

COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE TRES VACUNAS VIVAS ATENUADAS FRENTE A NEWCASTLE EN AVES INFECTADAS CON UN APMV-1 GENOTIPO III (PARAMYXOVIRUS DEL GANSO TIPO 1) EN DOS MOMENTOS DISTINTOS.



H. Fathi¹, J. Rubio¹, A. Mansilla¹
¹Hipra, S.A., 17170, Amer, Girona, Spain.

1 INTRODUCCIÓN

Los distintos métodos de producción aviar existentes entre distintos países, así como la existencia de aves salvajes, sus rutas y y comportamientos naturales, hacen que la enfermedad de Newcastle siga siendo difícil de erradicar y que se siga manteniendo en los niveles de importancia que presenta actualmente, siendo endémica en la mayoría de los países de Asia, Oriente Medio, África, Centro y Sudamérica.

La aparición de nuevos brotes de carácter muy agresivo, están producidos por cepas velogénicas de genotipos distintos a los presentes en las vacunas clásicas actuales.

Estudios independientes como sean los de Woo-Jin Jeon y col., 2008 y García y col., 2013; demuestran la eficacia de la cepa Lasota ante brotes velogénicos de genotipos III, VII y V ocurridos en Korea y Méjico, respectivamente; tanto a nivel de protección y reducción de los síntomas, como a nivel de control de la diseminación del virus.

Es por ello que desde HIPRA se llevó a cabo un estudio con una empresa independiente sudafricana, Avimune, para probar la eficacia de las distintas vacunas existentes en el mercado sudafricano, pertenecientes todas ellas al genotipo II, tras la infección controlada con una cepa de virus de Newcastle perteneciente al genotipo III.

2 OBJETIVO

El principal objetivo de esta prueba es demostrar la eficacia conferida por la vacuna HIPRAVIAR[®]CLON, cuando los animales son infectados con una cepa de un virus de Newcastle perteneciente al genotipo III en una infección temprana y otra tardía.

También se pretende demostrar que HIPRAVIAR[®]CLON confiere una mayor protección frente a la infección que la generada por las demás vacunas probadas en la prueba.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de la prueba se utilizaron 200 pollos comerciales de la estirpe Ross con un día de edad. Todos ellos procedentes del mismo lote de reproductoras y con un alto nivel de anticuerpos maternos.

El pienso utilizado en la prueba era un pienso comercial y; tanto el pienso como el agua, se les administró ad libitum.

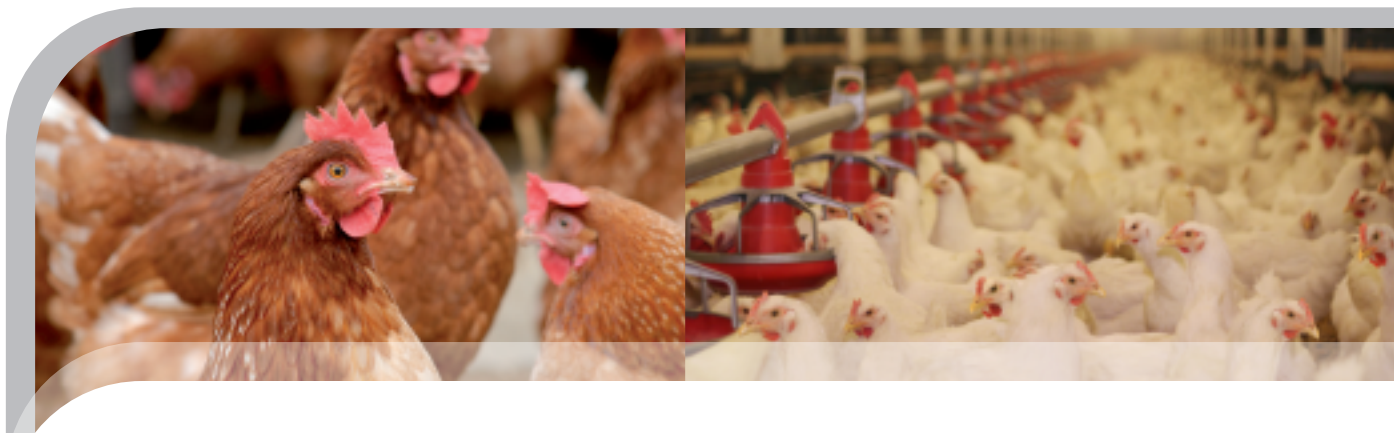
Los pollitos se distribuyeron aleatoriamente en 6 unidades aisladas con filtros de aire de presión positiva.

