



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
POSTGRADO EN MEDICINA VETERINARIA  
ESPECIALIZACIÓN EN MEDICINA AVIAR



VACUNAS RECOMBINANTES VS VACUNAS CLÁSICAS EN LA  
PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

Autor: M.V.Z. Samuel Enrique Jaimes Meneses

Tutor: M.V. Esp. MSc. Rosmar V. Marcano Martí

Maracay, Noviembre 2015



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
POSTGRADO EN MEDICINA VETERINARIA  
ESPECIALIZACIÓN EN MEDICINA AVIAR



VACUNAS RECOMBINANTES VS VACUNAS CLÁSICAS EN LA  
PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

Autor: M.V.Z. Samuel Enrique Jaimes Meneses

Tutor: M.V. Esp. MSc. Rosmar V. Marcano Martí

Trabajo de Grado Presentado ante la Facultad de Ciencias Veterinarias de la  
Universidad Central de Venezuela como Requisito para  
Optar al Título de Especialista en Medicina Aviar

Maracay, Noviembre 2015



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



## VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el **Trabajo Especial de Grado** presentado por: **M.V. SAMUEL E. JAIMES M.**, Pasaporte N° AO579978, bajo el título "EFICIENCIA DE LAS VACUNAS RECOMBINANTES VS VACUNAS CLÁSICAS EN LA PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN POLLOS DE ENGORDE EN VENEZUELA", a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **ESPECIALISTA EN MEDICINA AVIAR**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 16 de diciembre de 2015 a las 3:00 p.m., para que el autor lo defendiera en forma pública, lo que éste hizo en el Salón de Usos Múltiples de Postgrado, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLO**, por considerar, sin hacerse solidario con las ideas expuestas por el autor, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado hace una recopilación importante de información relacionada a la enfermedad de Newcastle y las vacunas utilizadas para su control.

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 16 días del mes de diciembre del año 2015, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinadora del jurado la M.V., Esp. MSc., Rosmar Marcano.

M.V., MSc. Antonio Rodríguez  
C.I. No. 6.328.560  
FCV-UCV



MV, MSc. Dra. Adriana Méndez  
C.I. No. 7.271.927  
FCV-UCV

M.V., Esp. MSc. Rosmar Marcano  
C.I. No. 9.697.838  
FCV-UCV  
Tutor(a)

AR/AM/RM  
16/12/2015

## DEDICATORIA

*A Dios, porque cada día me regala el don de la vida, me concede inteligencia para adquirir nuevos conocimientos y es la fuerza espiritual que ilumina cada uno de los pasos que doy a nivel personal y profesional.*

*A mi padre, Jorge Enrique Jaimes que es mi modelo a seguir, la persona que se ha sacrificado para apoyarme en todos los proyectos que he emprendido en la vida. Taita espero te sientas orgulloso de tu único hijo.*

*A mi madre, Zoraida Meneses de Jaimes por comprenderme, ayudarme y darme su amor incondicional durante el tiempo que estuve fuera de casa luchando por cumplir un objetivo profesional.*

*A mi novia, Isolina Marval porque me has dado felicidad, por ser la mujer con la que he compartido triunfos a nivel personal y profesional. Caraqueña gracias por tu amor y por brindarme el cariño de tu familia.*

*A mi país, Colombia tierra de gente buena, trabajadora y servicial. Pronto regresare a pisar tu suelo, escuchar tu música, oler el campo de tus flores, disfrutar del aroma del café y aportar un poco de lo que he aprendido para tu crecimiento y progreso. Dios te cuide y te bendiga porque eres tierra de amor y pasión.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias y todos los docentes de postgrado por haberle dado la oportunidad a un extranjero de estudiar, aprender y aplicar nuevos conocimientos en el área de medicina aviar.

Agradezco a la MV. MSc Rosmar Marcano Martí por brindarme su apoyo, sus conocimientos e invertir un poco de su tiempo en la elaboración del trabajo de prácticas profesionales y la presente monografía de grado.

Agradezco al Sc. Ds., Elías Ascanio Evanoff y su familia por abrirme las puertas de su casa desinteresadamente y ofrecerme su sincera amistad.

Por último agradezco a Venezuela, país que me dio la oportunidad de conocer diversidad de cultura, variedad de paisajes naturales, que me permitió cultivar amistades como las de la familia Marval Pérez, Pérez Ibarra, Farías Kovac. Por enseñarme a madurar en muchos aspectos personales y ayudarme a formar un carácter. Dios guarde, bendiga y proteja a este bello país.

## RESUMEN

Desde su reconocimiento en 1926, la enfermedad de Newcastle se considera endémica en muchos países. La vacunación y las medidas de bioseguridad son fundamentales para su control. El agente etiológico es un paramyxovirus de cadena ARN simple y sentido negativo. Según su virulencia, las cepas del virus se clasifican en asintomáticas, lentogénicas, mesogénicas y velogénicas. En el presente trabajo se realizó una revisión sobre las características de las vacunas aplicadas en unidades de producción avícola contra el virus de la enfermedad de Newcastle. Las vacunas se clasifican en vacunas de virus vivo (VVV), vacunas resistentes al calor (VRC), vacunas de virus inactivado (VVI) y vacunas recombinantes. Se encontró que las VVV y las VRC son económicas, de fácil aplicación, pueden presentar reacciones postvacunales y excreción de virus. Las VVI requieren su aplicación ave por ave, son más costosas, requiriendo aplicación de refuerzos en campo con VVV, pueden presentar reacciones postvacunales y excreción de virus. Las vacunas recombinantes son costosas, requieren alta tecnología para su conservación y aplicación, se deben aplicar *in ovo* o al primer día de edad, no presentan reacciones postvacunales y poca o nula excreción de virus. El presente trabajo busca determinar mediante una revisión bibliográfica la eficiencia de las vacunas recombinantes vs las vacunas clásicas en la prevención de la enfermedad de Newcastle. En Venezuela los planes de vacunación utilizados han incluido combinaciones de VVI y VVV, sin embargo, ya existen en el país vacunas recombinantes de herpesvirus de pavo, las cuales, aunque pueden aplicarse como vacuna única, es recomendable aplicar refuerzos con VVV para potenciar su eficacia a causa de las cepas velogénicas circulantes en el país.

Palabras claves: Enfermedad de Newcastle, vacuna recombinante,

Reacciones postvacunales, virus, cepas velogénicas.

## ABSTRACT

Since its recognition in 1926, Newcastle disease is considered endemic in many countries. Vaccination and biosecurity measures are essential for its control. The causative agent is a single-stranded RNA negative sense paramyxovirus. According to its virulence, the virus strains are classified as asymptomatic, lentogenic, mesogenic and velogenic. In the present work a review about the characteristics of the vaccines given in units of poultry against the virus of Newcastle disease was performed. Vaccines are classified as live virus vaccines (LVV), heat resistant vaccines (HRV), inactivated virus vaccines (IVV) and recombinant vaccines. It was found that the LVV and the HRV are inexpensive, easy to apply, post-vaccination reactions may occur and there is virus excretion. The IVV requires bird per bird application, are more expensive, requiring application of reinforcements LVV, post-vaccination reactions may occur and there is virus excretion. Recombinant vaccines are expensive, require high technology for conservation and application, must be applied *in ovo* or the first day of age, have no post-vaccination reactions and little or none virus excretion. This work seeks to determine through a literature review the efficiency of recombinant vaccines vs classical vaccines in preventing Newcastle disease In Venezuela vaccination plans used included combinations of IVV and LVV; however, already exist in the country recombinant vaccines based on turkey herpesvirus, which, although they can be applied as a single vaccine, it is recommended to apply reinforcements to enhance its effectiveness LVV because of velogenic strains circulating in the country.

Keywords: Newcastle diseases, recombinant vaccines, post-vaccination reactions, virus, velogenic strains.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN	1
Planteamiento del problema	1
OBJETIVOS	3
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Generalidades	4
Agente etiológico	4
Identificación del agente	8
Identificación del virus	10
Índice de patogenicidad	11
Definición de la enfermedad de Newcastle	12
Base molecular de la patogenicidad	13
Signos clínicos	14
Lesiones macroscópicas y microscópicas	16
Patogenicidad	21
Inmunología del ave asociada a mucosas	22
Inmunidad humoral	24
Linfocitos	24
Órganos linfoides	25
Respuesta inmune innata a la infección por VEN en aves de corral	31
La respuesta de anticuerpos a la infección y la vacunación con VEN	33
Inmunidad celular inducida por el virus de Newcastle	34



