

SONIA ARMONIA MONTENEGRO HEREDIA

ESTUDO DE VACINAS LENTOGÊNICAS (B₁ E LA SOTA) CONTRA A
DOENÇA DE NEWCASTLE, COMERCIALIZADAS NO BRASIL. CARAC-
TERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS VIRAIS E AVALIAÇÃO DE QUALIDADE
DAS VACINAS

Tese apresentada à Escola de Vete-
rinária da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito par-
cial para obtenção do grau de Mes-
tre em Medicina Veterinária
(Área de Medicina Veterinária
Preventiva)

Belo Horizonte
1977

Tese aprovada em: 06 / 06 / 1977.

Banca Examinadora:

Romero R.

Stuardo

Moira

- RONALDO REIS: Professor Adjunto da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - ORIENTADOR.
- EGLADSON JOÃO CAMPOS: Professor Adjunto da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.
- AMAURY APOLÔNIO DE OLIVEIRA: Médico Veterinário da EMBRAPA.
- ÉLVIO CARLOS MOREIRA: Professor Assistente da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.
- EUNICE FARIA LOPES: Bibliotecária.

Índice

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
1. Vacinas	27
2. Ovos embrionados	27
3. Vírus de desafio	27
4. Aves experimentais	27
5. Caracterização das amostras <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	28
6. Caracterização das amostras <i>in vivo</i> . Tempo Médio de Morte (TMM)	28
7. Caracterização das amostras <i>in vitro</i>	30
8. Controles de qualidade	30
9. Testes sorológicos	31
10. Propriedades imunogênicas	33
11. Delineamento experimental	34
4. RESULTADOS	35

	<u>Página</u>
1. Caracterização das amostras <i>in vivo</i>	36
2. Caracterização das amostras <i>in vitro</i>	37
3. Controles de qualidade	37
4. Testes sorológicos	38
5. Propriedades imunogênicas	39
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	64
7. RESUMO	68
8. SUMMARY	71
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. Introdução

A doença de Newcastle tem sido considerada como o problema sanitário mais importante na indústria avícola brasileira desde o aparecimento do primeiro surto em Macapá, território do Amapá, em 1953 (SANTOS et alii, 1954).

Nos últimos anos o vírus tem se apresentado sob uma forma altamente patogênica, não somente para as aves domésticas, como também para outras espécies silvestres e migratórias. Esta nova forma, conhecida como Newcastle viscerotrópica, é causada por amostras de vírus velogênico que se diferenciam das amostras responsáveis pelas formas clássicas, pela sua elevada virulência e contagiosidade, embora apresentem composição antigênica idênticas (ERRADICATE, 1971; ALLAN et alii, 1973; HANSON, 1974; ALLAN, 1975).

O aparecimento desta forma mais virulenta da doença de Newcastle, em países de avicultura intensiva, tem determinado um contínuo incremento nas medidas de controle da doença através de vacinação, higiene e iso-

lamento visando, respectivamente, reduzir a excreção de vírus infectante, diminuir a quantidade de vírus viável e limitar as possibilidades de disseminação do vírus (DAWSON, 1973; ALLAN, 1973).

De 103 países que apresentam a doença, 85 deles têm adotado a vacinação como o principal procedimento de controle. (LANCASTER, 1962).

De um modo geral, a vacinação sistemática das galinhas dentro de programas adequados constitui-se, ainda, a mais regular e eficiente medida de controle da doença, desde que empregadas vacinas que preencham as exigências de potência, estabilidade, pureza e inocuidade (LANCASTER, 1964; ALLAN et alii, 1973).

Um aspecto de suma importância na indução da resposta imune, se relaciona à seleção e padronização de sementes virais geneticamente puras, sem contaminação e suficientemente imunogênicas, para serem empregadas na produção de vacinas (LANCASTER, 1964; ALLAN et alii, 1973).

O emprego das vacinas vivas do tipo lentogênico está amplamente difundido na maioria dos países de avicultura desenvolvida, justificado pelas seguintes propriedades: capacidade de estabelecer uma "infecção" do trato respiratório, capacidade de produzir uma grande massa antigênica em um curto período de tempo, boa ati-

vidade antigênica e poder de disseminação (ALLAN et alii, 1973; HANSON, 1974; ALLAN, 1974).

As amostras virais selecionadas como antígenos podem ser avaliadas comparando sua multiplicidade, amplitude e duração da resposta imune, empregando testes imunológicos e sorológicos (HANSON, 1974). A respeito dos métodos e critérios adotados para avaliar a imunidade conferida pelas vacinas contra a doença de Newcastle, eles são variáveis já que são diversos os fatores que influem no poder protetor das mesmas: fatores derivados da qualidade do produto, da natureza da doença, do meio ambiente e das próprias aves (HOFSTAD, 1954; JOHNSON et alii, 1954; BANKOWSKI & CORSTVET, 1962; MENASSE, 1973).

De um modo geral, não existe um estudo mais apurado para avaliar as propriedades imunogênicas e padronização das amostras utilizadas pelos principais laboratórios produtores de vacina, no Brasil, onde são empregadas exclusivamente as amostras La Sota e B₁, ambas lentogênicas. Deste modo, este experimento foi realizado visando o estudo das seguintes características:

- 1) tipificação das amostras empregadas nas vacinas produzidas por diferentes laboratórios comerciais;

- 2) estudo de qualidade das vacinas comerciais nos aspectos de pureza, inocuidade, título mínimo por dose e estabilidade térmica;
- 3) determinação da porcentagem de proteção conferida pelas vacinas ao desafio com vírus virulento;
- 4) determinação quantitativa dos níveis de anticorpos inibidores da hemaglutinação (IH) e soroneutralizantes induzidos pelas vacinas;
- 5) estudo da possível interferência dos anticorpos maternos sobre o desenvolvimento da imunidade vacinal;
- 6) determinar a relação existente entre título vacinal por dose e a resposta imune.

Histórico

BEAUDETTE (1949) fazendo um histórico sobre a evolução das vacinas aviárias, descreveu que as primeiras vacinas contra a doença de Newcastle foram desenvolvidas na década de trinta, utilizando vírus virulento inativado. No mesmo período, começaram os primeiros estudos para a atenuação ou modificação do vírus virulento, visando a elaboração de vacinas a vírus vivo. O mesmo autor informou, também, que os melhores resultados com as vacinas inativadas foram obtidos por BEACH (1942) e BRANDLY (1946) que empregaram antígeno inativado pelo formol, de título mínimo $10^{7,0}$ DIE₅₀/ml e adjuvantes para aumentar a duração da imunidade. Conseguiram resultados variáveis entre 60-80% de proteção. Os principais problemas das vacinas inativadas eram a resposta irregular frente ao estímulo antigênico e a duração variável da imunidade. Mencionou, igualmente, que HITCHNER & JOHNSON (1948) conseguiram isolar uma amostra viral de

baixa virulência, para efeitos de imunização de galinhas. Esta amostra era completamente apatogênica para aves de todas as idades, inclusive pintos de um dia.

BEAUDETTE et alii (1949) referindo-se ao desenvolvimento das vacinas a vírus vivo, informaram que este tipo de vacina determinava uma imunidade mais estável e duradoura. As vacinas vivas eram, basicamente, dos seguintes tipos:

1) Vírus virulento

- 1.1) Introduzido através de uma via não natural
- 1.2) Atenuado por: armazenamento, cultura de tecidos, dessecação e diluição

2) Vírus modificado

- 2.1) Passagem seriada em ovos embrionados de galinha e pato
- 2.2) Passagem seriada em animais: aves (exceto galinha) e mamíferos (hamster, ovelha)

A maior dificuldade com as vacinas vivas era conseguir uma adequada atenuação ou modificação do vírus vivo virulento, já que o emprego dessas vacinas vivas determinava forte reação pós-vacinal.

HITCHNER (1950); ASPLIN (1952) e, posteriormente WINTERFIELD et alii (1957), obtiveram o maior sucesso em seus trabalhos para a obtenção de vacinas vivas ao conseguirem isolar amostras de baixa virulência e fácil atenuação, denominadas B₁ Hitchner e amostra "F" e amostras naturalmente apatogênicas, de origem vacinal, denominada amostra La Sota.

Dentro de um tempo relativamente curto, após seu aparecimento, as amostras B₁ e La Sota, ambas do tipo lentogênico, começaram a ser usadas extensivamente em diferentes partes do mundo, na fabricação de vacinas comerciais (CHANGING, 1970; MALIK & DHAWEDKAR, 1970; NEWCASTLE, 1971a, b; ALLAN & DAWSON, 1973).

Identificação das amostras do vírus da doença de Newcastle

HANSON & BRANDLY (1955) estudaram a identificação das amostras virais, estabelecendo cinco testes: Dose Letal₅₀ (DL₅₀) para embriões de 10 dias de incubação, Tempo Médio de Morte (TMM) da Dose Letal Mínima (DLM), Índice de Patogenicidade Intracerebral (IPIC), estabilidade da infectividade a pH 3 e estabilidade térmica da hemaglutinina.

PIRAINO (1960) estabeleceu um método *in vitro*

para a identificação das amostras virais, baseado na propriedade das células cerebrais de embrião de pinto, de adsorver a atividade hemaglutinante das amostras virais.

HANSON et alii (1967) observaram que as amostras lentogênicas poderiam ser diferenciadas mediante os seguintes testes: aglutinação de eritrócitos de equino, adsorção da hemaglutinina mediante suspensão de células cerebrais e destruição da infectividade a pH 3.

HIRST & RUSSELL (1971) estudaram um método para detectar presença de vírus de baixa virulência como contaminante das vacinas, através de uma reação de inibição de hemaglutinação (IH) com anti-soros específicos.

MARTONE et alii (1973) analisaram 12 diferentes testes para a diferenciação de amostras de vírus Newcastle, atenuadas e virulentas. Estabeleceram como os mais eficientes, os seguintes: Dose Letal₅₀ para embriões, em associação com o Tempo Médio de Morte, Índice de Patogenicidade Intracerebral em pintos de um dia, Índice de Patogenicidade Intravenoso (IPIV) em frangos e termostabilidade a 56°C da hemaglutinina.

LOMNICZI (1975) informou que a termoestabilidade de amostras de vírus Newcastle de diferente virulên-

cia, nos aspectos de infectividade viral e hemaglutinação, é um marcador genético da maior utilidade na identificação das amostras lentogênicas.

Diferentes técnicas de produção de vacinas lentogênicas

SINHA (1958) observou uma redução significativa, de várias horas, na morte dos embriões inoculados com seis diferentes amostras vacinais, quando incubadas a 99°F em comparação com 95°F.

LARSKI (1968) estudando os métodos empregados na fabricação das vacinas, observou que a amostra La Sota em líquido alantóico de embriões, atingiu o pico de multiplicação viral 24 horas após à inoculação, mantendo o título sem mudanças qualitativas, por 90 horas, embora existissem vantagens teóricas e práticas na colheita do vírus para a produção de vacina nos primeiros períodos do pico.

AL-HILLY et alii (1970) observaram que após a clarificação da suspensão vacinal da amostra B₁, através de filtro Seitz tipo EK, houve marcada redução do conteúdo viral, da capacidade hemaglutinante e do poder protectivo da vacina.

AHMED et alii (1971) estabeleceram que a adi-

ção do leite desnatado, como estabilizante do vírus vacinal, aumentou consideravelmente sua resistência à centrifugação e liofilização, prolongando e melhorando a conservação da vacina.

LARSKI & WISNIEWSKI (1972a) observaram que após 20 passagens da amostra La Sota, em embrião ou fibroblasto de pinto, em presença de soro normal de galinha, ocorriam modificações da amostra viral nos aspectos de termostabilidade e virulência.

LARSKI & WISNIEWSKI (1972b) informaram que a amostra La Sota não apresentou mudanças qualitativas nem alterações na sua imunogenicidade, após 12 passagens seriadas em embrião de pinto, quando o vírus vacinal era coletado 24 horas pós-inoculação.

NEDELICIN et alii (1973) observaram que o leite desidratado e a lactose protegiam adequadamente o vírus vacinal contra o choque térmico da liofilização. Indicaram também que o hidróxido de alumínio diminuiu a resistência do vírus vacinal à liofilização.