Para la determinación de los anticuerpos maternos, se sangraron 20 pollitos de un día edad. Los pollitos restantes (180) fueron distribuidos aleatoriamente en los siguientes grupos: GA, GB, GC y GD.

La distribución de los grupos y sus respectivas vacunas la podemos ver en la tabla 1.

GRUPO	Nº ANIMALES	CEPA VACUNAL
A	45 pollos	Grupo Control: Animales no vacunados
B	45 pollos	HIPRAVIAR [®] CLON: Vacuna viva atenuada , CL/79 $\geq 10^{6.5}$ EID ₅₀
C	45 pollos	Vacuna viva atenuada cepa lentogénica VH
D	45 pollos	Vacuna viva atenuada cepa asintomática VG/GA

Tabla 1. Distribución de grupos y vacunas



Diagnóstico por RT-PCR

En cuanto a los resultados de la RT-PCR, durante la infección temprana, las aves del grupo A dieron todos PCR positivo a Newcastle, tanto las aves muertas como las que sobrevivieron y mostraron síntomas clínicos.

Los grupos B, C y D fueron todas las aves que sobrevivieron sin síntomas fueron PCR negativos.

Durante la infección tardía, las aves del grupo A dieron PCR positivo a excepción de 2 aves que sobrevivieron y llegaron hasta el final de la prueba sin síntomas. En el grupo B, vacunados con Hipraviar Clon, todas las aves fueron PCR negativa.

En el grupo C, el ave que murió presentó PCR positiva y el resto de aves supervivientes también fueron PCR positivas a Newcastle.

En las aves del grupo D, el ave que murió resultó ser PCR negativa y el resto de aves superviviente y sin síntomas, también resultaron serlo.

Resultados serológicos

En cuanto a los resultados serológicos, se puede observar la evolución clara de la seroconversión generada por las distintas vacunas utilizadas durante el estudio.

Aves no infectadas

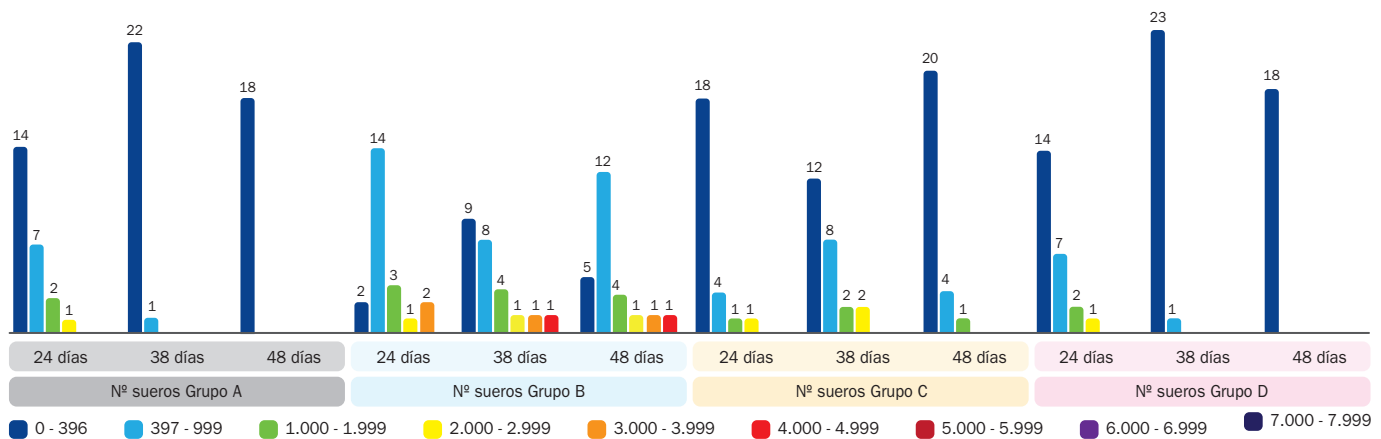


Gráfico 1. Evolución de la seroconversión de todas las vacunas aplicadas durante los distintos días de la prueba.

Tal y como se observa en el gráfico 1, el grupo A o control, presenta una disminución de los anticuerpos maternos, estando estos presentes a 24 días todavía con niveles importantes.

El nivel de anticuerpos maternos presentado por los pollitos de un día de edad, se encontraba entre 6.000 y 16.000 dentro del rango de valores de IDEXX para Newcastle.