Características de las vacunas contra el virus de la enfermedad de Newcastle	36
<i>Cepas vacunales</i>	36
<i>Tipos de vacunas contra VEN</i>	38
<i>Vacunas inactivadas</i>	39
<i>Vacunas vivas</i>	39
<i>Vacunas tolerantes al calor</i>	41
<i>Vacunas mesogénicas</i>	41
<i>Vacunas recombinantes</i>	42
Administración de vacunas contra VEN	44
Excreción del VEN y reacciones postvacunales	47
Planes de vacunación para el control del virus de Newcastle en Venezuela	51
Cepas vacunales utilizadas para el control de Newcastle en Venezuela	58
CONCLUSIONES	60
RECOMENDACIONES	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Comparativo de las vacunas utilizadas contra el VEN	50
Tabla 2. Plan de vacunación cerrado	52
Tabla 3. Plan de vacunación simple	52
Tabla 4. Plan de vacunación estándar empresa privada 2007	53
Tabla 5. Plan de vacunación estándar para los años 2007-2008	53
Tabla 6. Plan de vacunación estándar para los años 2011-2012	53
Tabla 7. Plan de vacunación estándar para los años 2013-2014	54
Tabla 8. Plan de vacunación estándar para el año 2015	54
Tabla 9. Cepas vacunales para el control de Newcastle	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. A. Virión de VEN. B. Virión de VEN con emergencia de la nucleocápside. C. Esquema estructural de VEN.	6
Figura 2. A. Congestión hemorrágica en la tráquea. B. Hemorragia conjuntival. C. Edema facial, blefaritis. D. Úlceras en el intestino delgado. E. Proventriculitis y focos hemorrágicos en el proventrículo. F. Hemorragia en las tonsilas cecales.	20
Figura 3. Estructura del GALT en aves. A. Tonsila esofágica. B. Tonsila pilórica. C. Placa de Peyer. D. Divertículo de Meckel. E. Tonsila cecal.	29
Figura 4. Detalle de las células ciliadas que cubren al BALT de los bronquios en aves.	30
Figura 5. Mecanismo de reconocimiento de anticuerpos vacunales y de virus salvaje de una vacuna recombinante DIVA.	43

## **INTRODUCCIÓN**

### **Planteamiento del problema**

Desde su reconocimiento en 1926, la enfermedad de Newcastle (EN) se considera endémica en muchos países. La vacunación profiláctica se practica en casi todos los países productores de aves de corral a escala comercial (OIE, 2014).

La EN está causada por cepas virulentas del paramixovirus aviar tipo 1 (PMVA-1). Los paramixovirus aislados procedentes de especies aviares se han clasificado mediante pruebas serológicas y análisis filogenéticos en diez subtipos, denominados PMVA-1 a PMVA-10 (Miller *et al.*, 2010); el virus de la EN (VEN) se ha denominado PMVA-1 (Alexander y Senne, 2008).

Es una de las enfermedades más sobresalientes de las aves, junto con la influenza aviar altamente patógena. El agente etiológico es un virus ARN no segmentado, del género *Avulavirus*, subfamilia *Paramyxovirinae* y familia *Paramyxoviridae* (Alexander y Senne, 2008). Es un agente altamente contagioso, que afecta a más de 200 especies de aves (OIE, 2014).

El impacto económico de la enfermedad radica en la disminución de la producción de los planteles avícolas afectados y la alta tasa de mortalidad, teniendo en cuenta que las cepas virulentas producen infecciones que pueden causar la muerte del 100% de las aves no vacunadas. Como medida de control de la enfermedad, por su eficacia, se ha establecido la vacunación rutinaria contra el virus de todas las aves comerciales. Sin embargo, los signos clínicos y las lesiones patológicas por si solos no sugieren la presencia de la enfermedad, no hay signos patognomónicos y se requiere del aislamiento del virus como diagnóstico confirmativo. La serología se utiliza fundamentalmente en la evaluación de programas de vacunación y en la vigilancia epizootiológica en zonas de riesgo. Para el control de la

enfermedad se utiliza la combinación de medidas de bioseguridad junto con la aplicación de vacunas vivas e inactivadas las cuales tienen como objetivo proteger a las aves de la enfermedad clínica severa y disminuyen la excreción viral (Cuello *et al.*, 2011).

Una de las propiedades más características de las distintas cepas del VEN es su enorme variación respecto a la patogenicidad en los pollos, esto implica que la sola infección por VEN no necesariamente es causal de pérdidas económicas severas. Las cepas del VEN se agrupan en cinco patotipos en base a los signos clínicos observados en los pollos infectados (Alexander y Senne, 2008).

Las agrupaciones en patotipos casi nunca están claramente definidas (Alexander y Allan, 1974), e incluso en infecciones de aves libres de patógenos específicos (SPF) se puede apreciar un considerable solapamiento.

Además, puede tener lugar una exacerbación de los signos clínicos inducida por las cepas más benignas si se superponen infecciones por otros microorganismos o en caso de condiciones medioambientales adversas. Como los signos de la enfermedad clínica en pollos varían ampliamente y el diagnóstico puede complicarse posteriormente por las diferentes respuestas a la infección en los distintos hospedadores, los signos clínicos por sí solos no son fiables para el diagnóstico de la EN. Sin embargo, los signos clínicos y las lesiones asociadas con los patotipos virulentos proporcionarán una fuerte sospecha de enfermedad (OIE, 2014).

En Venezuela, la enfermedad fue reconocida por primera vez en 1950 (De Hoguera *et al.*, 2000), desde entonces se ha constituido en un problema sanitario constante para la producción de pollo de engorde en el país, por tal motivo se han desarrollado diferentes planes de vacunación utilizando

vacunas vivas, inactivadas y actualmente vacunas recombinantes o vectorizadas. El objetivo del presente trabajo es hacer una revisión bibliográfica actualizada que permita analizar la eficiencia de las vacunas recombinantes con respecto a las vacunas clásicas en la prevención de la enfermedad de Newcastle en pollo de engorde en Venezuela.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Analizar la eficiencia de las vacunas recombinantes versus vacunas clásicas en la prevención de la enfermedad de Newcastle en pollo de engorde en Venezuela.

### **Objetivos específicos**

Revisar la información bibliográfica relacionada con el agente etiológico de la enfermedad de Newcastle.

Analizar las ventajas y desventajas de las vacunas recombinantes frente a las vacunas clásicas relacionada con el agente etiológico de la enfermedad de Newcastle y su aplicación en pollos de engorde en Venezuela.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

### **Generalidades**

La enfermedad de Newcastle (EN) está causada por cepas virulentas de paramixovirus tipo 1 (PMVA-1), del género Avulavirus, perteneciente a la familia Paramyxoviridae. Existen diez serotipos de paramixovirus aviares, denominados PMVA-I a PMVA-10. Se ha demostrado que el virus de la EN (VEN) es capaz de infectar más de 200 especies de aves, pero la gravedad de la enfermedad causada depende de cuál sea el hospedador y la cepa del virus. Incluso las cepas de PMVA-1 de baja virulencia pueden inducir una enfermedad respiratoria grave si se exacerban por la presencia de otros microorganismos o por condiciones ambientales adversas. El método preferido de diagnóstico es el aislamiento del virus y su subsiguiente caracterización (OIE, 2014).

Durante los últimos años se viene investigando acerca de la enfermedad de Newcastle, especialmente en el control mediante la vacunación. El desarrollo y avances a nivel molecular proporcionan una ayuda importante generando nuevas estrategias de control y erradicación de la enfermedad (OIE, 2014).

La enfermedad de Newcastle pertenece a la lista única (antigua Lista A) de enfermedades emergentes de notificación obligatoria de la oficina Internacional de Epizootia (OIE, 2014); generando pérdidas directas por altas tasas de mortalidad de aves y además es una de las principales barreras sanitarias para el libre comercio de aves y sus productos entre los países en todo el mundo.

### **Agente etiológico**

La enfermedad de Newcastle (EN) está causada por virus específicos del paramixovirus aviar de tipo I (APMV-1) que es un serotipo del género Avulavirus perteneciente a la familia Paramyxoviridae. Existen nueve

serotipos de paramixovirus aviar designados desde APMV-I a APMV-9. (OIE, 2014). Sin embargo (Song *et al.*, 2011) citan que por lo menos 10 genotipos (genotipos I a X) se han descrito para el virus de Newcastle.

La APMV se clasifican en 10 serotipos APMV distintas (APMV-1-10), (Miller *et al.*, 2010). El genoma de NDV consiste aproximadamente 15 kb de longitud no segmentado de cadena ARN simple, sentido negativo, presenta cubierta lipídica, que lo hace sensible a los desinfectantes y codifica para seis proteínas, incluyendo nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), Proteína de fusión (F), proteína hemaglutinina neuraminidasa (HN), y la proteína polimerasa (L). Es importante mencionar que la Hemaglutinina y la Neuraminidasa, participan en los procesos de infección natural y son utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad. (ICA, 2009; Perozo *et al.*, 2012). Además, La proteína N, es un importante componente de la nucleocápside (Yusoff y Tan, 2001), es la proteína estructural más abundante y es responsable de la inducción de una fuerte respuesta inmune en el huésped (Makkay *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2003; Matsubara *et al.*, 2012). En la figura 1A se muestra un virión de VEN, en la figura 1B se muestra un virión de VEN con emergencia de la nucleocápside, la figura 1C muestra un esquema estructural de VEN.