TODOROVA (1973) concluiu que um bom estabilizante para a amostra La Sota, durante o processo de liofilização, foi um meio contendo 50% de soro eqüino e 5% de peptona. Obteve adequada conservação da infectividade

viral, durante dois anos a 4°C.

CHOLAKOVA (1976) determinou que a melhor idade para a inoculação dos embriões foi aos 11 dias de incubação. Observou também que a esterilidade da suspensão viral foi melhorada incorporando penicilina, kanamicina e oleandomicina. Finalmente, informou que a rotação dos ovos em um ângulo de 150° cada duas horas, aumentava os títulos da suspensão viral coletada ao terceiro dia após a inoculação.

Efeito da imunidade passiva e da via de administração, na eficácia das vacinas lentogênicas

DOLL et alii (1950) trabalhando com vacinas a vírus vivo, observaram que o grau de imunização pós-vacinal esteve determinado pela quantidade de anticorpos transferidos através da gema, pela idade das aves no momento da vacinação e pela virulência da amostra vacinal.

HITCHNER et alii (1951) e BORNSTEIN et alii (1952a, b), observaram que pintos provenientes de galinhas imunizadas com vacina B₁, não possuíam suficiente imunidade passiva como para interferir com o desenvolvimento da imunidade ativa, quando a vacinação era feita pela via nasal.

BEAUDETTE & BIVINS(1953) e MARKHAM et alii(1954) demonstraram que a imunidade passiva neutralizou o vírus vacinal da amostra B₁ pela via intramuscular. Entretanto, esse efeito supressor foi menor quando a vacina foi aplicada pela via nasal. Observaram ainda que a neutralização do vírus vacinal dependeu da quantidade dos anticorpos passivos, os quais persistiram até os 32 dias de idade.

BANKOWSKI & ROSENWALD (1956) informaram que a vacinação na água de bebida é o menos satisfatório dos métodos de aplicação das vacinas lentogênicas B₁ e La Sota.

WINTERFIELD & SEADALE (1957a, b) demonstraram que aves vacinadas aos 35 dias de idade com vacina La Sota tiveram uma resposta de anticorpos maior e mais persistente que quando vacinadas aos quatro dias de idade, quando o índice soroneutralizante dos anticorpos passivos foi de 2,1.

LANCASTER (1964) e ALLAN (1969) observaram que durante três a quatro semanas, houve interferência da imunidade passiva dos pintos, na produção de uma boa resposta à vacinação. Indicaram também que com algumas vacinas a vírus vivo, como as produzidas em cultura de tecido, a resposta imune podia ser totalmente inibida pelos anticorpos passivos.

KREIMER et alii (1969) demonstrou que a imunidade passiva em pintos provenientes de galinhas imunizadas, teve uma duração média de 28 dias e afetou a imunidade ativa em pintos vacinados com vacina La Sota durante a primeira semana de vida. Recomendou também a vacinação pela via nasal.

BANKOWSKI (1972) informou que a vacina B₁ conferiu um curto período de proteção (três a cinco semanas) em pintos com imunidade passiva.

LANDGRAF & VIELITZ (1972) informaram que o efeito imunizante da vacina B₁ foi consideravelmente reduzido pelos anticorpos maternos. Entretanto, a vacina La Sota foi capaz de induzir boa imunidade na presença de tais anticorpos.

BITO & SAWAI (1973) informaram que pintos de um dia foram capazes de produzir anticorpos contra a doença de Newcastle, quando o antígeno foi injetado pela via intravenosa. As aves manifestaram memória imunológica com uma semana de vida. Observaram também que a supressão da síntese de anticorpos ativos pelos anticorpos passivos pôde ser parcialmente controlada injetando duas doses vacinais com dois a sete dias de intervalo.

JANSSEN & KALETA (1973) observaram um aumento

significativo nos títulos de anticorpos IH em aves vacinadas com vacina B₁, aos 23 e 33 dias de idade, quando a imunidade congênita era extremamente baixa. Demonstraram ainda que os títulos IH de aves vacinadas declinaram lentamente em comparação com os controles não vacinados.

QUAGLIO et alii (1973) obtiveram os maiores títulos de anticorpos IH e soroneutralizantes quando a vacina La Sota foi aplicada pela via óculo-nasal (ISN=3,75) valores intermediários foram obtidos através de aerosol (ISN=3,55) e títulos mais baixos através de água de bebida (ISN=3,25).

VOLTEU & LAARHOVEN (1975) observaram que a imunidade residual por vacinações prévias, feitas aos cinco e 25 dias de idade, não afetaram o desenvolvimento e persistência dos anticorpos devidos à revacinação na 10a. semana de vida com vacina La Sota.

BALLA et alii (1976) vacinaram pintos portadores de anticorpos passivos com vacina La Sota aplicada através de água de bebida e não obtiveram completa proteção, mesmo após três vacinações feitas aos cinco, 21 e 35 dias de idade.

Efeito do título vacinal na resposta imune

BRANDLY (1946) observou que títulos

virais elevados e uniformes favoreciam a produção de vacinas de máxima atividade imunogênica.

WINTERFIELD & SEADALE (1957a, b) demonstraram que vacinas da amostra B₁ com títulos iguais ou inferiores a $10^{6,0}$ DIE₅₀/dose não induziram imunidade satisfatória quando aplicadas pela água de bebida. Informaram também, que não houve reação pós-vacinal adversa quando aplicada uma dose tão elevada como $2 \times 10^{8,0}$ DIE₅₀/dose.

RAGGI & LEE (1962) observaram que aves vacinadas com amostra B₁ com título vacinal de $10^{7,3}$ DIE₅₀/dose resistiram ao desafio feito pela via intramuscular com 200.000 Dose Letal₅₀ após 16 meses de vacinação.

KEEBLE & WADE (1963) demonstraram que uma só injeção da vacina com $10^{7,0}$ DIE₅₀/0,2ml, conferiu o mesmo nível de imunidade que duas doses de $10^{4,5}$ DIE₅₀ administradas com nove semanas de intervalo.

ALLER & ALLAN (1970) e ALLAN (1971) determinaram que a mínima dose protetora por ave se estabelecia com títulos vacinais entre $10^{6,5}$ e $10^{7,0}$ DIE₅₀/dose.

MONREAL et alii (1972) demonstraram que é necessário uma dose mínima de $2 \times 10^{4,0}$ DIE₅₀, tanto para amostra B₁ como La Sota, para detectar anticorpos no soro.

SHAKOUR et alii (1971) informaram que vacinas de título $4 \times 10^{4,0}$ DIE₅₀/dose, administradas pela via nasal, conferiram somente 70% de proteção por quatro semanas. O pico dos anticorpos IH foi de 1/64 ao nono dia pós-vacinal, desaparecendo completamente os anticorpos séricos às duas semanas após a vacinação.

QUAGLIO et alii (1973) informaram que com vacinas La Sota de título mínimo por dose de $10^{6,0}$ DIE₅₀, obtiveram uma resposta imune satisfatória, quando a vacinação foi feita pela via óculo-nasal em aves de 18 dias de idade.

ALLAN et alii (1973) informaram que a dose ótima para as vacinas lentogênicas deveria ser entre $10^{6,5}$ a $10^{7,0}$ DIE₅₀/dose.

BENGELSDORFF (1974) obteve 95% de proteção em aves vacinadas através da água de bebida com vacina B₁ de título $10^{7,4}$ DIE₅₀/dose. Quando o título era de $10^{6,0}$ DIE₅₀/dose, a porcentagem de proteção só atingiu 80%.

Testes sorológicos

FABRICANT (1949) observou que os títulos de anticorpos IH alcançaram valores demonstráveis mais rapidamente que os títulos de anticorpos soroneutralizan-

tes. Demonstrou, também, que o teste IH é altamente específico, seguro, rápido, barato e de fácil realização.

ATANASIU & GAREAU (1951) e HITCHNER et alii (1951) informaram que o teste de soroneutralização pode ser diretamente relacionado ao estado imune das aves, o que não pode ser feito com o teste de IH.

LUTHEGEN(1971) observou que os níveis de anticorpos IH obtidos após a vacinação com amostra B₁ pela via oral, através de água de bebida, variaram entre 1/20 e 1/320.

CREANGA et alii (1972) demonstraram que índices soroneutralizantes (ISN) iguais ou superiores a 4,0 em aves vacinadas, conferiram uma proteção adequada ao desafio com vírus virulento.

BANKOWSKI (1973) observou que a resposta anamnésica à revacinação feita com 10 dias de intervalo e, medida pelos anticorpos IH, ocorreu entre o 5º e 10º dia após à revacinação.

MARTHEDAL et alii (1973) informaram que aves infectadas por contato com aves com a doença de Newcastle apresentaram títulos IH transitórios. Demonstraram também, que os títulos IH individuais apresentaram flutuações e que alguns indivíduos foram incapazes de produzir

anticorpos IH.

ROEPKE (1973) observou que com uma imunidade passiva de anticorpos $IH=6,4$ expressos como a média geométrica de \log_2 , houve 80% de proteção aos 14 dias de idade.

TAVASSOLI (1973) indicou os testes de inibição de hemaglutinação e soroneutralização tanto para o diagnóstico como para a determinação dos níveis de imunidade.

ALLAN & GOUGH (1974) observaram 80% de mortalidade ao desafio de aves com títulos de anticorpos $IH=3,0$, expressos como a média geométrica de \log_2 .

Vacinas lentogênicas B₁ e La Sota

HITCHNER et alii (1951) e MARKHAM et alii (1954) informaram que pintos vacinados na primeira semana de vida, com vacina B₁, manifestaram uma sólida imunidade quando desafiados as cinco semanas de idade.

BANKOWSKI & ROSENWALD (1956) observaram que a vacina B₁ era neumotrópica e devia ser aplicada pelo trato respiratório. Informaram, também, que produziu imunidade de curta duração.

WINTERFIELD & SEADALE (1957a) demonstraram um

certo potencial de disseminação com a vacina B₁, que também foi completamente apatogênica por qualquer via de administração.

WINTERFIELD et alii (1957) informaram que amostra La Sota, obtida a partir de uma vacina comercial da semente "717", foi passada através de três gerações em ovos embrionados antes de ser empregada como vacina.

LANCASTER (1964) informou que a vacina B₁ foi adversamente afetada em suas propriedades protectoras quando aplicada na água de bebida, sem estabilizantes orgânicos. A vacina La Sota apresentou reações pós-vacinais e uma duração da imunidade de quatro meses.

CHANGING (1970) informou que a vacina B₁ protegeu pintos durante os primeiros dias de vida por interferência viral. Foi pouco eficiente em aves adultas, com níveis limitados de imunidade residual. Entretanto, a vacina La Sota foi adequada como "booster", com melhor poder de disseminação, porém, apresentou maior patogenicidade.

ALLAN (1971) informou que a vacina B₁ tem chegado a ser a mais amplamente usada no mundo pelas suas características de baixa virulência intrínseca, combinada a sua habilidade de invadir o trato respiratório das aves.

NEWCASTLE (1971a) indicou que a vacina B₁ não foi inteiramente satisfatória em controlar a epidemia de Newcastle na Inglaterra, devido a sua limitada disseminação lateral e vulnerabilidade aos anticorpos maternos, o que demandou uma aplicação particularmente eficiente.

NEWCASTLE (1971b) informou que as vacinas B₁ e La Sota foram consideradas como as mais adequadas no controle da doença de Newcastle.

SHAKOUR et alii (1971) recuperaram vírus vacinal da amostra B₁ de traquéia e faringe até o 3º dia pós-vacinal. Demonstraram, ainda, que a amostra B₁ não é capaz de produzir anticorpos precipitantes detectáveis.

TAVASSOLI (1971) observou que aves vacinadas com vacina La Sota mostraram depressão, anorexia e ligeira paralisia. As aves vacinadas com vacina B₁ não demonstraram nenhum sinal clínico.

JANSSEN & LÜDERS (1971) não observaram efeitos colaterais em aves vacinadas com amostras B₁ e La Sota, nem diferenças significativas na produção de anticorpos IH das vacinas em questão.

LANDGRAF & VIELITZ (1972) empregaram programas diferentes de vacinação com vacinas B₁ e La Sota demonstrando uma imunização efetiva contra as manifestações

clínicas da doença, mas não uma satisfatória prevenção da queda na postura. Observaram, ainda, que o efeito imunizante da amostra B₁ foi consideravelmente reduzido pelos anticorpos maternos, sendo os títulos IH duas a três vezes maiores com a vacina La Sota.

