aquellas de naturaleza hemorrágica.

Trastornos circulatorios fueron los hallazgos dominantes al examen anatomopatológico "post-mortem", siendo el principal cuadro de lesiones de la enfermedad de Newcastle.

Fueron observados procesos hemorrágicos en la mucosa del proventrículo en forma de petequias. También, alteraciones severas de carácter necrótico-hemorrágicas fueron observadas a nivel intestinal y de tonsilas cecales.

Las alteraciones circulatorias en las vías aéreas superiores se caracterizaron por hemorragias entre los anillos traqueales, acompañados de exudado catarral en el lumen.

Otro aspecto son los resultados de los desafíos de las pintadas vacunadas o no contra la enfermedad de Newcastle (Grupos I al V) (Tabla 2). Curiosamente, las pintadas del grupo testigo o control (Grupo V) no evidenciaron síntomas de la enfermedad de Newcastle, mostrándose refractarias a la enfermedad clínica con el VENC.

Desde este punto de vista, la investigación está compatible con los datos de MATHIVANAN *et al.* (2004), pues este autor describe el aislamiento y la caracterización molecular del NVD, confirmando la naturaliza velogénica e los aislados, en pintadas aparentemente normales.

En los lotes de animales vacunados (Grupos I al IV), como se podía esperar, el porcentaje de protección a los desafíos fue elevado, 100% (Tabla 2).

Es importante resaltar, una vez más, que 100% de los pollos de engorde murieron en los desafíos. La observación clínica y la necropsia evidenciaron señales clínicas y lesiones compatibles con la enfermedad de Newcastle (forma velogénica viscerotrópica), lo que demuestra que el virus usado en las pruebas de desafío fue adecuado y refuerza la validez de los resultados obtenidos.

Los resultados del aislamiento de la cepa velogénica viscerotrópica, del NDV, de las pintadas, después de cada desafío, en los diferentes grupos, se encuentran en las Tablas 3 y 4.

En las pintadas del lote testigo (Grupo V) el aislamiento viral de la cloaca fue de 5 hasta 30 días después del desafío confirmando de este modo la susceptibilidad de esta especie al NVD, de acuerdo con CAPUA *et al.* (2002) y MISHRA *et al.* (2000).

A través de estos resultados quedó demostrado que el estado de portador de la pintada del NVD, pasados hasta 30 días de la infección experimental con este patógeno, lo que puede resultar muy importante desde el punto de vista epidemiológico.

Tabla 2 - Resultados de los desafíos con el virus velogénico viscerotrópico de la enfermedad de Newcastle, en pintadas, en las 5 y 12 semanas de edad.

Grupo	Vacunación (15 días)	Vía de administración	Revacunación vía ocular (35 y 58 días)	Nº de aves testadas	% Média de protección total
I	Ulster 2C	Ocular	Ulster 2C	12	100,0
II	B1	Ocular	B1	12	100,0
III	LaSota	Ocular	LaSota	12	100,0
IV	Oleosa	Subcutánea	- - -	12	100,0
V*	Control	- - -	- - -	12	100,0
Aves libres de patógeno específico**				12	0,0

*Grupo testigo - no vacunado

**Control de la patogenicidad del VENC

Tabla 3 - Resultado del aislamiento de la cepa velogénica viscerotrópica, del NVD, de las pintadas, en período post- desafío (5 semanas de edad), según los grupos experimentales.

Grupo	Vacunación (15 días)	Revacunación vía ocular (35 y 58 días)	Aislamiento viral									
			5 DDD		10DDD		15DDD		20 DDD		30DDD	
			T	C	T	C	T	C	T	C	T	C
I	Ulster 2C	Ulster 2C	NR	NR	NR	NR	-	-	-	-	-	-
II	B1	B1	NR	NR	NR	NR	-	-	-	-	-	-
III	LaSota	LaSota	NR	NR	NR	NR	-	-	-	-	-	-
IV	Oleosa	---	NR	NR	NR	NR	-	-	-	-	-	-
V*	Control	---	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

*Grupo testigo – no vacunado

DDD - Días después del desafío realizado a las 5 semanas de vida de las aves experimentales

T = Tráquea

C = Cloaca

NR = No realizado

+ = cepa positiva

- = cepa negativa

Tabla 4 - Resultado del aislamiento de la cepa velogénica viscerotrópica, del NVD, de las pintadas, en período post- desafío (12 semanas de edad), según los grupos experimentales.