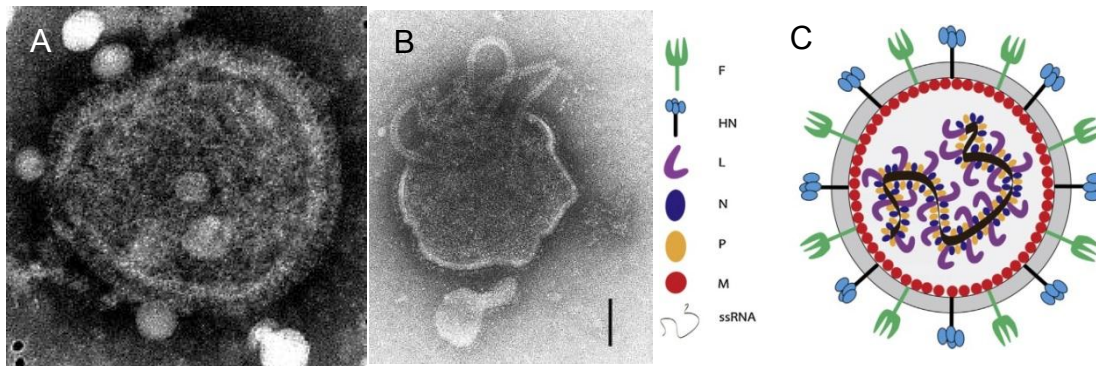


Figura 1. A. Virión de VEN. B. Virión de VEN con emergencia de la nucleocápside. C. Esquema estructural de VEN. Fuente: A. Mast y Demeestere (2009). B. Alexander y Senne (2008). C. Ganar *et al.* (2014).

La base molecular de la patogenicidad de NDV se ha demostrado que es altamente dependiente de la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión de la proteína F (Sánchez, 2013). Se requiere escisión del precursor de la glicoproteína de F0 a F1 y F2 por proteasas de la célula huésped para la progenie del virus a ser infecciosa. Aminoácidos dibásicos, que rodean el residuo de glutamina en la posición 114 y una fenilalanina en la posición 117, están presentes en las cepas mesogénicas o velogénicas, este motivo se utiliza como un marcador molecular de la virulencia (OIE, 2014).

Aunque NDV tiene sólo un serotipo, diversidad antigénica y genética sustancial, cepas de NDV se han clasificado en tres patotipos de menor a mayor virulencia: lentogénico, mesógeno, y velogénico. Las cepas lentogénicas están integradas por las cepas Hitchner B1, clon 30, LaSota y F, las cuales han sido ampliamente usadas como cepas vacunales. Además, las cepas ULSTER 2C; MCIIO y V4, son estables al calor, se replican en la mucosa intestinal y se consideran cepas asintomáticas (Moreno, 1994; Alexander *et al.*, 2004; Orsi *et al.*, 2009).

Por otra parte, las cepas mesogénicas o de virulencia media, como lo son la Roakin, Komarov, Meekteswar y H, que además han sido usadas ocasionalmente como cepas vacunales. Por último las cepas velogénicas o cepas virulentas, entre las cuales encontramos a las cepas Milano, Hertz 33, NY, Parrot 70181 y ESSEX 70, que son viscerotrópicas y la Texas GB neurotrópica, que han sido utilizadas como cepas de desafío (Moreno, 1994).

Para que un aislamiento del virus de Newcastle sea considerado como virulento debe presentar un índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) mayor a 0.7 y/o presentar múltiples aminoácidos básicos en el sitio de corte de la proteína de fusión y el aminoácido Fenilalanina en la posición 117 (OIE, 2014).

Algunas características importantes de este virus es la capacidad de aglutinar glóbulos rojos (GR), la cual se debe a la unión de la hemaglutinina-neuraminidasa proteína (HN) a los receptores en la superficie de los glóbulos rojos (Alexander y Senne, 2008).

La replicación del virus ocurre por la unión del virus a receptores de las células mediada por el polipéptido de HN. La fusión de las membranas viral y celular es provocada por la acción de la proteína de fusión (F), por lo tanto el complejo de la nucleocápside entra en la célula, la replicación del virus intracelular tiene lugar dentro del citoplasma, debido a que el ARN del virus tiene sentido negativo, la ARN - polimerasa dirigida por ARN (transcriptasa) debe producir transcripciones complementarias de sentido positivo que pueden actuar como ARN mensajero y utilizar mecanismos de la célula hospedadora que permite la traducción en proteínas y genomas de virus (Alexander y Senne, 2008). La maduración del virión involucra la incorporación en la membrana de la célula huésped de las proteínas virales sintetizadas en la envoltura. Posteriormente, se ubica la nucleocápsida bajo

la proteína M y ocurre la formación y liberación de los viriones maduros por exocitosis (Murphy *et al.*, 1999; Alexander y Senne, 2008).

### **Identificación del agente**

Los líquidos sobrenadantes de las heces o las suspensiones de tejidos e hisopos obtenidos mediante clarificación por centrifugación a 1.000 g durante aproximadamente 10 minutos a una temperatura que no exceda los 25°C se inoculan en volúmenes de 0,2 ml en la cavidad alantoidea de cada uno de al menos cinco huevos embrionarios de aves SPF de 9–11 días de incubación. Si no se dispone de huevos de aves SPF, serán necesarios huevos negativos al menos para anticuerpos contra el VEN. Después de la inoculación, se incuban a 35–37°C durante 4–7 días. Para acelerar el aislamiento final, se pueden llevar a cabo dos pases con una diferencia de 3 días, con lo que se obtendrán resultados comparables a dos pases con un intervalo de 4-7 días (Alexander y Senne, 2008; OIE, 2014). Los huevos que contengan embriones muertos o moribundos al eclosionar, y todos los huevos que al final del periodo de incubación todavía no hayan eclosionado, deben enfriarse primero a 4°C durante 4 horas o durante toda la noche, y en los líquidos alantoideos debe comprobarse si hay actividad de hemoaglutinación (HA). Los líquidos que den una reacción negativa deben ser pasados al menos en un lote más de huevos. Deben realizarse pruebas sistemáticas de contaminación sembrando muestras en placas de agar Luria Broth y leyéndolas a las 24 y 48 horas de incubación a contraluz. Las muestras contaminadas se pueden tratar mediante incubación durante 2-4 horas con concentraciones de antibiótico aumentadas (soluciones de gentamicina, penicilina G, y anfotericina B a unas concentraciones finales de un máximo de 1 mg/ml, 10,000 U/ml, y 20 µg/ml, respectivamente). Las muestras muy contaminadas por bacterias que no puedan eliminarse por centrifugación ni controlarse mediante antibióticos pueden filtrarse por filtros

estériles de 0,45 y 0,2 micras. La filtración debe emplearse solo cuando otros métodos fracasen, porque la agregación puede reducir de forma considerable el título vírico (OIE, 2014).

Para intentar el aislamiento en cultivos celulares también puede emplearse la suspensión de órganos, heces o hisopos homogenizados preparados igual que para el aislamiento en huevos. Las cepas del PMVA-1 pueden replicarse en gran variedad de cultivos celulares de origen aviar y no aviar, entre los cuales, los más utilizados son los siguientes: células de hígado de embrión de pollo (CEL), células de riñón de embrión de pollo (CEK), fibroblastos de embrión de pollo (CEF), células de riñón de mono verde africano (Vero), células miógenas aviares (QM5) y células relacionadas con el embrión de pollo (CER) (Terregino y Capua, 2009; OIE, 2014). Los cultivos celulares primarios de origen aviar son los más susceptibles. Para optimizar la probabilidad de recuperación del virus, en el caso de cepas de baja virulencia debe añadirse tripsina al medio de cultivo. La concentración de tripsina varía en función del tipo de tripsina y del tipo de células empleadas. Un ejemplo es añadir 0,5 µg/ml de tripsina porcina a células CEF. El cultivo vírico suele ir acompañado de efectos citopáticos, típicamente caracterizados por la perturbación de la monocapa y la formación de sincitios (OIE, 2014).

El sistema de cultivo óptimo para el virus depende hasta cierto punto de la cepa. Algunas cepas de PMVA-1 crecen mal en cultivo celular y se replican hasta títulos más altos en huevos embrionados, mientras que algunas cepas de PMV-1 variante paloma (PPMV-1) y de PMVA-1, como la cepa apatógena de Ulster, pueden aislarse en hígado de pollo o células renales de pollo pero no en huevos embrionados (Kouwenhoven, 1993; OIE, 2014). Siempre que sea posible, y principalmente cuando se trata con muestras sospechosas de estar infectadas por el PPMV-1, el aislamiento del virus debe intentarse empleando ambos sustratos (huevos embrionados y células primarias de

embrión de pollo). Dado que el título vírico obtenido en cultivo celular suele ser muy bajo, deben realizarse otros pasos de replicación en huevos embrionados antes de caracterizar la cepa mediante hemoaglutinación indirecta (HI) u otros métodos fenotípicos (OIE, 2014).

En cualquiera de los agentes hemoaglutinantes debe comprobarse si presenta inhibición específica con un antisuero monoespecífico frente al PMVA-1. El PMVA-1 puede mostrar cierta relación antigénica cruzada con algunos de los demás serotipos del paramixovirus aviar, en concreto el PMVA-3 y el PMVA-7 (OIE, 2014).

El índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) puede emplearse para determinar la virulencia de cualquier PMVA-1 que se acabe de aislar. Como alternativa, la virulencia también se puede evaluar empleando técnicas moleculares, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa y la secuenciación (OIE, 2014).

### **Identificación del virus**

La actividad HA detectada en líquidos bacteriológicamente estériles recogidos a partir de huevos inoculados puede deberse a la presencia de cualquiera de los diez subtipos de PMVA (incluido el VEN) o de los 16 subtipos de hemoaglutinina de los virus de la influenza A. El líquido no estéril podría contener actividad HA bacteriana. El VEN puede confirmarse empleando antisuero específico en una prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI). Habitualmente se utiliza el antisuero de pollo preparado contra una de las cepas del VEN (OIE, 2014).