WOERNLE & SCHOLTYSEK (1972) demonstraram que a vacina La Sota foi capaz de induzir títulos IH significativamente maiores que a vacina B₁ e melhor proteção ao desafio.

ALLAN et alii (1973) informaram que a vacina La Sota causou maiores reações pós-vacinais do tipo respiratório. Entretanto, sua imunogenicidade foi comparável ao grau de reações que determinou.

BUTTERFIELD et alii (1973) demonstraram que as vacinas B₁ e La Sota administradas pela via nasal, conferiram excelente proteção (entre 90,5-100%) contra o desafio com amostras velogênicas viscerotrópicas isoladas de casos de campo.

JANSSEN & KALETA (1973) não observaram diferenças significativas entre as vacinas B₁ e La Sota, quando as aves foram vacinadas com baixos níveis de anticorpos passivos.

TAVASSOLI (1973) vacinou aves de 10 dias de i-

dade com vacina B₁ e obteve 98% de proteção as 12 semanas. Os maiores títulos de anticorpos IH e soroneutralizantes foram obtidos com a vacina La Sota.

BENSON et alii (1975) empregando vacina La Sota, em frangos de corte, obtiveram imunidade satisfatória por qualquer método de vacinação.

MEULEMANS et alii (1975) vacinando pintos de um dia, obtiveram 78% de proteção com a vacina B₁ e 91% de proteção com a vacina La Sota, as oito semanas de vida.

OWOLODIN & AJIBOYA (1975) observaram um alto poder de disseminação na vacina La Sota. Demonstraram, ainda, que o maior título IH correspondeu a uma maior resistência ao desafio.

VOLTEU & LAARHOVEN (1975) não observaram reações adversas após a vacinação, nem disseminação de vírus vacinal, quando a vacina La Sota foi aplicada pela via intra-muscular as 10 semanas de vida.

QUAGLIO et alii (1975) informaram que a eficácia no processo vacinal dependeu dos seguintes fatores: estado imunogênico das aves, tipo de vacina, via de administração e intervalo entre vacinações. Informaram, ainda, que nas primeiras duas semanas de vida os pintos

não foram imunocompetentes, e, que precisaram de duas vacinações para conseguir uma sólida imunidade.

3. Material e Métodos

1. Vacinas

Foram utilizadas sete vacinas comercializadas no Brasil em 1975, produzidas com vírus vivo do tipo lentogênico, sendo quatro com a amostra La Sota e três com a amostra B₁, provenientes de quatro laboratórios. Cada vacina constava de duas partidas de 10 frascos cada uma, estando todas no primeiro terço de seu período de validade. Os testes foram feitos com "pools" de cada partida de vacina, exceto para os testes de pureza e inocuidade.

2. Ovos embrionados

Utilizaram-se embriões de galinha de 10 dias de incubação, provenientes de aves não vacinadas contra a doença de Newcastle e que não apresentavam anticorpos IH e SN. Os embriões foram empregados para passagens de vírus, titulação vacinal, teste de pureza, determinação do tempo médio de morte, estabilidade da infectividade viral a pH 3 e teste de soroneutralização.

3. Vírus de desafio

Utilizou-se uma amostra velogênica viscerotrópica obtida de um caso de campo, isolada e identificada no Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Esta amostra foi titulada em ovos embrionados e mantida a -20°C .

4. Aves experimentais

Foram utilizados 1200 frangos de corte de marca comercial Hubbard, fornecidos pela Fazenda Experimental da Escola de Veterinária da UFMG. As aves foram mantidas em isolamento antes e durante as provas experimentais.

5. Preparo das amostras vacinais para sua caracterização

As vacinas provenientes dos laboratórios foram previamente multiplicadas em ovos embrionados da seguinte forma: cada vacina foi inoculada, na dose de 0,2ml por embrião, no saco alantóico de cinco ovos e incubados a 37°C . O líquido alantóico foi colhido ao 5º dia de inoculação, clarificado por centrifugação a 2000g por 20 minutos a 4°C e armazenado a -20°C em pequenas alíquotas para os experimentos posteriores.

6. Caracterização das amostras *in vivo*

6.1. Tempo Médio de Morte (TMM)

Embriões de 10 dias de incubação foram inoculados com 0,2ml por ovo, via saco alantóico, com diluições decimais seriadas de 10^{-1} até 10^{-9} , das amostras B₁ e La Sota e velogênica viscerotrópica em estudo. Cada diluição foi inoculada em cinco embriões; os ovos foram examinados com intervalos de oito horas até o 10º dia pós-inoculação e o tempo de morte, em horas, foi registrado para cada embrião descartando toda morte embrionária dentro das primeiras 24 horas da inoculação. O tempo médio de morte, determinado para cada amostra, foi calculado pela maior diluição na qual todos os embriões morreram.

6.2. Índice de Patogenicidade Intracerebral (IPIC)

Foram utilizados 10 pintos de um dia, livres de anticorpos maternos (IH e SN), para cada vacina em estudo; eles foram inoculados pela via intracerebral, com 0,05ml de uma diluição 10^{-1} dos vírus vacinais multiplicados em embrião. Os pintos foram observados diariamente, durante oito dias, sendo registrado, individualmente, o estado de cada ave. Todas as mortes foram consideradas

específicas, já que o vírus de Newcastle pode matar intracerebralmente em menos de 24 horas. A patogenicidade para cada amostra foi expressa como Índice de Patogenicidade Intracerebral.

6.3. Estabilidade da infectividade a pH 3

Os vírus vacinais multiplicados em embrião foram colocados em solução tampão, pH 7,2 e pH 3. Estas misturas foram mantidas à temperatura ambiente por quatro horas e, posteriormente, foram feitas diluições decimais seriadas até 10^{-3} , que foram inoculadas em embriões para a determinação da infectividade viral.

7. Caracterização das amostras *in vitro*

7.1. Estabilidade térmica da hemaglutinina

Foram colocadas em banho Maria a 56°C alíquotas de vírus vacinal que foram retiradas em: 15, 30, 60 e 120 minutos e esfriadas imediatamente em banho de gelo. A atividade hemaglutinante das amostras virais, assim tratadas, foi determinada pelo teste da hemaglutinação (CUNNINGHAM, 1971).

7.2. Hemaglutinação de eritrócitos de equino

A capacidade das amostras lentogênicas vaci-

nais de hemaglutinar hemácias de eqüino a 0,5% foi feito, comparativamente, com uma suspensão a 0,5% de hemácias de galinha, segundo o teste de hemaglutinação.

Nota: as técnicas descritas nos itens 5, 6 e 7 são as recomendadas no NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1971.

8. Controles de qualidade

Todas as vacinas em estudo foram submetidas aos seguintes testes:

A) Teste de pureza

- 1) Salmonelas
- 2) Outras bactérias e fungos
- 3) Micoplasmas
- 4) Teste de agentes patogênicos contaminantes
 - 4.1) Teste de inoculação em embriões
 - 4.2) Teste de inoculação em aves (20 aves/vacina)

B) Teste de inocuidade (20 aves/vacina)

C) Determinação da Dose Infecciosa Embrião (DIE₅₀) por dose vacinal. Titulação

D) Teste de estabilidade térmica (validade)

As técnicas utilizadas na realização dos testes mencionados são as estabelecidas no U.S. DEPARTMENT OF

AGRICULTURE, 1970.

9. Testes sorológicos

9.1. Inibição da hemaglutinação (IH)

Uma amostra velogênica viscerotrópica isolada de um caso de campo foi usada na reação do IH tipo Beta (CUNNINGHAM, 1971). Previamente os soros foram inativados a 56°C durante 30 minutos. Os testes foram feitos com oito Unidades Hemaglutinantes (UHA) em 0,25ml de vírus. Todos os títulos sorológicos foram registrados como a maior diluição do soro que inibiu oito UHA e expressos como a Média Geométrica (MG) do logarítmo de base 2 (\log_2).

9.2. Soroneutralização (SN)

O antígeno usado nos testes de SN foi preparado com a amostra velogênica viscerotrópica de Newcastle, utilizada para o desafio e o teste da IH. A técnica empregada padronizada por CUNNINGHAM (1971) foi de diluições decrescentes de vírus-soro constante. As diluições decimais seriadas do antígeno foram preparadas em Solução de Tampão Fosfato (STF), pH 7,2; diluições desde 10^{-6} até 10^{-9} do antígeno foram usadas para titulação da atividade viral. Partes iguais de soro sem diluir e do antígeno diluído foram misturados e incubados à tempera-

tura ambiente por 45 minutos, antes da inoculação de ovos embrionados. Os soros foram testados na amplitude da diluição de 10^{-4} até 10^{-7} do antígeno. Os títulos dos soros e do antígeno expressos como Dose Letal Embrião₅₀ (DLE₅₀) foram calculados de acordo com o método do ponto final 50% (REED & MUENCH, 1938). A diferença entre ambos os títulos foi expressa como Índice de Neutralização (IN).

10. Propriedades imunogênicas

As 800 aves foram distribuídas, ao acaso, em oito grupos com cinco repetições de 20 animais, assim caracterizados:

- Tratamento 1: 100 aves com vacina B₁ (Laboratório A);
- Tratamento 2: 100 aves com vacina La Sota (Laboratório A);
- Tratamento 3: 100 aves com vacina B₁ (Laboratório B);
- Tratamento 4: 100 aves com vacina La Sota (Laboratório B);
- Tratamento 5: 100 aves com vacina B₁ (Laboratório C);
- Tratamento 6: 100 aves com vacina La Sota (Laboratório C);
- Tratamento 7: 100 aves com vacina La Sota (Laboratório D);
- Tratamento 8: 100 aves não vacinadas como controles.

Os sete grupos vacinados receberam a vacina aos 12 dias de idade.

Vinte e um dias após a vacinação, todos os gru-

pos foram submetidos a um desafio de 100.000 DLE₅₀/0,5ml de vírus velogênico viscerotrópico pela via intramuscular.

Foram feitos "pools" de três soros de cada repetição, a fim de se proceder à titulação de anticorpos IH. Foram feitas sete determinações com intervalo de cinco dias para as provas de IH e duas de sangria - a um dia de idade e no momento de desafio - para as provas de SN. Após o desafio as aves foram observadas diariamente para o registro dos sinais clínicos e mortalidade, durante 10 dias. A resistência ao desafio foi expressa como porcentagem de proteção total e porcentagem de proteção à morte; o primeiro refere-se à ausência total de qualquer sinal clínico das aves vacinadas após o desafio, o segundo indica as aves que manifestaram algum sinal clínico após o desafio, tais como depressão, anorexia.

11. Delineamento experimental

Foi do tipo inteiramente ao acaso, empregando um modelo de análise de variância descrito por SNEDECOR & COCHRANE (1967). Para as diferenças significativas entre tratamentos, foi realizado o Teste da Diferença Mínima Significativa (DMS).

1. Caracterização das amostras *in vivo*

O Quadro I registra o Tempo Médio de Morte (TMM) dos embriões inoculados com as amostras lentogênicas vacinais B₁ e La Sota e a amostra velogênica viscerotrópica. O TMM para todas as amostras lentogênicas estudadas, exceto para a amostra velogênica viscerotrópica, variou de 116 horas até 161 horas, enquanto os embriões inoculados com a amostra velogênica viscerotrópica apresentaram um TMM de 65 horas.

O Quadro II dá os resultados do Índice de Patogenicidade Intracerebral (IPIC) em pintos de um dia, com as amostras lentogênicas e velogênica viscerotrópica. As amostras B₁ dos diferentes laboratórios tiveram IPIC comparáveis variando entre: 0,04-0,1. Entretanto, as amostras La Sota tiveram uma variação maior com valores desde 0,03 até 0,3. O IPIC para a amostra velogênica viscerotrópica foi de 1,3.

O Quadro III registra a estabilidade da infectividade viral a pH 3. Todas as amostras B₁ e a amostra

velogênica viscerotrópica foram resistentes ao PH 3, enquanto as amostras La Sota foram sensíveis.