También podemos observar que el grupo B es el que mayor seroconversión presenta, dando mayores rangos de títulos que el resto de sueros analizados en los grupos C y D, en los cuales la mayor parte de los títulos se encuentra dentro de los rangos de 0 a 999 de unidades Elisa.

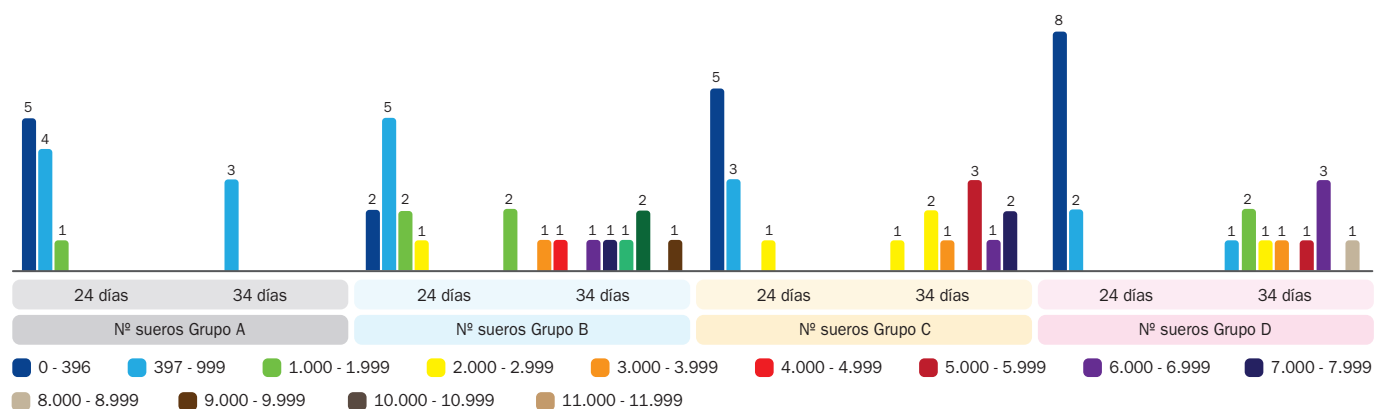
Esta diferencia en la seroconversión entre vacunas, demostró diferencias significativas a los 48 días a favor del grupo B ($p < 0.001$), demostrando una gran seroconversión por parte de la vacuna Hipraviar Clon.

De las 10 aves extraídas por cada grupo y desafiadas con la cepa del virus de Newcastle perteneciente al genotipo III, observamos que a 24 días, antes de ser infectadas, el comportamiento de los sueros es el mismo que el observado en la gráfica 1.

Sin embargo, a los 34 días, 10 días después de ser infectadas, en el grupo A, tan sólo quedan 3 animales vivos y su capacidad de generar anticuerpos frente al virus ha sido muy baja, presentando niveles de 397 – 999 de título. En cambio, en los grupos B, C y D, vacunados a 0 y 10 días con sus respectivas vacunas; las aves a los 34 días han podido desarrollar una respuesta inmunológica frente a la infección, no mostrando mortalidad y sueros que van desde 1.000 a 11.000 unidades ELISA para el grupo B, a niveles algo más bajos para C y D.

Estos niveles de títulos, corroborados conjuntamente con la clínica, demuestran animales protegidos frente al desafío.

Aves infectadas a 24 días



Gráfica 2. Evolución de los títulos de anticuerpos de las aves en un desafío temprano.

El modelo de vacunación aplicado para las distintas vacunas fue mediante gota al ojo (0.03 ml) y la administración de la vacuna depende según sea una infección temprana o tardía.

Para la infección temprana los pollitos fueron vacunados a 0 y 10 días de vida e infectados a los 24 días de vida. Para la infección tardía las aves se vacunaron a 0, 10 y 24 días y se les infectó a los 38 días de edad.

El método llevado a cabo para infectar a las aves fue mediante la inoculación del virus en el saco alantoideo de huevos embrionados SPF de 10 días de edad. De esta forma se replicó el virus y se recogió 48 horas

después manteniéndolo a 4°C.

A continuación se infectaron dos aves SPF con 1 ml de ese líquido alantoideo refrigerado mediante gota al ojo y gota en orificio nasal. Estas dos aves sirvieron de reservorios para dos aves SPF más y mediante el contacto directo con estas 4 aves infectadas, se contagió al resto de animales de los distintos grupos.

Esta misma acción se llevó a cabo para la infección tardía.

En la tabla 2 se presenta el esquema de la prueba.