Actualmente, las técnicas basadas en la RT-PCR para la detección y tipificación (patotipificación y genotipificación) del ARN del PMVA-1 en líquido alantoideo de huevos de aves de corral inoculados es cada vez más frecuente en los laboratorios de diagnóstico. No obstante, la variabilidad

genética de las cepas de PMVA-1 debe tenerse muy en cuenta como posible causa de falsos negativos en las pruebas de laboratorio basadas en la genética (OIE, 2014).

### **Índice de patogenicidad**

La variación extrema en la virulencia de las distintas cepas del VEN y el uso generalizado de vacunas vivas implica que la identificación de una cepa como PMVA-1 a partir de aves que presenten signos clínicos no confirma un diagnóstico de EN, por lo que también se requiere una valoración de la virulencia de la cepa. En el pasado, se han utilizado pruebas como el promedio de muerte en huevos, la prueba de la patogenicidad intravenosa, y variaciones de esas pruebas (Alexander y Senne, 2008), pero por acuerdo internacional, se utiliza la prueba de índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) para la valoración de la virulencia del virus. La definición actual de la Organización Mundial de Sanidad Animal también reconoce los avances en los conocimientos sobre las bases moleculares de la patogenicidad y permite una confirmación de la virulencia, aunque no de la ausencia de virulencia, mediante pruebas *in vitro* para determinar la secuencia de aminoácidos en el punto de escisión de la proteína F0. Dada la severidad del procedimiento, el IPIC solo debe emplearse cuando esté claramente justificado por las circunstancias epidemiológicas, por ejemplo, en la primera cepa aislada de un brote. No sería adecuado emplear el IPIC para cepas detectadas en la vigilancia rutinaria de aves sanas (OIE, 2014).

Las pruebas *in vivo* en cepas aisladas de especies distintas del pollo (como palomas) pueden causar ciertos problemas y pueden no producir lecturas exactas hasta que se pasan en pollos o huevos de pollo embrionados (Alexander y Parsons, 1986). Mediante la infección experimental de un número estadísticamente significativo ( $\geq 10$ ) de aves jóvenes y adultas con una dosis estándar de virus (por ejemplo, de 105 DIH50) administrada por

vías naturales (como la oro-nasal) se podría obtener una información más exacta sobre la patogenicidad real de los virus de la EN en una especie susceptible (OIE, 2014).

### **Definición de la enfermedad de Newcastle**

La gran mayoría de especies aviares es susceptible a la infección por PMVA-1 tanto de alta virulencia como de baja virulencia para los pollos, aunque los signos clínicos observados en aves infectadas varían mucho y dependen de factores tales como: el virus, la especie hospedadora, la edad del hospedador, la infección por otros microorganismos, el estrés medioambiental y el estado inmunitario. En determinadas circunstancias, la infección por virus extremadamente virulentos puede provocar una alta mortalidad repentina con signos clínicos relativamente escasos. Así, los signos clínicos son variables y están influidos por otros factores, de modo que ninguno puede considerarse patognomónico (OIE, 2014).

Incluso en los hospedadores susceptibles, los VEN causan considerable variedad de signos clínicos. Generalmente, la variación consiste en agrupaciones alrededor de los dos extremos en la prueba del IPIC, pero, por diversas razones, algunos virus pueden mostrar virulencia intermedia. La variación enorme en la virulencia y en los signos clínicos implica la necesidad de definir cuidadosamente lo que constituye la EN a efectos de comercio, políticas y medidas de control (OIE, 2014).

La enfermedad de Newcastle se define como una infección de aves de corral causada por un virus del serotipo 1 del paramixovirus aviar (PMVA-1) que cumple uno de los criterios siguientes de virulencia:

- a) El virus tiene un índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) en polluelos de un día (*Gallus gallus* L.) de 0,7 o superior.

- b) Se han demostrado en el virus múltiples aminoácidos básicos (o directamente o por deducción) en el extremo C-terminal de la proteína F2 y fenilalanina en el residuo 117, la cual está en el extremo N-terminal de la proteína F1. El término “múltiples aminoácidos básicos” se refiere a que existen al menos tres residuos de arginina o lisina entre las posiciones 113 y 116. La imposibilidad de demostrar el modelo característico de residuos de aminoácidos como se ha descrito anteriormente requeriría la caracterización del virus aislado mediante una prueba de IPIC (OIE, 2014).

### **Base molecular de la patogenicidad**

Durante la replicación, las partículas del PMVA-1 se producen con un precursor glucoproteico, F0, que tiene que escindirse en F1 y F2 para que las partículas víricas sean infectivas. La tripsina es capaz de incidir F0 de todas las cepas del VEN (OIE, 2014).

Parece ser que las moléculas F0 de virus virulentos para los pollos pueden dividirse mediante una proteasa del hospedador o proteasas encontradas en un rango amplio de células y tejidos y de este modo diseminarse por todo el hospedador dañando órganos vitales, mientras que las moléculas F0 de los virus de baja virulencia solo se inciden mediante ciertas proteasas del hospedador, lo cual implica que estos virus solo se replican en ciertos tipos de células hospedadoras (OIE, 2014).

La mayoría de los virus PMVA-1 que son patógenos para los pollos tienen la secuencia <sup>112</sup>R/K-R-Q-K/R-R<sup>116</sup> (Kim *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2010) en el extremo C-terminal de la proteína F2 y F (fenilalanina) en el residuo 117, el extremo N-terminal de la proteína F1, mientras que los virus de baja virulencia tienen secuencias en la misma región de <sup>112</sup>G/E-K/R-Q-G/E-R<sup>116</sup> y L (leucina) en el residuo 117. Algunos de los virus examinados de la variante



de la paloma (PPMV-1) tienen la secuencia <sup>112</sup>G-R-Q-K-R-F<sup>117</sup>, pero tienen valores de IPIC altos (Meulemans *et al.*, 2002). Así, para que el virus sea virulento en los pollos parece ser que existe el requisito de al menos un par de aminoácidos básicos en los residuos 116 y 115 más una fenilalanina en el residuo 117 y un aminoácido básico (R) en 113. Sin embargo, algunos PPMV-1 pueden tener puntos de incisión relacionados con la virulencia y valores de IPIC bajos (Collins *et al.*, 1994). Este fenómeno se ha asociado no a la proteína de fusión (Dortmans *et al.*, 2009), sino al complejo de replicación formado por la nucleoproteína, la fosfoproteína y la polimerasa (Dortmans *et al.*, 2010).

En el diagnóstico de la EN es importante entender que la demostración de la presencia del virus con múltiples aminoácidos básicos en el punto de incisión de F0 confirma la presencia de virus virulentos o potencialmente virulentos, pero que la falta de detección de virus o la detección de VEN sin múltiples aminoácidos básicos en el punto de incisión de F0 empleando técnicas moleculares no confirma la ausencia de virus virulentos (OIE, 2014).

### **Signos clínicos**

Los signos clínicos varían enormemente dependiendo de factores tales como: la cepa del virus, la especie de ave infectada, la edad del hospedador (las aves juveniles son las más sensibles), infección simultánea con otros organismos, estrés ambiental y estatus inmune. En algunos casos, la infección con las cepas sumamente virulentas del virus puede causar un gran número de aves muertas aunque presenten pocos signos clínicos. La enfermedad surge rápidamente con síntomas que aparecen entre dos y doce días después de la exposición y se propaga rápidamente al resto de la parvada (OIE, s. f.; Cattoli *et al.*, 2011).

Esta enfermedad en las aves puede variar desde forma subclínica hasta moderado a severo con alta mortalidad, dependiendo principalmente de la virulencia de la cepa circulante y de la susceptibilidad de la especie infectada (Cuello *et al.*, 2011). En los animales afectados, se observa generalmente disnea, cianosis de crestas y barbillas, espasmos musculares, pérdida de apetito, indiferencia, polidipsia, debilidad y somnolencia. En el tracto digestivo, se puede observar inflamación del buche, presencia de mucus espumoso y secreción fibrinosa en la faringe y diarrea verde-amarilla. Los signos nerviosos se expresan por parálisis de alas y patas, tortícolis, ataxia o movimientos circulares y convulsiones (Murphy *et al.*, 1999; Cuello *et al.*, 2011). Cuando hay cepas muy virulentas puede aparecer alta mortalidad, precedida por lesiones hemorrágicas, signos respiratorios o nerviosos, o en ausencia de signos clínicos (Römer-Oberdörfer *et al.*, 2003; Alexander y Senne, 2008; Cuello *et al.*, 2011).

Por otra parte, otros autores mencionan que los signos clínicos no son patognomónicos, sin embargo, si la hemorragia y necrosis de los tejidos linfoides está presente, especialmente del intestino, el bazo y el timo, se debe sospechar de una cepa viscerotrópica. Las aves infectadas con cepas neurotrópicas permanecen alerta antes de desarrollar signos neurológicos como tortícolis, ataxia o parálisis de las piernas y lesiones graves suelen estar ausentes (Cattoli *et al.*, 2011; Kapczynski *et al.*, 2013).