2. Caracterização das amostras *in vitro*

O Quadro IV mostra a estabilidade, em minutos, da hemaglutinina a 56°C das amostras lentogênicas B₁ e La Sota e da amostra velogênica viscerotrópica. As amostras B₁ e La Sota foram estáveis até 15 minutos, exceto as amostras B₁ e La Sota de dois laboratórios que apresentaram uma estabilidade térmica inferior a 15 minutos. A amostra velogênica viscerotrópica foi estável por mais de 120 minutos.

O Quadro V resume os resultados da hemaglutinação de eritrócitos de equino das diferentes amostras virais em estudo. Todas as amostras lentogênicas tipo B₁ e a amostra velogênica viscerotrópica não hemaglutinaram hemácias de equino, entretanto, só duas amostras lentogênicas tipo La Sota apresentaram hemaglutinação positiva.

3. Controles de qualidade

O Quadro VI resume os resultados dos principais controles de qualidade feitos, inclusive os de proteção.

Na determinação do título infectante por dose os valores obtidos variaram desde $10^{5,85}$ DIE₅₀ até $10^{6,84}$ DIE₅₀ por dose. A estabilidade térmica viral (Validade) apresentou uma grande variação sendo encontradas perdas de título desde $10^{0,05}$ DIE₅₀ até $10^{1,1}$ DIE₅₀ por dose. Todas as vacinas testadas resultaram satisfatórias nos testes de pureza (teste de esterilidade e teste de agentes patogênicos contaminantes) e no teste de inocuidade. Ao relacionar título por dose com a proteção total conferida pelas vacinas em estudo, obteve-se os seguintes resultados: para títulos médios de $10^{6,59}$ DIE₅₀ por dose corresponderam valores de proteção total de 89,3%. Para títulos médios de $10^{5,87}$ DIE₅₀ por dose, os valores de proteção total foram de 87,5%.

4. Testes sorológicos

O Quadro VII mostra os títulos de anticorpos IH e soroneutralizantes obtidos no momento do desafio em relação a proteção total conferida pelas vacinas. Os títulos de anticorpos IH expressos como a maior diluição, capaz de inibir 8 UHA de vírus, apresentou uma grande variação com valores desde 1/332 até 1/1260. Entretanto, os valores dos anticorpos soroneutralizantes expressos

como Índice Neutralizante da DLE_{50} do vírus foram mais estáveis.

As diferenças encontradas entre os títulos atingidos com as amostras B_1 e La Sota foram estatisticamente significativos para os anticorpos IH. Quanto aos anticorpos soroneutralizantes não houve diferenças significativas entre os títulos obtidos com as vacinas estudadas.

5. Propriedades imunogênicas

Após o desafio feito com $100.000 DLE_{50}/0,5ml$ via intramuscular, os controles se mostraram visivelmente afetados a partir do quarto dia pós-desafio, evidenciando intensa depressão, diarréia aquosa e, usualmente, com manifestações nervosas imediatamente antes da morte. Hemorragias predominaram em todo o trato digestório, com formação de úlceras no proventrículo, duodeno e tonsilas cecais.

Os resultados das provas de eficácia estão consignados nos Quadros VI e VII, onde pode-se observar que todas as vacinas em estudo resultaram satisfatórias nos testes de imunidade, sem diferenças estatisticamente significativas entre vacinas e entre amostras.

Os Quadros VIII e IX e as Figuras 1 e 2 registram os valores obtidos na determinação dos anticorpos IH e soroneutralizantes durante o transcurso da experiência. Após a vacinação houve uma neutralização dos anticorpos maternos, evidenciado pela diminuição dos títulos respectivos: isto não foi observado nas amostras La Sota, exceto de um laboratório.

Aos valores médios de proteção de 90,5 e 86,6%, corresponderam os títulos médios IH de 1/671 e 1/599, respectivamente.

A evolução dos anticorpos passivos maternos foi a seguinte: nos primeiros 15 dias, o título IH se manteve estável. A partir do 20º dia houve uma ligeira queda no título de anticorpos IH, que se acentuou após os 25 dias de idade. No momento do desafio, aos 33 dias de idade, os anticorpos passivos eram: 1/18 para os IH e 0,65 ISN nos soroneutralizantes. Ambos os títulos foram completamente insuficientes em termos de proteção ao desafio.

Quadro I - Tempo médio de morte (TMM), expresso em horas, da Dose Letal Mínima (DLM) segundo os laboratórios e amostras vacinais

Amostras	Laboratórios	A	B	C	D
B ₁		150	161	144	-
La Sota		145	131	116	156

Amostrá velogênica viscerotrópica: 65 horas

Quadro II - Índice de patogenicidade intracerebral (IPIC) em pintos de um dia segundo os laboratórios e amostras vacinais

Amostras	Laboratórios	A	B	C	D
B ₁		0,10	0,03	0,04	-
La Sota		0,15	0,2	0,3	0,03

Amostra velogênica viscerotrópica: IPIC 1,3

Quadro III - Estabilidade da infectividade a pH 3, segundo os laboratórios e amostras vacinais

Laboratórios	A	B	C	D
Amostras				
B ₁	Positivo	Positivo	Positivo	-
La Sota	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Amostra velogênica viscerotrópica: positivo

Quadro IV - Termostabilidade da hemaglutinina a 56°C (em minutos), segundo os laboratórios e amostras vacinais

Amostras	Tempo (em minutos)					
	0	15	30	60	120	
A	1/1280	1/8	1/5	0	0	0
B	1/640	1/2	0	0	0	0
C	1/320	1/32	1/5	1/2	0	0
D	-	-	-	-	-	-
A	1/320	0	0	0	0	0
B	1/640	1/32	1/5	1/2	0	0
C	1/2560	1/32	0	0	0	0
D	1/1280	1/80	1/5	0	0	0
Velogênica viscerotrópica	1/1280	1/1280	1/1280	1/64	1/32	1/32

Quadro V - Hemaglutinação de hemácia de eqüino segundo os laborat6rios e amostras vacinais

Laborat6rios	A	B	C	D
Amostras				
B ₁	Negativo	Negativo	Negativo	-
La Sota	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo

Amostra velogênica viscerotr6pica: Negativo

QUADRO VI - Resultados dos testes de potência, pureza, estabilidade e inocuidade, segundo os laboratórios e amostras vacinais

Labora- tórios	Amostras	Título infectante		Estabilidade térmica		Inocuidade e pureza	% P.Morte	% P.Total
		DIE ₅₀ /ml	DIE ₅₀ /dose	DIE ₅₀ /ml	DIE ₅₀ /dose			
A	B ₁	10 ^{8,0}	10 ^{6,69}	10 ^{7,7}	10 ^{6,17}	Negativo	91,6	90,6
	La Sota	10 ^{7,2}	10 ^{5,9}	10 ^{7,12}	10 ^{5,59}	Negativo	90,0	85,6
B	B ₁	10 ^{7,8}	10 ^{6,49}	10 ^{6,80}	10 ^{5,39}	Negativo	92,6	87,0
	La Sota	10 ^{7,16}	10 ^{5,85}	10 ^{7,11}	10 ^{5,80}	Negativo	93,6	90,0
C	B ₁	10 ^{8,35}	10 ^{6,82}	10 ^{7,2}	10 ^{5,89}	Negativo	93,4	87,6
	La Sota	10 ^{8,37}	10 ^{6,84}	10 ^{7,32}	10 ^{6,01}	Negativo	96,3	89,0
D	La Sota	10 ^{7,8}	10 ^{6,15}	10 ^{7,25}	10 ^{5,95}	Negativo	95,0	92,6

Quadro VII - Comparação entre os valores de proteção total e da imunidade humoral, expressa pelos anticorpos IH e SN, no momento do desafio

Laboratórios	Amostras	Proteção total (%)	HI*	SN
A	B ₁	90,6	1/332	4,10
	La Sota	85,6	1/417	3,80
B	B ₁	87,0	1/550	3,80
	La Sota	90,0	1/832	4,00
C	B ₁	87,6	1/832	3,95
	La Sota	89,0	1/1260	4,08
D	La Sota	92,6	1/1260	4,25

* Diferenças entre B₁ e La Sota são estatisticamente significativas

Quadro VIII - Resultado das médias geométricas de anticorpos IH, expressos em logarítmo de base 2 (Log 2)

Tratamentos	1		2		3		4		5		6		7		8	
	Amostra B ₁	Amostra La Sota	Amostra B ₁	Amostra La Sota	Amostra B ₁	Amostra La Sota	Amostra B ₁	Amostra La Sota	Amostra B ₁	Amostra La Sota	Amostra B ₁	Amostra La Sota	Amostra B ₁	Amostra La Sota	Amostra B ₁	Amostra La Sota
<u>Período pré-vacinal</u>																
Idade (em dias)	6,90	6,70	6,50	6,90	6,70	6,90	6,90	6,90	6,90	6,90	6,70	6,70	6,90	6,90	6,90	6,90
1																
6	6,70	6,90	6,70	6,90	6,90	6,90	6,90	6,90	6,90	6,90	6,90	6,90	6,90	6,70	6,70	6,90
11	6,90	6,90	6,70	6,90	6,90	6,90	6,90	6,90	6,90	6,90	6,70	6,70	6,90	6,70	6,70	6,90
Vacinação 12																
<u>Período pós-vacinal</u>																
16	6,70	6,57	6,37	7,10	6,37	7,10	7,10	7,10	6,14	7,50	6,91	6,57	6,70	6,91	6,91	6,57
21	6,90	6,30	6,50	7,71	6,50	7,71	7,71	7,71	6,57	7,30	6,55	6,37	6,90	6,55	6,55	6,37
26	8,51	8,51	7,30	8,31	7,30	8,31	8,31	8,31	7,71	10,10	7,90	4,74	6,90	7,90	7,90	4,74
31	9,50	8,71	9,10	9,69	9,10	9,69	9,69	9,69	9,70	10,29	10,30	3,99	6,90	10,30	10,30	3,99

Quadro IX - Resultados dos valores médios dos anticorpos soroneutralizantes expressos
 como Índice de Soroneutralização (ISN)

Idade (em dias)	Tratamentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	B ₁	La Sota	B ₁	La Sota	B ₁	La Sota	La Sota	Con- trole
Período pré-vacinal 1	2,10	2,05	2,00	2,08	2,02	2,00	2,10	2,05
Período pós-vacinal 31	4,10	3,80	3,80	4,00	3,95	4,08	4,25	0,65

Nos testes de caracterização das amostras vacinais observou-se que alguns valores diferiam daqueles padronizados por HANSON & BRANDLY (1955), ALLAN et alii (1973) e HITCHNER (1975). Assim, no teste do TMM todos os valores achados foram maiores, sendo para as amostras B₁, entre 144-161 horas, enquanto o padrão é de 120-128 horas; para as amostras La Sota, os valores encontrados variaram de 116-156 horas, enquanto o padrão é de 100-104 horas.

No que diz respeito ao teste IPIC, os valores achados foram de grande variação, especialmente nas amostras La Sota que tiveram uma amplitude de 0,03-0,3, sendo o padrão de 0,2-0,25; nas amostras B₁, os valores foram de 0,03-0,1, enquanto o padrão é de 0,1-0,15.

Dos resultados obtidos, vemos que as amostras em estudo são de baixíssima virulência, sem apresentar diferenças significativas em patogenicidade entre as amostras B₁ e La Sota considerando o teste TMM, agora, o teste IPIC demonstrou uma maior patogenicidade para as

amostras La Sota, como era de se esperar.

ALLAN et alii (1973) informaram que quando amostras lentogênicas são comparadas, há resultados conflitantes e que esta variação, provavelmente representa os diferentes históricos de passagens que as amostras virais têm experimentado desde sua origem; por outro lado, também influiriam as diferentes técnicas de produção dos laboratórios, incluindo: métodos de diluição limite, tempo de incubação, número de passagens feitas. Vírus passados muitas vezes por embrião ou armazenados no laboratório por muito tempo podem perder, em parte, sua infectividade. Outro fator importante é que as amostras B₁ e La Sota têm mais de 20 anos e foram desenvolvidas antes do uso do "Specific Pathogenic Free" (SPF).

O mesmo autor estabeleceu ainda, que mesmo reconhecendo a importância dos testes em questão, eles seriam de maior utilidade para propósitos de uma classificação mais ampla das amostras virais do que para diferenciar vírus de similar virulência como é o caso das amostras lentogênicas B₁ e La Sota.