Grupo	Vacunación (15 días)	Revacunación vía ocular (35 y 58 días)	Aislamiento viral									
			5 DDD		10DDD		15DDD		20 DDD		30DDD	
			T	C	T	C	T	C	T	C	T	C
I	Ulster 2C	Ulster 2C	NR	NR	NR	NR	-	-	-	-	-	-
II	B1	B1	NR	NR	NR	NR	-	-	-	-	-	-
III	LaSota	LaSota	NR	NR	NR	NR	-	-	-	-	-	-
IV	Oleosa	---	NR	NR	NR	NR	-	-	-	-	-	-
V*	Control	---	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

*Grupo testigo – no vacunado

DDD - Días después del desafío realizado a las 12 semanas de vida de las aves experimentales

T = Tráquea

C = Cloaca

NR = No realizado

+ = cepa positiva

- = cepa negativa

Desafortunadamente, nada se sabe sobre la importancia del estado de portador de la pintada (*Numida meleagris galeata*) del NVD, como fuente de infección o como factor iniciador de epidemias de la enfermedad en poblaciones de pollos de engorde, ponedoras comerciales y otras especies de aves silvestres que convivan en proximidad a su habitat natural o en confinamiento.

Por otro lado, en las pintadas de los grupos vacunados (Grupos I al IV), pasados 15 días después de los desafíos, el aislamiento viral de la cloaca y tráquea fue nulo (Tablas 3 y 4).

El hecho de no haber sido aislado el NVD de pintadas vacunadas (Grupos I al IV), resulta evidente la importancia de la vacunación en esta especie,

pues no habrían posibilidades de replicación del NVD en cantidades suficientes para una infección posterior de otras especies de aves domésticas o silvestres.

Sobre este enfoque, se realiza una vez más, que la amplia cobertura vacunal recibida por las pintadas (*Numida meleagris galeata*) (Grupos I al IV), sin duda alguna, contribuyó efectivamente para evitar el NVD reisolamiento en esta especie animal. En verdad, la institución de programas inmunoprolácticos contra la enfermedad de Newcastle para las pintadas, por lo menos, en este estudio, ha pasado a constituirse, en un, factor muy importante para creaciones de aves domésticas convivientes, enriqueciendo la literatura especializada.

Finalmente, sobre el punto de vista epidemiológico deben ser realizados estudios en pintadas inoculadas experimentalmente con el NVD, para establecer su importancia de estado de portador.

CONCLUSIONES

1. Las pintadas demostraron ser refractarias a la molestia clínica frente a los desafíos con el virus de la enfermedad de Newcastle.
2. Quedó demostrada la condición de portador del NVD de la pintada, pasados hasta 30 días de la infección experimental con este patógeno.
3. Se demostró la importancia de la vacunación en la supresión de estado del portador del NVD, de la pintada.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- CAPUA, I.; DALLA POZZA, M.; MUTINELLI, F.; MARANGON, S.; TERREGINO, C. Newcastle disease outbreaks in Italy during 2000. *Vet. Rec.*, v.150, n.18, p. 565-568, 2002.
- KALETA, E. & BELDAUF, C. Newcastle disease in free-living and pet birds. In: ALEXANDER, D. (Ed.). *Newcastle disease*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988. p.197-246.
- MATHIVANAN, B.; KUMANAN, K.; MAHALINGA NAINAR, A. Characterization of a Newcastle disease virus isolated from apparently normal guinea fowl (*Numida meleagris*). *Vet. Res. Commun.*, v.28, n.2, p.171-177, 2004.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual for animal disease reporting to the OIE*. Paris: World Organization for Animal Health, 1996.
- PAULILLO, A.C. *Doença de Newcastle: estudo experimental da resposta imune às estirpes vacinais B₁ e LaSota*. São Paulo: 1980. 84p. [Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Univ. São Paulo].
- PAULILLO, A.C. *Estudo experimental da resposta imunitária às vacinas inativada (oleosa) e viva (amostra LaSota) contra a doença de Newcastle*. São Paulo: 1984. 129p. [Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Univ. São Paulo].
- PAULILLO, A.C. *Avaliação da resposta imune e da performance zootécnica de poedeiras vacinadas experimentalmente contra a doença de Newcastle*. Jaboticabal: 1989. 116p. [Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Univ. Estadual Paulista, Jaboticabal].
- PAULILLO, A.C.; PINTO, A. ; ARIKI, J. ; BERCHIERI JUNIOR, A. Doença de Newcastle. I. Estudo experimental da resposta imune às estirpes vacinais B₁ e LaSota. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo*, v.19, n.1, p.9-43, 1982.
- PAULILLO, A.C.; MOSTASSIER, H.J.; RICHTZENHAIN, L.J.; NAKAGHI, L.S.L.; BARBOSA, J.C.; CEVINTANA, J.L.; MONTASSIER, H.J.; BERCHIERI JUNIOR, A.; ARIKI, J. Doença de Newcastle. IV. Ensaio experimental de diferentes vias de vacinação com a estirpe lentogênica LaSota em frangos de corte. *Ars Vet.*, v.3, n.1, p.73-79, 1987.
- PAULILLO, A.C. Estudo zootécnico e imunológico de aves de corte submetidas a diferentes programas de vacinação contra a doença de Newcastle. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33., 1996, Fortaleza, CE. *Anais*. Fortaleza: 1996. p.388-390.

Recibido en 25/8/04

Acepto en 25/3/05