Debido a que las reproductoras reciben vacunaciones múltiples contra el virus de Newcastle durante su ciclo de producción y por tanto, tienen inmunidad persistente, pueden no mostrar signos de infección salvo una caída en la producción de huevos (Bwala *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2008; Kapczynski *et al.*, 2013).

Es importante mencionar que una de las principales características de las diferentes cepas de los virus que producen la enfermedad de Newcastle es la

gran variabilidad para causar daños en las células. En ese sentido, las cepas se han clasificado en cinco grupos de acuerdo a la patogenicidad en base a los signos clínicos observados en las aves infectadas:

- Velogénica viscerotrópica. Es una forma muy patógena en la que se observan frecuentemente lesiones intestinales hemorrágicas.
- Velogénica neurotrópica. Presenta con mortalidad elevada, habitualmente después de signos respiratorios y nerviosos.
- Mesogénica. Presenta signos respiratorios y signos nerviosos ocasionales pero baja mortalidad.
- Lentogénica o respiratoria. Presenta leves signos respiratorios o subclínica.
- Entérica asintomática. Usualmente consiste en una infección entérica subclínica (Alexander y Senne, 2008; OIE, 2014).

Berinstein *et al.* (2001) indican que la forma lentogénica puede también presentar leves infecciones entéricas.

El período de incubación de la enfermedad oscila de 2 a 15 días con un promedio entre 5 a 6 días, los signos clínicos que pueden estar asociados con problemas respiratorios, circulatorios, gastrointestinales y nerviosos (Murphy *et al.*, 1999; Alexander y Senne, 2008).

### **Lesiones macroscópicas y microscópicas**

Al igual que con los signos clínicos, las lesiones macroscópicas y los órganos afectados en las aves infectadas con el VEN dependen de la cepa y el patotipo, además del huésped y los demás factores que pueden afectar a la gravedad de la enfermedad. No hay lesiones patognomónicas asociadas a alguna forma de la enfermedad. Las lesiones macroscópicas también pueden estar ausentes (Alexander y Senne, 2008).

La presencia de lesiones hemorrágicas en el intestino de los pollos infectados se ha utilizado para distinguir los virus velogénicos viscerotrópicos de los virus velogénicos neurotrópicos. Estas lesiones suelen ser especialmente prominentes en la mucosa del proventrículo, ciego y el intestino delgado y grueso. Suelen ser marcadamente hemorrágicas y parecen ser el resultado de la necrosis de la pared intestinal y los tejidos linfoides, tales como las tonsilas cecales y las placas de Peyer (Alexander y Senne, 2008).

Las lesiones macroscópicas no siempre están presentes en el tracto respiratorio, pero cuando se observan consisten predominantemente en hemorragia de la mucosa y marcada congestión de la tráquea (Alexander *et al.*, 1974; Alexander y Senne, 2008)

La aerosaculitis puede estar presente incluso después de la infección con cepas relativamente suaves, y el engrosamiento de los sacos de aire con catarrales o exudados caseosos son a menudo observados en asociación con infecciones bacterianas secundarias (Alexander y Senne, 2008).

En otros órganos incluyen hemorragias en la conjuntiva inferior, necrosis focal del bazo, y edema paratraqueal, observado generalmente cerca de la entrada torácica (Alexander y Senne, 2008).

Los sacos aéreos se observan opacos, engrosados y con presencia de material exudativo caseoso cuando las bacterias aparecen como resultado de la infección viral. En ocasiones, las aves con signos neurológicos no presentan mayores cambios macroscópicos (ICA, 2009).

En el tracto digestivo, en el proventrículo se observan hemorragias difusas sobre la mucosa. En el intestino es frecuente encontrar úlceras botonosas, particularmente en la porción final del ilion, en el segmento localizado entre los ciegos. En el resto del intestino predominan las hemorragias de tipo

difuso, las que también se observan en la mucosa de la cloaca. En las tonsilas cecales un cambio frecuente, aunque no específico, consiste en la presencia de congestión y en algunos casos de necrosis del tejido linfoide (ICA, 2009).

En el caso de pollos afectados por cepas virulentas del VEN se observan lesiones hemorrágicas de forma predominante en varias partes del tracto gastrointestinal, en particular en la mucosa que une el esófago con el proventrículo, el proventrículo con la molleja y en la mitad posterior del duodeno, íleo y yeyuno. Además, hay inflamación en el tejido linfoide intestinal incluyendo las tonsilas cecales, en hígado, en riñones, en músculos cardíacos y en el bazo producto de la reacción general a la infección. El músculo pectoral se torna de color rojo oscuro y seco por la deshidratación. Las hemorragias también están presentes en las meninges y a veces en la parte interior del cráneo. El contenido intestinal es de color verde-grisáceo. Asimismo, se puede observar conjuntivitis catarral o serosa, rinitis, sinusitis y traqueitis caseosa (Cuello *et al.*, 2011). En casos muy severos, las hemorragias además están presentes en los músculos, laringe, tráquea, pulmones, sacos aéreos, membranas serosas, pericardio, miocardio y en los folículos del ovario de las ponedoras adultas. (Kouwenhoven, 1993; Cuello *et al.*, 2011). Varias de estas lesiones fueron observadas también por otros autores en estudios de patogenicidad realizados con cepas velogénicas viscerotrópicas y aislados virulentos del VEN (Kommers *et al.*, 2002; Kommers *et al.*, 2003).

El examen histopatológico de los tejidos afectados mostró que todas las aves inoculadas tenían inflamación local del párpado consistente en una expansión edematosa a los dos días post-infección (PI), que progresó al quinto día PI a una infiltración pleocelular y ocasional necrosis de las miofibras. Al 4to día PI se observó esplenomegalia y ausencia de células

mononucleares, frecuentemente con grandes depósitos de fibrina sustituyendo el tejido linfoide periarteriolar de la cubierta. A este mismo tiempo PI se notó una masiva destrucción de áreas del tejido linfoide intestinal, más evidente en las tonsilas cecales, donde el tejido linfoide estaba sustituido por restos de fibrina, úlceras extensivas en el epitelio intestinal, rompimiento de las miofibras cardíacas y acumulación de macrófagos en el interior del miocardio. Asimismo, se evidenció depleción linfoide de la bolsa y el timo, degeneración neuronal focal y gliosis en el cerebro (Brown *et al.*, 1999; Kommers *et al.*, 2003).

La figura 2 muestra varias de las lesiones macroscópicas frecuentemente observadas en infección por VEN.

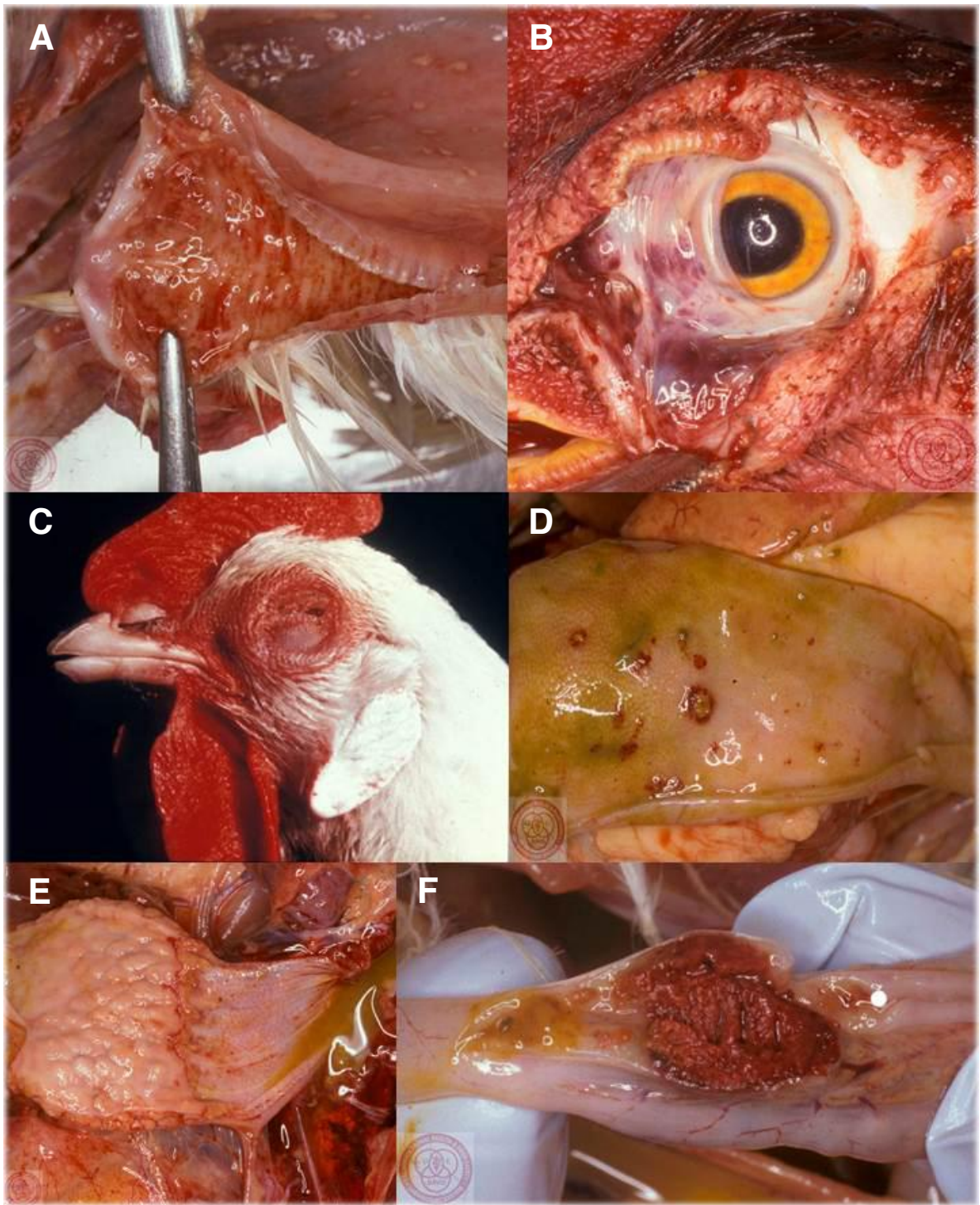


Figura 2. A. Congestión hemorrágica en la tráquea. B. Hemorragia conjuntival. C. Edema facial, blefaritis. D. Úlceras en el intestino delgado. E. Proventriculitis y focos hemorrágicos en el proventrículo. F. Hemorragia en las tonsilas cecales. Fuente: Spickler y Sorden (2008).