Os valores de termostabilidade da hemaglutinina foram comparáveis aos padrões, que preconizam uma estabilidade de 15 minutos a 56°C, considerando um título

mínimo de 1/10 para a hemaglutinação. Foi observado que, em dois laboratórios, um para a amostra B₁, outro para a amostra La Sota, a termostabilidade foi inferior a 15 minutos. Segundo ALLAN et alii (1973), a termostabilidade é variável e a resistência das diferentes amostras ou sub-amostras ao calor, é um dos mais úteis indicadores genéticos na caracterização das amostras individuais. Isto foi confirmado por LOMMICZI (1975), que concluiu que nas amostras lentogênicas foram encontradas algumas amostras com hemaglutinina termolábil e termostável, sendo este caracter, quando associado à infectividade viral, de grande utilidade para identificar a origem de uma amostra lentogênica.

Os resultados do teste de estabilidade da infectividade a pH 3 foram completamente concordantes com o padrão, ou seja, as amostras B₁ foram resistentes ao pH baixo, enquanto as amostras La Sota perderam sua infectividade ao serem submetidas ao mesmo pH conforme o estabelecido por HANSON et alii (1967).

No que diz respeito ao teste de hemaglutinação de eritrócitos de equino, o esperado seria encontrar re-

sultados positivos nas amostras La Sota e negativos nas amostras B₁. Porém, só duas amostras La Sota foram positivas o que indicaria uma possível inversão de identificação das amostras, ou tratar-se-iam de amostras mistas de B₁-La Sota, ou, também, de contaminação com vírus da amostra B₁, não detectável pelos outros testes. ALLAN et alii (1973) informaram que amostras lentogênicas podem estar contaminadas com outros vírus sem que este apareça nos resultados dos testes. Outra explicação seria por uma variação na semente viral original, pelas razões já expostas. ALLAN et alii (1973) indicaram que a capacidade de hemaglutinar hemácias de mamíferos é usado também para caracterizar amostras individuais.

Os resultados dos testes de qualidade foram satisfatórios nos aspectos de pureza e inocuidade. Este fato era esperado visto que, as vacinas em estudo, foram elaboradas com embriões SPF e apresentaram baixa virulência, observada nos resultados dos testes de patogenicidade - IPIC e TMM.

ROSENWALD (1973), LENSING (1973) e DAVIDSON (1975), consideraram o teste de pureza bastante controvertido porque, se uma pequena amostra de uma vacina passou no teste de pureza, isto não garante que o produto

seja puro, porque a contaminação, se presente, pode ser pequena ou não estar distribuída em toda a partida da vacina, e, conseqüentemente, não ser demonstrada. Por outro lado, os testes de pureza variam quanto à sensibilidade de detectar algum tipo de contaminação, como por exemplo, outra amostra viral lentogênica ou, especialmente, quando se trata de vacinas vivas elaboradas com ovos embrionados que apresentam ampla oportunidade de contaminação, daí a exigência de elaboração das vacinas com ovos SPF.

Na determinação da DIE_{50} , ou seja, titulação viral por dose vacinal, os títulos mínimos recomendados vão desde $10^{6,5}$ - $10^{7,0}$ DIE_{50} /dose, segundo ALLER & ALLAN (1970); ALLAN *et alii* (1973), ALLAN (1971) e ALLAN & DAWSON (1973). Dos valores achados somente três vacinas pertencentes a dois laboratórios atingiram os títulos preconizados, sendo duas da amostra B₁ e uma da amostra La Sota. Os estudos feitos por ALLAN (1971), informaram que é de importância fundamental que uma quantidade maior possível da dose alcance a mucosa respiratória visto que, o vírus vacinal, mesmo sendo contagioso, é de disseminação limitada. Portanto, a resposta imune que ocorrer, estará em função direta da quantidade

de vírus introduzida. Assim sendo, as vacinas vivas que entraram em contato com as aves em concentrações menores que $10^{6,5}$ DIE₅₀/dose, deveriam "invadir" satisfatoriamente o corpo da ave e se multiplicar o suficiente para proporcionar um estímulo adequado. Quando a ave é totalmente susceptível, este potencial pode ser conseguido. Entretanto, isto se dificulta quando estão presentes anticorpos circulantes ativos ou passivos que podem inibir a multiplicação do vírus vacinal (DOLL et alii, 1950; BEAUDETTE & BIVIS, 1953; MARKHAM et alii, 1954; ALLAN, 1969; LANDGRAF & VIELITZ, 1972.

Um outro problema é que a via de aplicação mais comumente usada é a oral, que não permite atingir os objetivos mencionados, sendo comprovadamente ineficiente (LANCASTER, 1964; ALLAN, 1971; MONREAL et alii, 1972; BANKOWSKI, 1972; ALLAN et alii, 1973). É interessante acrescentar, também, que as amostras lentogênicas crescem usualmente até títulos de $10^{10,0}$ - $10^{10,25}$ DIE₅₀/ml (ALLAN et alii, 1973), já que como demoram bastante a matar o embrião, produzem títulos significativamente maiores do que amostras de maior virulência. Isto significa que falhas na eficiência das técnicas de produção podem determinar um título baixo do vírus colhido. ALLAN et alii,

(1973), estabeleceram algumas das causas mais comuns que determinam uma menor concentração viral, tais como: uso de ovos embrionados com anticorpos, inclusão acidental na colheita de gema com anticorpos, contaminação do fluido viral com albumina que altera a concentração, inoculação de semente com nível de passagem de alta multiplicidade, colheita de fluido de ovos que permaneceram na incubadora após a morte dos embriões.

No que diz respeito a estabilidade térmica ou validade das vacinas, considera-se que uma perda de $10^{0.5}$ DIE_{50} /dose, ou maior, após um ano a 4°C ou uma semana a 37°C, é insatisfatório (ALLAN et alii, 1973 e LENSING, 1973). Dos resultados obtidos no teste de estabilidade acelerada, vemos que somente três vacinas da amostra La Sota de três laboratórios, tiveram uma perda antigênica considerada tolerável. Segundo ROSENWALD (1973), a estabilidade térmica tem sido comprovadamente correlacionada com a duração real da vacina. Portanto, em condições normais, uma vacina considerada estável manterá sua potência, expressa em termos de conteúdo viral, até o momento da expiração. No caso das vacinas testadas, sua vida média estaria bastante afetada pelas condições de transporte, armazenamento e conservação geral.

Os resultados obtidos na avaliação da eficiência das vacinas, medida em porcentagens de proteção ao desafio revelaram que, embora as diferenças achadas não fossem estatisticamente significativas nem entre vacinas nem entre laboratórios, somente três vacinas de três laboratórios (sendo duas da amostra La Sota e a outra da amostra B₁) conseguiram atingir uma porcentagem igual ou superior a 90% que é o mínimo preconizado (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1971). Os resultados achados, mesmo sendo ligeiramente inferiores, concordam com os obtidos por KREIMER et alii (1969) e QUAGLIO et alii (1973) que obtiveram valores entre 90-100% de proteção para a vacina La Sota. Entretanto, SHAKOUR et alii (1971) e TAVASSOLI (1973), encontraram valores semelhantes de proteção para a vacina B₁. Por outro lado, BUTTERFIELD et alii (1973), TAVASSOLI (1971) e MEULEMANS et alii (1975), também não acharam diferenças significativas nos valores de proteção obtidos, entre 90-98%, em ambas as amostras vacinais.

Sendo o desafio uma medida da resistência adquirida da ave, é muito natural que a relação exata entre a resistência e as DLE₅₀ do vírus de desafio e a exposição natural, ainda não tenha sido estabelecida. Portanto, os resultados deste tipo de testes irão depender

da dose de vírus do desafio, via de administração, tipo de vírus e o tempo transcorrido após a vacinação (BEARD & EASTERDAY, 1967 e HANSON, 1964). Foi sugerida a adoção de um método de desafio que coadune com as atuais exigências de potência das vacinas contra a doença de Newcastle no INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REQUIREMENTS FOR POULTRY VIRUS VACCINE, Lyon, 1973. Assim, ALLAN (1973), propôs que o vírus velogênico de desafio tivesse uma virulência padronizada, expressa nos testes IPIC e Índice de Patogenicidade Intravenoso (IPIV) de, pelo menos, 1,85 e 2,6 respectivamente. A dose do desafio devia ser de $10^{6,0}$ DLE₅₀, sendo administrada exatamente três semanas após a vacinação; além do mais, para aprovar o teste, 100% das aves testadas deveriam sobreviver.

ALLAN et alii (1973) e ROSENWALD (1973), informaram ainda, que a via de administração do desafio é extremamente importante para assegurar a efetividade das vacinas. No caso específico da doença de Newcastle, o desafio através da via intramuscular proporcionaria o efeito letal mais reproduzível em aves completamente suscetíveis.

É importante acrescentar também, que a simples redução da mortalidade não pôde ser empregada como cri-

tério único para efeitos da avaliação das vacinas, como normalmente tem sido considerado. São importantes a resistência à infecção do epitélio respiratório, imunidade à infecção sistêmica e resistência à queda na produção de ovos (LANCASTER, 1964). As diferenças achadas entre as porcentagens de proteção à morte e proteção total não foram significativas, provavelmente devido às limitadas condições de ambiente do laboratório, que afastou qualquer possibilidade de alguns dos "stress" mais comuns em aves mantidas sob condições naturais.

DAVIDSON (1975) concluiu que a população de animais é bem mais variável do que a limitada seleção, usada nos testes vacinais. Assim, na prática, as vacinas podem se desempenhar muito pior do que o esperado dos resultados encontrados nos testes.

Relacionando os resultados de proteção ao desafio com os títulos vacinais foi verificado, como já fora estudado anteriormente por ALLER & ALLAN (1970), SHAKOUR et alii (1971) e QUAGLIO et alii (1973), que existe uma tendência a obter melhores resultados quando a dose vacinal atinge valores semelhantes aos preconizados. Se bem que as diferenças encontradas nos valores de proteção não foram significativas, mesmo com diferentes doses

vacinais, é importante considerar que as condições controladas do experimento e, o uso da vacinação pela via nasal, puderam ter influenciado decisivamente nos resultados obtidos. Por outro lado, MENASSE (1973) descreveu que o aumento do título de uma vacina não ajuda o poder imunogênico medíocre da amostra viral, sendo necessário que coexistam duas propriedades em uma só vacina: título viral elevado e alto poder imunogênico.

BANKOWSKI & ROSENWALD (1956); LANCASTER(1964); KREIMER et alii (1969) e ALLAN (1971), informaram que os resultados da vacinação são afetados pelo nível de anticorpos no momento da imunização. ALLAN et alii (1973) acrescentaram ainda que, na presença de títulos de anticorpos IH de $\log_2 6$ ou maiores, a resposta poderia ser baixa se fossem empregadas vacinas lentogênicas.

As provas sorológicas, neste experimento, apresentaram uma média de $\log_2 6,8$ no momento da vacinação parecendo, assim, que houve interferência da imunidade passiva no desenvolvimento da imunidade ativa (Quadro 8 e Fig. 1). Esta provável interferência do vírus vacinal foi maior na amostra B₁ do que na amostra La Sota, porque os títulos IH obtidos foram significativamente maiores para as vacinas La Sota, concordando com os resultados de LANDGRAF & VIELITZ (1972) e TAVASSOLI (1973). Por outro lado,

LANCASTER (1964), informou que nem sempre a resposta de anticorpos IH corresponde ao estado imune medido por desafio com vírus virulento, o que foi observado em uma vacina B₁, que teve o segundo melhor resultado em proteção, porém, com o título IH menor. Entretanto, os valores médios dos títulos relacionados com os valores médios de proteção mostraram que a maiores títulos IH correspondem melhores valores de proteção, o que concordou com os estudos feitos por OWOLODIN & AJIBOYA (1975) e BALLA et alii (1976).

No que diz respeito aos anticorpos soroneutralizantes, eles foram de maior concordância com as porcentagens de proteção que os anticorpos IH, o que confirmou o verificado por FABRICANT(1949) e LANCASTER(1964). Os índices soroneutralizantes achados foram ligeiramente superiores aos obtidos por QUAGLIO et alii (1973), que acharam valores máximos de 3,75 em um experimento semelhante; entretanto, neste experimento, os anticorpos soroneutralizantes passivos maternos em pintinhos de um dia com imunidade passiva, foram concordantes com os achados por WINTERFIELD & SEADALE (1957a, b).