GRUPOS	INFECCIÓN TEMPRANA (24 días)		GRUPOS	INFECCIÓN TARDÍA (38 días)	
GRUPO A (45 pollos)	Plan Vacunal	Grupo Control No vacunados	GRUPO A (35 pollos)	Plan Vacunal	Control Group. Not vaccinated
	Infección natural	Extracción de 10 pollos (*)		Infección natural	Extracción de 10 pollos (*)
GRUPO B (45 pollos)	Plan Vacunal (Hipraviar® Clon)	0 días 10 días	GRUPO B (35 pollos)	Plan Vacunal	0 días / 10 días 24 días
	Infección natural	Extracción de 10 pollos (*)		Infección natural	Extracción de 10 pollos (*)
GRUPO C (45 pollos)	Plan Vacunal (VH strain)	0 días 10 días	GRUPO C (35 pollos)	Plan Vacunal	0 días / 10 días 24 días
	Infección natural	Extracción de 10 pollos (*)		Infección natural	Extracción de 10 pollos (*)
GRUPO D (45 pollos)	Plan Vacunal (VG/GA strain)	0 días 10 días	GRUPO D (35 pollos)	Plan Vacunal	0 días / 10 días 24 días
	Infección natural	Extracción de 10 pollos (*)		Infección natural	Extracción de 10 pollos (*)
(*) Las aves de los GA, GB, GC y GD se mezclan con 4 aves SPF infectados a modo de hospedadores infectivos naturales.			(**) Las aves de los GA, GB, GC y GD se mezclan con 4 aves SPF infectados a modo de hospedadores infectivos naturales		

Tabla 2: Esquema del diseño de la prueba tanto a nivel de plan vacunal llevado a cabo como de los distintos procesos infectivos y modo en el que se hizo la infección.

Todos los animales infectados fueron observados durante 10 días más una vez llevado a cabo la infección, de manera que las aves de infección temprana se llevaron hasta los 34 días y las de infección tardía hasta los 48 días.

Para los resultados de seroconversión, se sangraron todos aquellos animales que sobrevivieron a la infección y a 24 de los animales no infectados de cada uno de los grupos tanto para la primera parte del estudio

en la infección temprana como para la segunda parte del estudio correspondiente a la infección secundaria.

Los muestreos se realizaron a los 0, 24 y 34 días de edad en la primera parte del estudio y a los 38 y 48 días de edad para la segunda parte del estudio.

4 RESULTADOS

Durante los 10 días consecutivos a la infección, las aves infectadas fueron observadas y analizadas detallándose sus síntomas clínicos y mortalidades.

Síntomas clínicos

Los puntos llevados a cabo para realizar un control de los síntomas fueron la presencia de plumas erizadas, la presencia de parálisis e incoordinación y finalmente, la muerte del ave.

Tras la infección temprana, producida a los 24 días de edad, las aves de los distintos grupos fueron observadas hasta el día 34 de vida y durante estos días, sólo se observan síntomas clínicos a partir del día 30 de vida en el grupo A o grupo control.

En el grupo A, formado por animales sin vacunar, se observaron 7 muertes producidas en el siguiente orden: A día 30 de vida, 1 ave muerta. A los 31 días, 2 aves, a los 33 días otro ave muerta y, finalmente, a 34 días, murieron 3 aves más.

En cuanto a los síntomas clínicos, 2 aves del mismo grupo mostraron parálisis e incoordinación a los 33 días de vida.

Respecto a los grupos B, C y D no se mostraron ni más síntomas ni mortalidades durante esta primera infección.

Respecto a los síntomas clínicos y mortalidades mostradas durante el

modelo de infección tardía, se observó que en el grupo A o control, 3 aves mostraron plumas erizadas a los 43 días de vida y 2 aves más mostraron los mismos síntomas a los 47 días. Respecto a las mortalidades, 3 aves murieron a los 44 días y una de ellas acompañada de ascitis. Tres aves más a los 45 días y dos aves más a los 48, obteniendo un total de 8 aves muertas durante el periodo de observación tras la infección tardía a 38 días. Para el grupo B, referido a las aves vacunadas con Hipraviar® Clon, fue el único grupo sin mortalidades ni síntomas.