## **Patogenicidad**

En pollos, la patogenicidad de EN está determinada principalmente por la cepa del virus, aunque la dosis, vía de administración, la edad del pollo, y las condiciones ambientales también la afectan. En general, cuanto más joven es el pollo, más aguda es la enfermedad. Con las cepas virulentas en campo, pollos jóvenes pueden experimentar muertes súbitas sin mostrar signos clínicos; sin embargo, en las aves de mayor edad la enfermedad puede ser más prolongada y con signos clínicos característicos. La línea genética no parece tener un efecto significativo sobre la susceptibilidad de pollos a la enfermedad (Cole y Hutt, 1961; Alexander y Senne, 2008; Kapczynski *et al.*, 2013). Las rutas naturales de infección (nasal, oral y ocular) parecen enfatizar la naturaleza respiratoria de la enfermedad, y las rutas intramuscular, intravenosa e intracerebrales parecen amplificar los signos neurológicos (Alexander y Senne, 2008).

El virus replica en las mucosas del tracto respiratorio e intestinal. La diseminación de la infección en la tráquea ocurre por la acción de los cilios y por la infección célula a célula. Las cepas lentogénicas circulan con bajos títulos, las mesogénicas afectan los riñones, pulmones, bazo y la bolsa de Fabricio y las velogénicas se encuentran dentro de las 12-24 horas PI en prácticamente todos los tejidos, con altos títulos en el timo y más bajos en los músculos y el cerebro (Kouwenhoven, 1993, Murphy *et al.*, 1999). Después de la multiplicación inicial en el sitio de entrada, las cepas velogénicas se difunden por viremia al bazo, hígado, riñones y pulmones donde se interrumpe la multiplicación por 12-24 horas hasta las 36 horas PI y los títulos virales disminuyen. El virus infecta el cerebro antes de que circulen cantidades suficientes de anticuerpos (Kouwenhoven, 1993).

Durante la segunda multiplicación, después de la interrupción, el virus es nuevamente liberado al flujo sanguíneo, lo cual está asociado con la



aparición de los signos generales de la enfermedad y la excreción de virus, la secuencia en la cual son infectados los tejidos explica porque los signos nerviosos aparecen después de la presencia de los signos respiratorios, intestinales y generales de la enfermedad. Sin embargo, en las cepas velogénicas neurotrópicas el virus puede estar presente al mismo tiempo en el sistema nervioso central, tracto intestinal y respiratorio (Kouwenhoven, 1993).

### **Inmunología del ave asociada a mucosas**

La respuesta inmune inicial a la infección con el VEN es mediada por células y puede ser detectada tan temprano como 2-3 días post-vacunación con vacuna viva (Timms y Alexander, 1977). Sin embargo, se ha demostrado que esta inmunidad sola no protege contra la confrontación con cepas virulentas y los anticuerpos neutralizantes son necesarios para la protección (Reynolds y Maraqa, 2000; Alexander y Senne, 2008).

La producción de anticuerpos es rápida, tanto a nivel local como sistémica. En el tracto respiratorio superior se detectan anticuerpos de tipo IgA con pequeñas cantidades de IgG, similar a las reveladas en la glándula de Harder que no permiten la replicación viral en estos órganos (Alexander y Senne, 2008). En la respuesta sistémica aparecen en una primera fase los anticuerpos de tipo IgM seguido por la IgG (Kouwenhoven, 1993), los cuales son detectados entre los 4 a 6 días PI y persisten por al menos 2 años (Murphy *et al.*, 1999; Alexander y Senne, 2008; Cuello *et al.*, 2011).

El nivel de los títulos de anticuerpos dependen de la cepa del virus que produce la infección, pero generalmente el nivel máximo de la respuesta se alcanza alrededor de la tercera o cuarta semana PI, después de la cual los títulos comienzan a declinar si no se realizan reinmunizaciones (Kouwenhoven, 1993; Alexander y Senne, 2008; Cuello *et al.*, 2011).

Las aves en su sistema inmunológico cuentan con tres órganos básicos que son la bolsa de Fabricio, el timo y medula ósea, pero además con el bazo, la glándula harderiana, las tonsilas cecales y agregados linfoides en el proventrículo, molleja, páncreas, hígado, divertículo de Meckel, riñón y nódulos peribronquiales en el pulmón, los cuales hacen parte de los tejidos linfoides secundarios o periféricos. Las aves no cuentan con ganglios linfáticos como en los mamíferos pero si cuentan con nódulos linfoides asociados con poca o ninguna capacidad de filtración (Vargas y Uribe, 2008).

El sistema inmune de las aves comprende dos tipos de inmunidad, a saber: innata y de adaptación. La inmunidad innata es el conjunto de herramientas más básicas con que cuenta el organismo para combatir la infección, incluyendo las barreras físicas y químicas, las proteínas de la sangre y las células fagocitarias. La piel, el epitelio de los sistemas respiratorios y digestivos, y las secreciones gástricas. La inmunidad innata se considera como la primera línea de defensa y carece de especificidad, lo cual le permite proteger contra muchos tipos de patógenos. La inmunidad de adaptación se inicia cuando la inmunidad innata no logra detener a algún patógeno y desarrolla el reconocimiento enfocado a las características moleculares específicas del patógeno (Burns *et al.*, 2007).

La inmunidad pasiva se fundamenta en los anticuerpos maternos presentes al nacer, que proporcionan al pollo protección contra los diferentes agentes con que fue vacunada la gallina o a los cuales se expuso en cualquier periodo de su vida (Burns *et al.*, 2007).

La inmunidad activa es la que desarrolla el ave mediante la exposición directa a los patógenos, ya sea por infección natural o por vacunación, y se puede subdividir en inmunidad humoral e inmunidad mediada por células (Burns *et al.*, 2007).

## **Inmunidad humoral**

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son la unidad funcional de la inmunidad humoral. Son secretados por las células plasmáticas, que son un tipo de linfocitos B. Las inmunoglobulinas se encuentran en los tejidos corporales y en los espacios tisulares, las cuales reaccionan ante las proteínas de superficie de las bacterias, parásitos o virus, adheriéndose a moléculas específicas del patógeno (Burns *et al.*, 2007).

El aparato inmunológico de las aves comprende tres clases o isotipos de inmunoglobulinas: IgM, IgG e IgA. Cuando un anticuerpo interactúa con el antígeno, activa los mecanismos efectores para ayudar a la eliminación del patógeno. Estos mecanismos son la activación de la vía clásica del complemento directamente sobre el antígeno, la preparación del antígeno para la fagocitosis mediante la opsonización, la aglutinación o precipitación, y la neutralización del antígeno impidiendo que penetre a la célula. Además los anticuerpos se pueden unir a los antígenos expresados sobre la superficie externa de las células infectadas, desencadenando así la actividad de las células asesinas para eliminar a las células infectadas o neoplásicas mediante un proceso conocido como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Burns *et al.*, 2007).

## **Linfocitos**

En las aves existen dos tipos de linfocitos: los linfocitos B y los linfocitos T. Cada tipo desempeña un papel muy diferente, pues los linfocitos B están más asociados con la inmunidad humoral mientras que las células T son los componentes principales de la inmunidad mediada por células. Los linfocitos B se originan en los folículos linfoides de la bolsa de Fabricio y son los encargados de la producción de anticuerpos y control de patógenos extracelulares, como las bacterias. Los linfocitos T completan su maduración

al pasar de la corteza a la médula del timo, para luego pasar a la circulación general a través de los vasos medulares (Burns *et al.*, 2007).

### **Órganos linfoides**

El timo, la bolsa de Fabricio y la médula ósea son considerados como los órganos linfoides primarios de las aves, mientras que los secundarios son el bazo, los tejidos linfoides asociados a las mucosas, los nódulos linfáticos y los centros germinales (Burns *et al.*, 2007).