Quanto a evolução dos anticorpos IH, passivos maternos, ALLAN et alii (1973) informaram que o nível de

anticorpos IH passivos em pintos de galinhas vacinadas e/ou infectadas varia de $\log_2 3$ até $\log_2 15$. LANCASTER(1964) informou que os anticorpos congênitos conferem escassa proteção ao trato respiratório contra a infecção Newcastle e, também, que o grau de proteção que tais anticorpos produzem, vai depender da quantidade e virulência do vírus de ataque.

As aves deste experimento, procedentes de matrizes imunizadas, apresentaram com um dia de idade, títulos médios de $\log_2 6,8$ considerados como compatíveis para uma proteção adequada, e que se mantiveram estáveis até os 16 dias de idade. ROEPKE (1973), obteve 80% de proteção ao desafio em pintos com IH médios de $\log_2 6,4$. Por outro lado, encontrou-se que a partir dos 16 dias de idade, o título IH começou a declinar a uma taxa mais ou menos constante concordando com os estudos de ALLAN et alii (1973), que determinaram que os anticorpos IH passivos maternos têm uma vida média de, aproximadamente, quatro dias e meio. Assim sendo, aos 31 dias de idade, as aves estavam completamente suscetíveis, o que foi demonstrado nos resultados do desafio e correspondeu com o afirmado por LANCASTER (1964), KALETA (1972) e KREIMER et alii (1969).

De acordo com as condições em que foi realizado este experimento, as seguintes conclusões foram obtidas:

- 1 - é importante conhecer detalhadamente o histórico e as condições de conservação das sementes vacinais, visto que os resultados dos testes de tipificação das amostras foram conflitantes;
- 2 - as vacinas B₁ e La Sota, elaboradas por quatro laboratórios comerciais foram igualmente eficientes, em termos de pureza, inocuidade e proteção ao desafio; entretanto, os títulos vacinais por dose, assim como a estabilidade térmica, não foram satisfatórios para todas as vacinas;
- 3 - as porcentagens de proteção obtidas foram inferiores às preconizadas atualmente, mesmo utilizando a via intranasal;
- 4 - as vacinas La Sota produziram títulos de anticorpos

IH maiores do que as vacinas B₁; os anticorpos neutralizantes mantiveram uma relação acentuada, com os valores de proteção ao desafio. Em termos de valores médios, os anticorpos IH guardaram correspondência com os valores de proteção; portanto, o teste IH é adequado para avaliar o "estado" imunitário das aves;

5 - os anticorpos passivos maternos, em pintos de galinhas vacinadas, declinaram rapidamente a partir dos 16 dias de idade; as vacinas B₁ sofreram interferência maior pelos anticorpos passivos maternos do que as vacinas La Sota no desenvolvimento da imunidade ativa. Pintos de galinhas vacinadas são inteiramente suscetíveis aos 30 dias de idade;

6 - os valores de proteção tenderam a aumentar à medida que os títulos vacinais por dose foram maiores.

A determinação da qualidade das vacinas Newcastle é um processo complexo e difícil. O controle do produto final, simplesmente verifica se a vacina testada guarda semelhança com o produto original licenciado, dentro de limites aceitáveis de tolerância. É, portanto, de maior importância, conhecer o comportamento das vacinas

em condições de campo.

Finalmente, é preciso estabelecer padrões realistas para a avaliação das vacinas Newcastle no Brasil, ou, pelo menos, fazer uma revisão dos padrões atualmente em uso.

7. Resumo

Foram estudadas sete vacinas lentogênicas comercializadas no Brasil, sendo três da amostra B₁ e quatro da amostra La Sota, produzidas por quatro laboratórios comerciais responsáveis, por aproximadamente, 80% do mercado de vacinas avícolas no Brasil. As vacinas foram submetidas às provas de avaliação de qualidade que consistiram em: testes de pureza, inocuidade, proteção ao desafio, título mínimo por dose e estabilidade térmica. As amostras vacinais foram, também, submetidas às provas de tipificação que consistiram em: Tempo Médio de Morte (TMM), Índice de Patogenicidade Intracerebral (IPIC), estabilidade da infectividade a pH 3, estabilidade térmica da hemaglutinina e hemaglutinação de eritrócitos de equino.

Não houve diferenças significativas entre as amostras B₁ e La Sota, nem entre laboratórios, no que diz respeito à porcentagem de proteção total ao desafio feito com $10^{5,0}$ DLE₅₀, de uma amostra velogênica viscerotrópica de campo e administrada por via intramuscular.

Somente duas vacinas La Sota e uma vacina B₁

de três laboratórios, conseguiram porcentagens de proteção total iguais ou superiores a 90%.

Empregando vacinação intranasal aos 12 dias de idade, em pintos portadores de imunidade passiva, e sob condições controladas de laboratório, os valores médios obtidos foram: 89,3% para títulos vacinais de $10^{6,59}$ DIE₅₀/dose e 87,5% para títulos vacinais de $10^{5,87}$ DIE₅₀/dose.

Somente três vacinas La Sota foram estáveis em título vacinal até sua expiração.

Todas as vacinas foram satisfatórias nos testes de pureza e inocuidade.

A produção de anticorpos inibidores da hemaglutinação (IH) cresceu até os 19 dias pós-vacinais, sendo significativamente maiores para a amostra La Sota.

Todas as vacinas B₁ e uma vacina La Sota, sofreram neutralização do vírus vacinal, devido aos anticorpos passivos maternos.

Os anticorpos soroneutralizantes foram mais uniformes que os IH e tiveram boa correlação com as porcentagens de proteção ao desafio.

Na tipificação das amostras vacinais houve diferenças entre elas, com relação aos requisitos padrões.

Valores médios dos anticorpos IH expressos na Média Geométrica (MG) \log_2

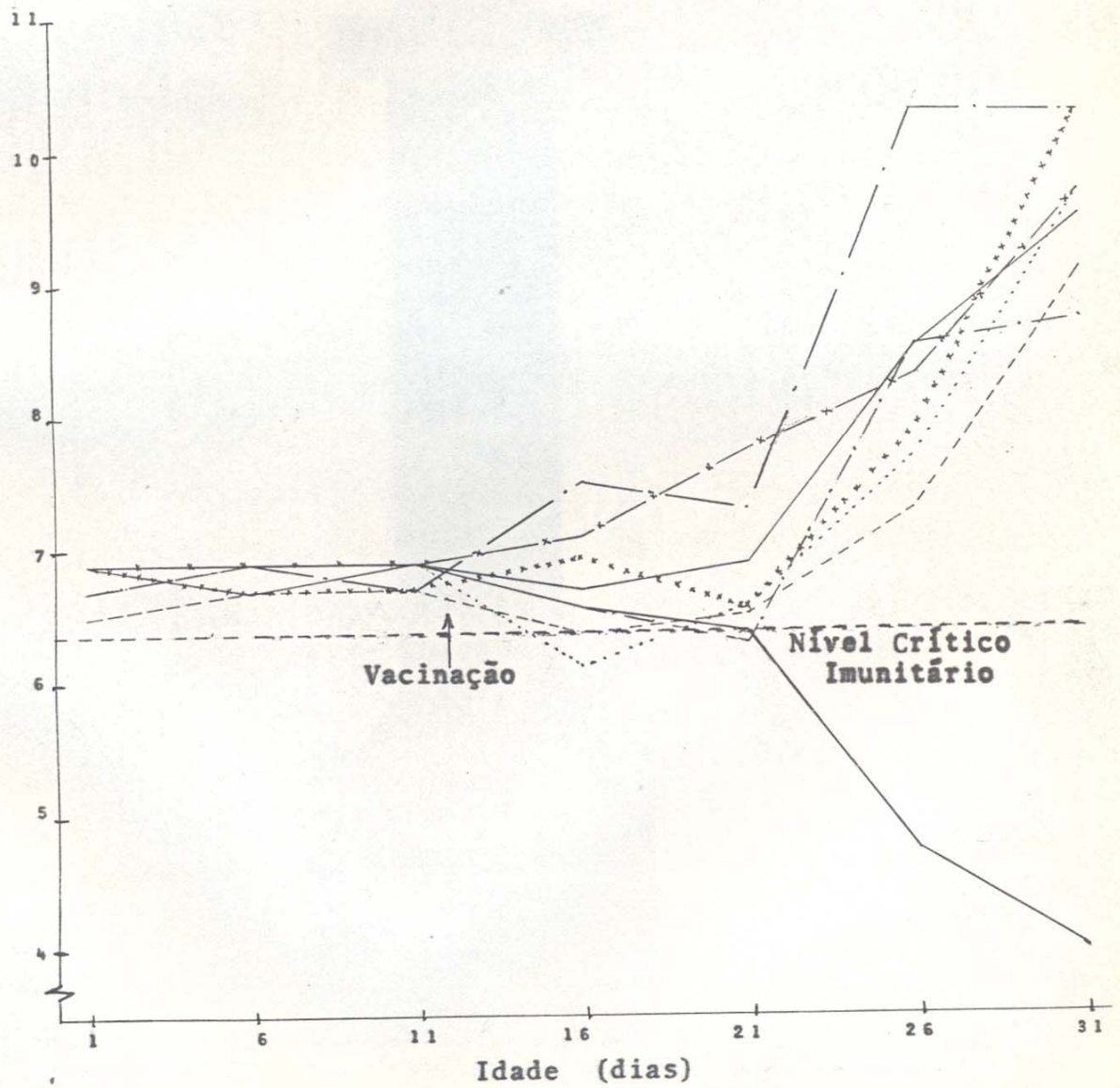


Fig. 1 - Título de anticorpos IH em aves vacinadas e não vacinadas contra a doença de Newcastle

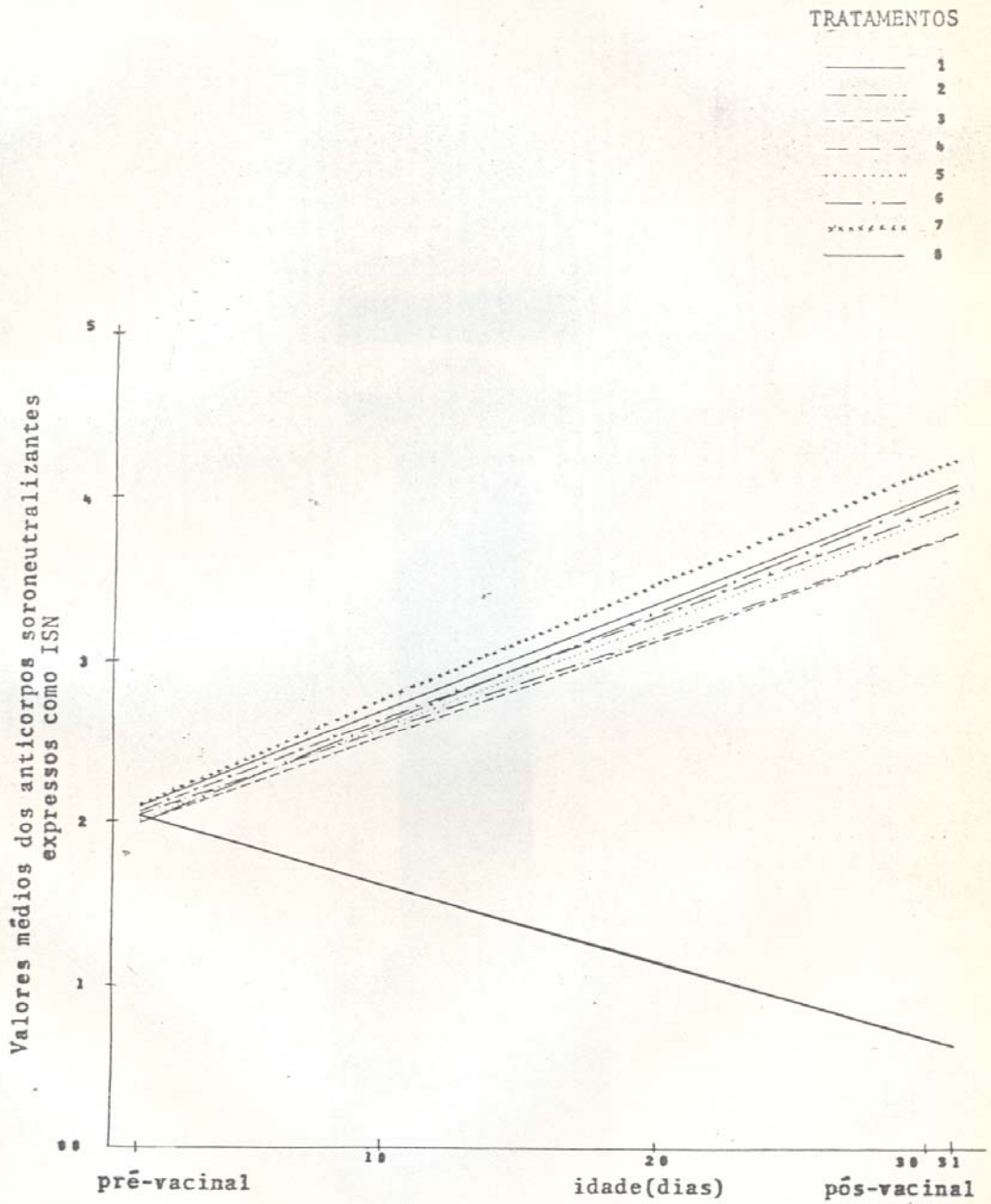


Fig. 2 - Título de anticorpos neutralizantes em aves vacinadas e não vacinadas contra a doença de Newcastle

Seven commercial lentogenic Newcastle disease vaccines, three of the B₁ strain and four of the La Sota strain, produced by four different manufacturers, covering nearly 80% of the Brazilian poultry vaccine market were studied.