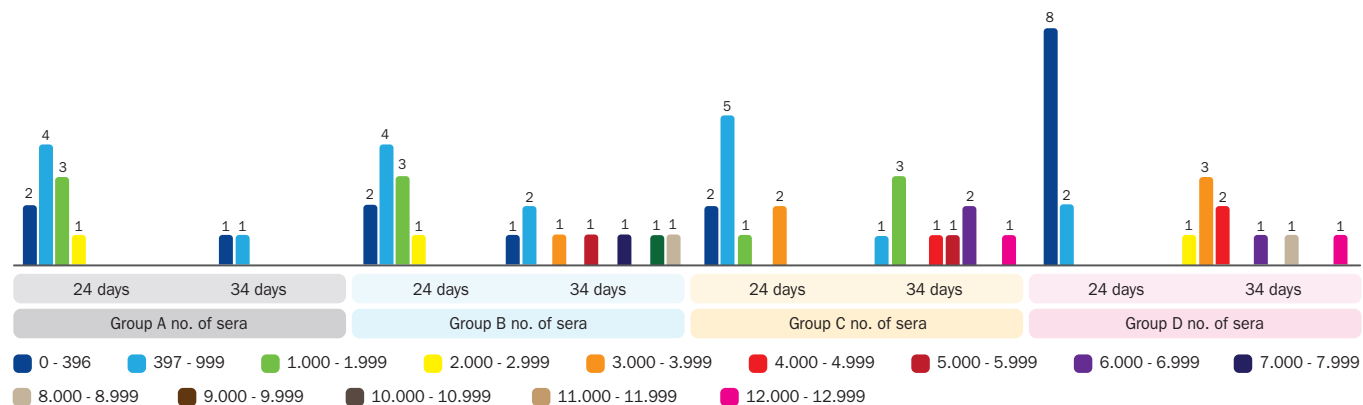
Tanto el grupo C como el grupo D mostraron 1 ave muerta cada uno a los 44 y 41 días respectivamente. El ave muerta del grupo C mostró signos claros de enfermedad y ascitis y el ave muerta del grupo D mostró ascitis.

Para poder comparar los resultados referentes a mortalidad, se llevó a cabo el test de Fisher.

De dicho análisis se extrajo que durante el periodo de infección temprana, el grupo A presentó una diferencia significativa ($p < 0.003$) frente al resto de grupos y no existió tal diferencia entre los grupos B, C y D.

En cuanto a la infección tardía, se observó que entre el grupo A y el grupo B se presentó una diferencia significativa ($p = 0.001$) y también entre el grupo A, C y D ($p = 0.002$). No se presentó diferencias estadísticas entre los grupos B, C y D.

Aves infectadas a 38 días



Gráfica 3. Evolución de los títulos de anticuerpos en las aves en un desafío tardío.

En la infección tardía se separaron 10 aves de cada uno de los grupos y se las infectó mediante el método anteriormente detallado.

A los 38 días, justo antes del desafío, se analizaron los sueros y luego 10 días después de ser infectados.

Lo que se observó en el grupo A, fue que sólo 2 aves fueron capaces de superar el desafío y las que sobrevivieron presentaron síntomas clínicos de enfermedad.

El grupo B, es el único grupo que no demostró mortalidad y tampoco síntomas clínicos. En la evolución de los sueros, se observó sueros muy altos, de niveles de 12.000 - 12.999 unidades ELISA (IDEXX) debidos al

contacto con el virus y esto se puede corroborar comprobando los títulos desarrollados por los animales del grupo B no desafiados (Gráfica 1), donde vemos que la evolución de los títulos no es superior a 5.000 unidades ELISA. En el grupo C se observó 1 muerte debida a Newcastle. El resto de animales sobrevivieron al desafío sin mostrar síntomas pero siendo positivos a PCR. La evolución de sus títulos, debido a la cepa de desafío, también son más altos, presentando también aves de 12.000 unidades ELISA.

En el grupo D, al igual que en el resto de aves, los títulos se ven aumentados a niveles también próximos a 12.000 unidades ELISA. Se presentó una muerte pero resultó no ser debida al virus, ya que fue PCR negativa.

5 CONCLUSIONES

Ante los resultados obtenidos durante la prueba realizada, se puede concluir que todas las vacunas utilizadas durante la misma, son capaces de generar protección frente a una cepa de un genotipo distinto al genotipo vacunal.

En esta situación en concreto, todas las vacunas testadas generaron protección frente al genotipo III de Newcastle, aunque la seroconversión y protección en la clínica de las aves del estudio, se demostró ser mejor para

el GB (Hipraviar Clon), presentando mayor seroconversión que el resto de grupos a igualdad de aplicación y manejabilidad

De modo que se puede afirmar que la aplicación de vacunas clásicas de Newcastle, entre ellas Hipraviar Clon, genera protección frente a distintas cepas virulentas de Newcastle pertenecientes a otros genotipos.