**El timo** es el órgano linfoide primario, para el desarrollo de la respuesta inmune celular. El timo tiene la función de madurar los linfocitos T y macrófagos para migrar al torrente sanguíneo. Además las células del timo sintetizan polipéptidos que favorecen la transformación y maduración de las células T. La parte externa de cada lobulillo llamada corteza aparece densamente poblada por células T inmaduras, linfoblastos en activa proliferación y células en proceso de maduración llamados timocitos, que se van desplazando hacia la medula a medida que van madurando. (Patología Aviar UPTC, 2006)

**La bolsa de Fabricio** es un órgano exclusivo de las aves y es el único sitio de maduración y diferenciación de las células B, su superficie interna está cubierta con pliegues longitudinales grandes y pequeños, dentro de los cuales se encuentran los folículos de la bolsa de Fabricio, que son en total aproximadamente de 8.000 a 12.000 y cada uno contiene una médula y una corteza. En la corteza se encuentran grandes cantidades de linfocitos. Dentro de cada folículo los linfocitos están atravesando por un proceso de conversión de genes para generar diversidad antigénica. Una vez maduros, los linfocitos B pasan al sistema circulatorio y a los órganos linfoides periféricos, listos para encontrarse con el antígeno específico para el cual están programados a reconocer. Al enviar a los linfocitos B específicos a la

periferia, el aparato inmunológico mantiene su capacidad de responder a los antígenos y producir la inmunidad humoral después de que la bolsa de Fabricio sufre regresión naturalmente alrededor de las 14 a 20 semanas (Burns *et al.*, 2007).

**La medula ósea** es un órgano hematopoyético, el lugar primario de producción de todas las células sanguíneas del animal incluyendo los linfocitos, está compuesta por células madre pluripotenciales, un tejido de sostén constituida por células reticulares y fibroblastos especializados, que se organizan en forma de red, formando los cordones hematopoyéticos, en donde se encuentran las células hematopoyéticas. Las células sanguíneas son producidas en estos compartimentos donde también, se induce la proliferación y diferenciación precoz de las células germinales primitivas (Patología Aviar UPTC, 2006; León, 2007).

El **bazo** es el órgano donde predominan los linfocitos, es un sitio importante de procesamiento de antígenos y producción de anticuerpos en las aves maduras. En el embrión en desarrollo, este órgano es donde principalmente se producen los granulocitos para luego convertirse en un órgano de defensa que contiene múltiples cúmulos de linfocitos especializados y macrófagos importantes para el procesamiento de los antígenos (Burns *et al.*, 2007).

Sistema linfoide asociado a mucosas (MALT). El papel más importante del MALT es destruir los patógenos en su puerta de entrada para prevenir la diseminación sistémica de la infección. Esta función es llevada a cabo de diferentes formas. Barreras no específicas como las secreciones gástricas, lisozimas, sales biliares, peristalsis y la competencia por la flora microbiana nativa son importantes componentes de la primera línea de defensa de MALT (López Pineda *et al.*, s. f.).

Los tejidos linfoides asociados a las mucosas se encuentran en diversas partes del cuerpo como en el tracto gastrointestinal y en la cabeza. El tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (GALT, por sus siglas en inglés) incluye nódulos linfoides agregados, como por ejemplo las tonsilas cecales y el divertículo de Meckel, las placas de Peyer y una tonsila esofágica descrita recientemente (Burns *et al.*, 2007). El GALT es un tejido multiestrato continuamente expuesto a Ag de los alimentos, de la flora microbiana normal y a patógenos ingeridos. Más de la mitad del total de linfocitos del MALT están contenidos dentro del GALT. Histológicamente el estrato externo del GALT consiste en células epiteliales y linfocitos situados encima del basamento de la membrana, debajo de la cual se encuentra la lámina propia (LP) que también contiene linfocitos, además la submucosa (López Pineda *et al.*, s. f.).

Las **placas de Peyer** son estructuras descritas en mamíferos y también en aves formadas por acúmulos linfoides que se localizan en la parte media intestinal y por debajo de los epitelios intestinales. El número de placas de Peyer en aves es de 5 o 6, son cúmulos densos de células linfoides, parecen ser el principal sitio de inducción de las respuestas con IgA contra los patógenos y los antígenos sin digerir. El epitelio que recubre a las placas de Peyer es diferente al resto de la mucosa del epitelio del intestino delgado, está formado por células especializadas en el transporte de antígenos así como de sIgA (IgA secretora) (López Coello *et al.*, s. f.; Burns *et al.*, 2007).

Las **tonsilas cecales** son tejidos linfoides especializados, localizados en la base de inicio de cada uno de los sacos ciegos; su estructura es de tipo esferoidal, y se distingue una cripta central de tejido linfoide difuso y centros germinales de estructura similar a las placas de Peyer (López Coello *et al.*, s. f.).

El tejido linfoide presente en las tonsilas cecales está distribuido en dos áreas: Una zona subepitelial donde se ubican células B y una zona más profunda donde se localizan los linfocitos T (López Coello *et al.*, s. f.). Es frecuente utilizar a las tonsilas cecales como sitios para el aislamiento de virus en caso de infecciones crónicas como la bronquitis infecciosa (Burns *et al.*, 2007).

El **divertículo de Meckel** es el remanente del saco vitelino el cual se transforma en un tejido linfoide altamente desarrollado que contiene centros germinales o células B y macrófagos. Se describe que en aves de 2 semanas de edad existe una comunicación directa entre el lumen del intestino delgado y el divertículo de Meckel, pero lo más importante es que se han descrito funciones de mielopoyesis extramedular que se realizan en el DM en aves de 2 a 7 semanas de edad (López Coello *et al.*, s. f.).

La figura 3 muestra los distintos tejidos y estructuras linfoides que conforman el GALT en las aves.

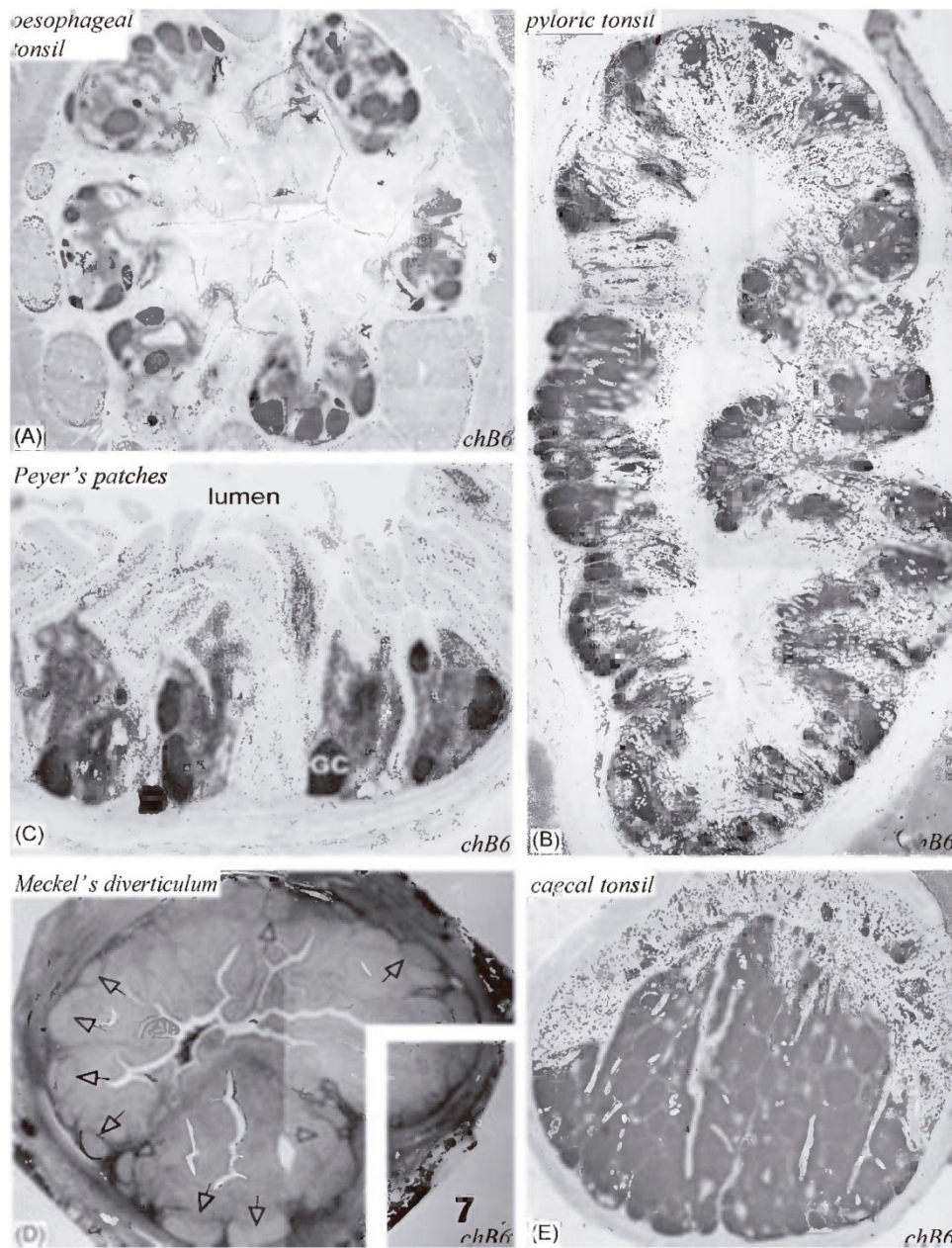


Figura 3. Estructura del GALT en aves. A. Tonsila esofágica. B. Tonsila pilórica. C. Placa de Peyer. D. Divertículo de Meckel. E. Tonsila cecal. Fuente: Oláh *et al.* (2014).