All the vaccines were tested to evaluate their efficacy, being submitted to the following tests: purity, potency, antigen content, innocuity and stability.

The lentogenic strains were identified on the basis of their response to five tests: Mean Death Time (MDT), Intracerebral Pathogenicity Index for day old chicks (ICPI), heat stability of the hemagglutinin, stability of infectivity at pH 3 and agglutination of horse erythrocytes.

No differences were found in the resistance to intramuscular challenge exposure with 10^5 Embryo Lethal Dose₅₀ (ELD₅₀) of a velogenic viscerotropic Newcastle strain isolated from a field case, neither between the strains nor the producing laboratories.

Two La Sota vaccines and one B₁ vaccine from three laboratories, exhibited 90% protection or higher.

Under carefully controlled conditions, chicks with congenital passive immunity, vaccinated at twelve days of age, elicited average responses of 89.3% protection for $10^{6.59}$ EID₅₀/dose and 87.5% protection for vaccinal titers of $10^{5.87}$ EID₅₀/dose.

Three La Sota vaccines were stable in their vaccinal titer until the expiration date.

All of the vaccines were satisfactory, both in the innocuity and purity tests.

The IH antibodies showed the greater rise in titer 19 days after vaccination, being significantly higher for La Sota strain.

The passive immunity interfered with the formation of active immunity, in all the B₁ vaccines and in one La Sota vaccine.

The SN antibodies showed better correlation with the immunity afforded by the vaccines than the IH antibodies.

Differences were found in the typing of the lentogenic strains as compared with the standard values.

9. Referências Bibliográficas

- AHMED, H.N.; IBRAHIM, S.N.; BARHOUMA, N.D.; SAAD, Z.; KACHIC, I.; FAHMY, F. Stabilizer for lyophilization of Newcastle virus vaccines. J.Egypt.Vet.Med.Ass., Cairo, 32:1-6, 1971. (Vet.Bull., Farnham Royal, 41: 3372, 1971).
- AL-HILLY, N.; AHMED, I.A.; AL-DOOVY, J.M. & MAHMOOD, J.S. Effect of filtering Newcastle disease drinking water vaccine (B₁ strain). Am.J.Vet.Res., Schaumburg, 31:2275-7, 1970.
- ALLAN, W.H. Advances in immunization against Newcastle disease. Vet.Annu., London, 15:140-3, 1975.
- ALLAN, W.H. The problem of Newcastle disease. Nature, Basingtoke, 234:124-31, 1971.
- ALLAN, W.H. Response to tissue culture derived Newcastle disease vaccines in the presence of maternal antibodies. Res.Vet.Sci., Oxford, 10:222-4, 1969.
- ALLAN, W.H. Seed virus requirements for Newcastle disease. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REQUIREMENTS FOR POULTRY VIRUS VACCINES, Lyon, 1973. Basel, S.

- Karger, 1974. p. 173-7. (Develop. Biol. Standard, 25).
- ALLAN, W.H. Selection of Newcastle disease challenge strains. In: INTERNATIONAL SYPOSIUM ON REQUIREMENTS FOR POULTRY VIRUS VACCINES, Lyon, 1973. Basel, S.Karger, 1974. p.351-6. (Develop. Biol. Standard, 25).
- ALLAN, W.H. Vaccination against Newcastle disease with an inactivated oil emulsion vaccine at day-old followed by aerosol application of La Sota vaccine at three weeks. Vet. Rec., London, 94:54-60, 1974.
- ALLAN, W.H. & DAWSON, P.S. Newcastle disease control by vaccination. Bull. Of. Int. Epiz., Paris, 79:35-42, 1973.
- ALLAN, W.H. & GOUGH, R.E. A standard hemmagglutination inhibition test for Newcastle disease. 2-Vaccination and challenge. Vet. Rec., London, 95:147-9, 1974.
- ALLAN, W.H.; LANCASTER, J.E.; TOTH, B. The production and use of Newcastle diseases vaccines. Roma, FAO, 1973. 114p.
- ALLER, B. & ALLAN, W.H. Stability of the La Sota strain of Newcastle disease virus in drinking water vaccines. Supl.Cient.Cons.Gen.Col.Vet.Esp., Madrid, 188:3-6,1970.
- ASPLIN, F.D. Immunization against Newcastle disease with a virus of low virulence(strain "F") and observations

- on subclinical infection in partially resistant fowls. Vet. Rec., London, 64:245-9, 1952.
- ATANASIU, P. & GAREAU, G. Essais sur l'evolution des anticorps dans la maladie de Newcastle après la vaccination. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 80:674-7, 1951.
- BALLA, L.; PAPÖCSI, L.; SZUROP, I.; TOTH, B. Efficacy of methods of immunization against Newcastle disease . II. Immunization of chicks up to ten weeks of age by adding the La Sota strain of virus to drinking water. III. Immunization by exposure to aerosols of La Sota virus. Mag. Allart. Lapja, 31:75-80; 80-4, 1976.
- BANKOWSKI, R.A. Anamnestic response to vaccination as measures by hemagglutination inhibition antibodies to Newcastle disease virus. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REQUEREMENTS FIR POULTRY VIRUS VACCINES, Lyon, 1973. Basel, S. Karger, 1974. p. 357-68. (Develop. Biol. Standard., 25).
- BANKOWSKI, R.A. Newcastle disease vaccine for poultry. California, s.ed., 1972. 6p.(mimeografado, EPM-208) .
- BANKOWSKI, R.A. & CORTSVET, R.E. Nature of immunity to Newcastle disease in vaccinated chickens. I. Influence of residual resistance upon the level and duration of

- immunity following revaccination. Avian Dis., College Station, 6:333-48, 1962.
- BANKOWSKI, R.A. & ROSENWALD, A.S. Poultry vaccination... Why and How. s.l., University of California, 1956. 19p. (Circular, 455).
- BEACH, 1942. apud BEAUDETTE, F.R. Twenty years of progress in immunization against virus disease of birds. J. Am. Vet. Med. Ass., Schaumburg, 115:232-377, 1949.
- BEARD, C.W. & EASTERDAY, B.C. The influence of the route of administration of Newcastle disease virus on host response. I. Serological and virus isolation studies. J. Infect. Dis., Chicago, 117:55-74, 1967.
- BEAUDETTE, F.R. Twenty years of progress in immunization against virus disease of birds. J. Am. Vet. Ass., Schaumburg, 115:232-377, 1949.
- BEAUDETTE, F.R. & BIVINS, J.A. The influence of passive immunity on the response to intramuscular and intranasal administration of Newcastle disease virus. Cornell Vet., Ithaca, 43:513-31, 1953.
- BEAUDETTE, F.R.; BIVINS, J.A.; MILLER, B.R. Newcastle disease immunization with live virus. Cornell Vet., Ithaca, 39:302-34, 1949.

- BENGELSDORF, H.J. Antigenic and immunization studies on the B₁, vaccine strain against Newcastle disease virus field strains from fowls, turkey and psittacines. Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B., Berlin, 21:22-31, 1974. (Vet. Bull., Farnham Royal, 44:4435, 1974).
- BENSON, H.N.; WENGER, D.P.; BEARD, P.D. Efficacy of a commercial Newcastle vaccine against velogenic viscerotropic Newcastle disease virus. Avian Dis., College Station, 19:566-72, 1975.
- BITO, Y. & SAWAI, M. Immunological memory in antibody response against Newcastle disease virus. Bull. Osaka Prefect., Osaka, 25:1-9, 1973. (Vet. Bull., Farnham Royal, 44:4433, 1974).
- BORNSTEIN, B.S.; RAUTESTEIN-ARAZI, A.; SAMBERG, Y. Some aspects of congenital passive immunity to Newcastle disease in chicks. I. The transfer of hemagglutinin inhibitors from the maternal yolk to the chick. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 13:373-8, 1952a.

BORNSTEIN, B.S.; RAUTENSTEIN-ARAZI, A.; SAMBERG, Y. Some aspects of congenital passive immunity to Newcastle disease in chicks. II. The relationship of maternal hemmagglutination-inhibition titers in baby chicks to their actual immunity. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 13:397-82, 1952b.

BRANDLY, C.A., 1946. apud BEAUDETTE, F.R. Twenty years of progress in immunization against virus disease of birds. J. Am. Vet. Med. Ass., Schaumburg, 115:232-3, 1949.

BUTTERFIELD, W.K.; DAIRDIRI, A.H. & YEDLOUTSCHING, R.J. Protection of chickens afforded by commercial lentogenic vaccines against challenge exposure to velogenic Newcastle disease virus. Avian Dis., College Station, 17:279-83, 1973.

CHANGING face of Newcastle disease control. Vet. Rec., London, 87:804-6, 1970.

CHOLAKOVA, R. Problems concerning the production of

- Newcastle disease vaccine from La Sota strain of virus. Vet. Med. Nauki, Sofía, 13:79-84, 1976. (Vet. Bull., Farnham Royal, 46:5689, 1976).
- CREANGA, E.; ELEFTERESCU, A.; BALACI, M.; DAN, F.; POPESCU, E.; MAYEL, E.; LONESCU, V.; SATNOIAUNU, I.; BARBULESCU, I. Trials of B₁, Newcastle disease vaccine. I. Single dose vaccination. II. Primary and booster dose. Rev. Zoot. Med. Vet., Bucarest, 22:67-79, 1972. (Vet. Bull., Farnham Royal, 42:5817, 1972).
- CUNNINGHAM, C.H. Virologia Practica. 6. ed., Zaragoza, Acribia, 1971. 260p.
- DAVIDSON, I. Testing veterinary vaccines. Vet. Rec., London, 97:389-92, 1975.
- DAWSON, P.S. Epidemiological aspects of Newcastle disease. Bull. Off. Int. Epiz., Paris, 79:27-34, 1973.
- DOLL, E.R.; McCALLUM, W.T.; WALLACE, M.E. Immunization of chicks hatched from hens immunized against Newcastle disease. Vet. Med., Bonner Springs, 45:365-9, 1950.
- ERRADICATE or live with exotic Newcastle? Poult. Digest, Sea Isle City, 32:106-11, 1971.
- FABRICANT, J. Studies on the diagnosis of Newcastle disease and Infectious Bronchitis. I. The HI test for the diagnosis of Newcastle disease. Cornell Vet., Ithaca, 39:202-20, 1949.

- HANSON, R.P. Newcastle disease virus as an enveloping pathogen. Madison, Univ. Wisconsin Press, 1964. 250p.
- HANSON, R.P. Newcastle disease virus seed culture. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REQUIREMENTS FOR POULTRY VIRUS VACCINE, Lyon, 1973. Basel, S. Karger, 1974. (Develop. Biol. Standard., 25).
- HANSON, R.P. The reemergence of Newcastle disease. Adv. Vet. Sci. Comp. Med., New York, 18:213-30, 1974.
- HANSON, R.P. & BRANDLY, C.A. Identification of vaccine strains of Newcastle disease virus. Science, London, 122:156-7, 1955.
- HANSON, R.P.; SPALATIN, J.; ESTUPINAN, J.; SCHLDER, G. Identification of lentogenic strains of Newcastle disease virus. Avian Dis., College Station, 11:49-53, 1967.
- HIRST, R.G. & RUSSELL, R.G. A method for detecting Newcastle disease virus of low virulence in poultry vaccines. Aust. Vet. J., Melbourne, 47:119-21, 1971.
- HITCHNER, S.B. Further observations on a virus of low virulence for immunizing fowls against Newcastle disease. Cornell Vet., Ithaca, 40:60-70, 1950.
- HITCHNER, S.B., ed. Isolation and identification of avian pathogens. College Station, American Association for Avian Pathologists, 1975. 381p.
- HITCHNER, S.B. & JOHNSON, E.P. A virus of low virulence for immunizing fowls against Newcastle disease. Vet.

- Med., Booner Springs, 43:525-34, 1948.
- HITCHNER, S.B.; REISING, G.; VAN ROEKEL, H. Characteristics of B₁ strain of Newcastle disease virus. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 12:246-9, 1951.
- HOFSTAD, M.S. The secondary immune response in chickens revaccinated with inactivated Newcastle disease vaccine. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 15:604, 1954.
- JANSSEN, W. & KALETA, E.F. The immune response of congenitally immune chicks vaccinated with Hitchner B₁ and La Sota strains of Newcastle disease virus administered through the drinking water. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REQUIREMENTS FOR POULTRY VIRUS VACCINE, Lyon, 1973. Basel, S. Karger, 1974. p.364-75. (Develop. Biol. Standard., 25).
- JANSSEN, W. & LUDERS, H. Comparative studies on the development of hemagglutination inhibition antibodies after vaccination against Newcastle disease with La Sota and B₁ strains, and the appearance of any side-effects in field trials. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr., Hannover, 78:579-81, 1971.
- JOHNSON, E.P.; HANSON, R.P.; ROSENWALD, A.S.; ROEKEL, H. The responsibility of state and federal agencies in the improvement of poultry vaccines. J. Am. Med. Ass., Schaumburg, 125:441-6, 1954.
- KALETA, E.F. Kinetics of Newcastle disease antibodies in

- fowls. III. Elimination of maternal antibodies in chicks. Detsch. Tieraztl. Wochenschr., Hannover, 79:184-7, 1972.
- KEEBLE, S.A. & WADE, J.A. Inactivated Newcastle disease vaccine. J. Comp. Path., London, 73:186, 1963.
- KREIMER, Y.K.; BORISOVICH, Y.F.; KACHAKHIDZE, A.V.; ASPANIDZE, K.G. Immunity in chicks inoculated with freeze-dried virus vaccine of the La Sota strains. Veterinariya, Moscow, 7:47-9, 1969. (Vet. Bull., Farnham Royal, 46:678, 1976).
- LANCASTER, J.E. Newcastle disease; control by vaccination. Vet. Bull., Farnham Royal, 34:56-77, 1964.
- LANCASTER, J.E. The world distribution of Newcastle disease - 1961. Canad. J. Comp. Med., London, 26:244, 1962.
- LANDGRAF, H. & VIELITZ, E. Experiments on the immunization of chicks against Newcastle disease. Deutsch. Tierarztl. Wochenschr., Hannover, 79:493-500, 1972.
- LARSKI, Z. Comparative studies on the immunogenic value of attenuated "early" and "late" strains of Newcastle disease virus. Arch. Wet. Polski, Poland, 2:403-17, 1968.

- LARSKI, Z. & WISNIEWSKI, J. Change in some properties of attenuated strains of Newcastle disease virus as a result of serial passage in normal fowl serum. Polskie Archiw. Wet., Olztyn, 15:417-22, 1972a. (Vet. Bull., Farnham Royal, 43:2530, 1973).
- LARSKI, Z. & WISNIEWSKI, J. Immunizing properties of Newcastle disease virus strains obtained by serial passage of prematurely harvested virus in chick embryo. Polskie Archiw. Wet., Olztyn, 15:422-30, 1972b. (Vet. Bull., Farnham Royal, 43:2531, 1973).
- LENSING, H.H. Newcastle disease live virus vaccine testing. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REQUIREMENTS FOR POULTRY VIRUS VACCINES, Lyon, 1973. Basel, S. Karger, 1974. p. 189-94. (Develop. Biol. Standard., 25).
- LOMMICZI, B. Thermostability of Newcastle disease virus strain of different virulence. Arch. Virol., Budapest, 47:249-55, 1975. (Vet. Bull., Farnham Royal, 45:3809, 1975).
- LUTHEGEN, W. Formation of hemagglutination inhibiting of caged birds with the Hitchner-B₁ drinking water vaccine and effect on eggs production of incompletely vaccinated or unvaccinated birds. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr., Hannover, 78:539-42, 1971.
- MALIK, B.S. & DHAWEDKAR, R.G. Immune and antibody response of a newly isolated lentogenic strain of Newcastle

- disease virus in poultry. Avian Dis., College Station, 14:400-3, 1970.
- MARTHEDAL, H.E.; VELLING, G.; BADSTUE, P.B. The application of hemagglutination-inhibition test in the control of Newcastle disease. Bull. Off. Int. Epiz., Paris, 79:51-8, 1973.
- MARKHAM, F.J.; COX, H.R.; BOTTORF, C.A. A serologic study in vaccination and revaccination. Cornell Vet., Ithaca, 44:324-45, 1954.
- MARTONE, F.; PAGNINI, P.; BONADUCE, D.; GATTI, A. Ricerche sulla differenziazione dei ceppi patogeni e attenuati del virus della malattia di Newcastle. Atti. Soc. Ital. Sci. Vet., Faenza, 27:618-20, 1973.
- MENASSE, I. Vaccins contre les principales maladies infectieuses aviaires dues à des virus. Rapports entre vaccins, maladie et milieu ambiant. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REQUIREMENTS FOR POULTRY VIRUS VACCINE, Lyon, 1973. Basel, S. Karger, 1974. p.339-50. (Develop. Biol. Standard., 25).
- MEULEMANS, H.G.; VINDEVOGEL, H.; HALEN, P.; WIDAR, J. Vaccination contre la maladie de Newcastle. Application de la technique d'aérosol à la vaccination des poussins d'un jour porteurs d'anticorps homologues d'

- origine maternelle. Ann. Med. Vet., Bruxelles, 119:159-66, 1975.
- MONREAL, G.D.; KRAFT, V.; BAUMER, R.J. The minimal immunogenic dose of lentogenic Newcastle disease virus given by various routes. Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr., Berlin, 85:453-5, 1972.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Subcommittee on avian disease. Washington, D. C. Methods for examining poultry biologics and for identifying and quantifying avian pathogens. Washington, D.C., National Academy of Sciences, 1971. 326p.
- NEDELICIN, D.; ALBOIN, M.; TIGAIREU, N.; POPCI, E. Factors affecting the freez-drying of Newcastle disease virus strain to form a collection. Lucral Inst. Cer. Vet. Biop. Past., Bucaresti, 10:81-92, 1973. (Vet. Bull., Farnham Royal, 44:3119, 1974).
- NEWCASTLE disease control: after the change. Vet. Rec., London, 88:573-6, 1971a.
- NEWCASTLE disease control: the priority is vaccination. Vet. Rec., London, 89:509-12, 1971b.
- OWOLODIN, B.I. & AJIBOYA, E.A. Newcastle disease vaccines: a study of duration of immunity and properties of La Sota vaccine given in drinking water. Br. Vet. J., London, 13:580-5, 1975.
- PIRAINO, F.P. An *in vitro* method for the identification

- of strains of Newcastle disease virus. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 21:125-7, 1960.
- QUAGLIO, G.; LOMBARDI, D.; FRANCHINI, A. Immune response to vaccination live Newcastle disease virus and killed emulsified virus in chicks without specific parenteral antibodies or with high antibody titres. Folia Vet. Lat., Milano, 5:353-72, 1975. (Vet. Bull., Farnham Royal, 46:5026, 1976).
- QUAGLIO, G.; LOMBARDI, D.; MAESTRINI, N. Studio della immunit  indotta nel pollo dal virus della malattia di Newcastle, ceppo La Sota in rapporto alla via di somministrazione. Nuova Vet., Bologna, 49:239-42, 1973.
- RAGGI, L.G. & LEE, G.G. Further observations on the response of birds to one intranasal vaccination with the B₁ strain of Newcastle disease vaccine. Avian Dis., College Station, 6:297, 1962.
- REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent end point. Am. J. Hyg., Baltimore, 27: 493-7, 1938.

- ROEPKE, W.J. The control of Newcastle disease in the Northerlands. Bull. Off. Int. Epiz., Paris, 79:43-50, 1973.
- ROSENWALD, A.S. A basis for realistics requirements for poultry vaccines. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REQUIREMENTS FOR POULTRY VIRUS VACCINES, Lyon, 1973. Basel, S. Karger, 1974. p. 295-300. (Develop. Biol. Standard, 25).
- SANTOS, J.A.; SILVA, K.A.; BRADA, W.; MARINHO, E.; CUNHA, R.C. Sobre a ocorrência de Newcastle no Brasil. Rev. Mil. Rem. Vet., Rio de Janeiro, 14:9-11, 1954.
- SHAKOUR, A.; ISMAIL, N.A.; AHMED, H.N.; EL AGROUDI, M.A.; IBRAHIM, K. Immune response to Newcastle disease vaccination. Influence of route and virus concentration of B₁ vaccine. J. Egypt. Vet. Med. Ass., Cairo, 31: 105-18, 1971. (Vet. Bull., Farnham Royal, 42:6308, 1972).
- SINHA, S.K. Influence of temperature of incubation of embryonating eggs following inoculation of Newcastle disease virus. Avian Dis., College Station, 2:138-47, 1958.
- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. Statistical Methods. 6ed, Ames, Iowa State University Press, 1967. 539 p.

- TAVASSOLI, A. Immune response of chickens to four lentogenic strains of Newcastle disease virus propagated in lamb kidney cell cultures. Arch. Inst. Razi, Teheran, 23:129-35, 1971.
- TAVASSOLI, A. Studies on the immunogenic properties of three lentogenic strains of Newcastle disease virus. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REQUIREMENTS FOR POULTRY VIRUS VACCINES, Lyon, 1973, Basel, S. Karger, 1974. p.195-204. (Develop. Biol. Standard., 25):
- TODOROVA, P. Lyophilization of viruses and virus vaccine. III. Protective media in the lyophilization of strains Komarov and La Sota of Newcastle disease virus. Vet. Med. Nauki, Sofia, 10:49-53, 1973. (Vet. Bull., Farnham Royal, 44:145, 1974).
- U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Veterinary Services. Standard requirements of Newcastle live virus vaccines. Hyattsville, Md., 1970. 8p.
- VOLTEU, A.C. & LAARHOVEN, P.Y.M. van. Immunization against Newcastle disease by intramuscular injection of

La Sota strain vaccine, a field trial. Tijdsch. Dieger., Utrecht, 100:888-93, 1975. (Vet. Bull., Farnham Royal, 46:1343, 1976).

WINTERFIELD, R.W.; GOLDMAN, C.L.; SEADALE, E.H.

Newcastle disease immunization studies. IV. Vaccination of chickens with B₁, "F" and La Sota strains of Newcastle disease virus administered through drinking water. Poult. Sci., College Station, 36:1076-88, 1957.

WINTERFIELD, R.W. & SEADALE, E.H. Newcastle disease immunization studies. II. The immune response of chicks vaccinated with B₁ Newcastle disease virus administered through the drinking water. Poult. Sci., College Station, 36:54-65, 1957a.

WINTERFIELD, R.W. & SEADALE, E.H. Newcastle disease immunization studies. III. The immune response of chickens vaccinated at an early age with B₁ Newcastle disease virus administered through the drinking water. Poult. Sci., College Station, 36:65-70, 1957b.

WOERNLE, H. SCHOLTYSSEK, S. Newcastle disease immunization of broilers with Hitcher-B₁ and La Sota strain virus vaccine. Arch. Gefluegek., Stuttgart, 36:201-6, 1972.