En el tracto respiratorio, las aves presentan tejidos linfoides asociados a la tráquea y a los bronquios, (figura 4). Las aves comerciales con buen estado de salud tienen un tejido linfoide bien desarrollado en la tráquea debido a la vacunación y al estímulo antigénico ambiental. El tejido linfoide asociado con los bronquios (TLAB) está compuesto por linfocitos B y T, además presenta células dendríticas, macrófagos, heterófilos y, cuando está estimulado, células plasmáticas y centros germinales. En el tracto respiratorio de las aves los heterófilos son un componente importante del mecanismo de defensa, toda vez que los macrófagos son relativamente escasos en el árbol bronquial (Burns *et al.*, 2007).

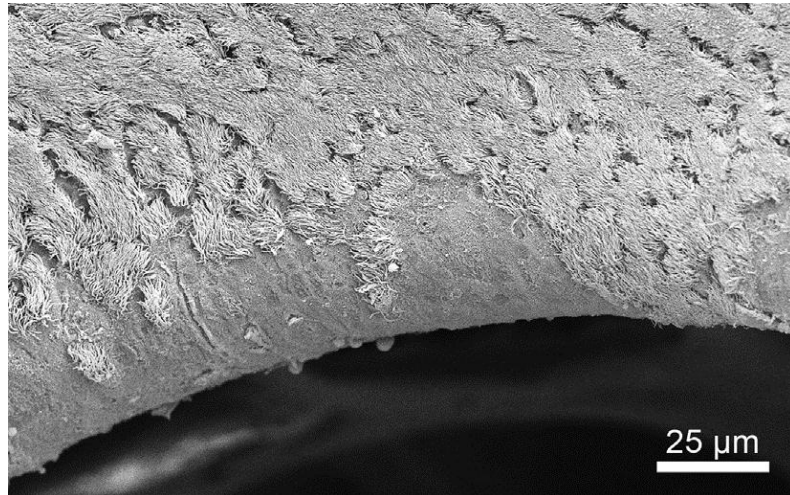


Figura 4. Detalle de las células ciliadas que cubren al BALT de los bronquios en aves. Fuente: Härtle y Kaspers (2014).

En la cabeza existen varios tejidos linfoides conocidos como tejidos linfoides asociados con la cabeza (TLAC), que incluyen a la glándula de Harder, la glándula lagrimal, el tejido linfoide asociado con la conjuntiva, los infiltrados de células linfoides de la lámina propia de la cavidad nasal y otras estructuras de la laringe y la nasofaringe. La glándula de Harder es la

principal glándula accesoria secretora de anticuerpos del aparato lagrimal y es importante en el desarrollo de la inmunidad después de la vacunación, contiene grandes cantidades de células plasmáticas, constituidas en un 80 ó 90% por células B (Burns *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que tanto la inmunidad celular como la humoral juegan un papel predominante en la respuesta de ave a la infección con el virus de la enfermedad de Newcastle (Al-Garib *et al.*, 2003). La mayor parte de las vacunas lentogénicas son capaces de inducir anticuerpos que se correlacionan positivamente con protección (Kapczynski y King, 2005). Sin embargo, la respuesta humoral sistémica no es suficiente para una buena protección (Reynolds y Maraqa, 2000). La inmunidad mucosal representada por la producción local de inmunoglobulina A (IgA) en el epitelio respiratorio y digestivo, así como la estimulación de la inmunidad mediada por células (que sólo se genera luego de la replicación tisular del virus), son indispensables y sin duda el objetivo de la vacunación con virus vivo en aves jóvenes en presencia de anticuerpos maternos. (Perozo *et al.*, 2008a; Seal, *et al.*, 2000; Villegas y Perozo, 2008).

### **Respuesta inmune innata a la infección por VEN en aves de corral**

La respuesta inmune innata comprende factores que existen antes de la aparición de la infección, y son capaces de la exclusión o respuesta rápida a los microbios. Los principales componentes de la inmunidad innata de las aves de corral son:

- (1) las barreras físicas y químicas, tales como las plumas y la piel, los epitelios y la producción de moco;
- (2) células fagocíticas, incluyendo macrófagos y células asesinas naturales;
- (3) proteínas del complemento y los mediadores de la inflamación; y

(4) citoquinas. (Kapczynski *et al.*, 2013).

En general, la respuesta inmune innata a la infección por virus es una reacción inmediata diseñada para controlar e inhibir el crecimiento del virus y la propagación y ayudar al desarrollo de la protección patógeno-específica a través de la respuesta inmune adaptativa. Las reacciones iniciales del sistema inmune innato utilizan receptores codificados de la línea germinal, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (RRP), los cuales reconocen marcadores moleculares de microbios infecciosos conservados evolutivamente, conocidos como de PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos). El reconocimiento de los PAMP por los RRP, ya sean solos o en heterodimerización con otros RRP, (receptores tipo alcabala (TLR); proteínas de unión a nucleótidos de dominio de oligomerización (NOD); helicasas de ARN, como el gen-ácido inducible retinoico 1 (RIG-I) o MDA5; lectinas tipo C), induce señales intracelulares responsables de la activación de los genes que codifican para las citoquinas pro-inflamatorias, factores anti-apoptóticos y péptidos antimicrobianos. El virus es reconocido primero por proteínas centinelas del huésped, incluyendo proteínas TLR y NOD, lo cual produce señalización rápida y la activación del factor de transcripción que conduce a la producción de factores solubles, incluyendo interferón y citoquinas, diseñados para limitar y contener la replicación viral (Kapczynski *et al.*, 2013).

La infección *in vitro* por VEN resulta en la inducción de óxido nítrico (NO) en heterófilos y células mononucleares de sangre periférica, detección de interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) y beta (IFN- $\beta$ ) de ARNm en los macrófagos, y producción de gamma (IFN- $\gamma$ ) de ARNm en células mononucleares de sangre periférica (Ahmed *et al.*, 2007; Sick *et al.*, 1998; Sick *et al.*, 2000). Además, la infección de heterófilos de pollo disminuyó la capacidad de fagocitar las bacterias, lo que resulta en el deterioro de la función de los heterófilos,

haciendo a las aves más susceptibles a infección secundaria (Lam *et al.*, 1996).

### **La respuesta de anticuerpos a la infección y la vacunación con VEN**

El objetivo de la vacunación es siempre lograr inmunidad esterilizante, sin embargo, esto aún no ha sido alcanzado con las vacunas de VEN (Kapczynski *et al.*, 2013). En el mejor de los casos, las vacunas de VEN inducen una respuesta inmune que reduce o previene completamente la enfermedad clínica y la mortalidad por EN, disminuye la cantidad de VEN excretada al medio ambiente, y aumenta la cantidad de virus necesaria para infectar el animal vacunado (Marangon y Busani, 2006; Miller *et al.*, 2009).

La aplicación masiva de vacunas de virus vivo se utiliza a menudo debido al menor costo y tiempo de aplicación más rápido en comparación con tener que administrar vacunas individuales a cada ave de la parvada (Senne *et al.*, 2004). Las cepas vacunales lentogénicas B1 y LaSota son de uso común en todo el mundo, y pueden proporcionar protección contra el VEN si las vacunas son viables, si se administran correctamente a aves sanas y si el tiempo permite desarrollar una respuesta inmune apropiada antes de la exposición al virus de desafío (Kapczynski y King, 2005; Cornax *et al.*, 2012; Dortmans *et al.*, 2012). Desafortunadamente, las condiciones en el campo a menudo no son óptimas, alcanzando potencialmente la aplicación masiva apenas 53% de la parvada cuando la vía de administración es aerosol y 60% cuando la ruta es a través del agua (Degefa *et al.*, 2004).

La presencia de organismos inmunosupresores también puede dejar sin efecto un protocolo que es sólido en condiciones experimentales (Perozo *et al.*, 2012). De hecho, incluso la vacuna más eficaz no puede inducir una respuesta inmune si el ave está inmunosuprimida (Kapczynski *et al.*, 2013).

Las vacunas inactivadas se administran a menudo para ponedoras y reproductoras para proporcionar altos títulos de anticuerpos de larga duración que se pueden pasar a la descendencia (Al-Garib *et al.*, 2003). Sin embargo, los tiempos de espera entre la vacunación y el sacrificio reducen la capacidad de utilizar estos tipos de vacunas durante todo el período de producción (Senne *et al.*, 2004).

Las vacunas inactivadas son más caras de producir, y requieren una administración individual. Hasta hace poco el dogma era que las vacunas inactivadas no inducirían una respuesta inmune de la mucosa, pero un estudio reciente demostró que las vacunas de VEN tanto vivas como inactivadas indujeron anticuerpos distintos de IgA, no sólo en el suero, sino también en lavados traqueales e intestinales (Chimeno Zoth *et al.*, 2008).

Debido a que todos VEN son un solo serotipo, cualquier cepa de VEN puede ser utilizada como vacuna y todas las vacunas deberían prevenir la enfermedad clínica y la muerte por EN. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que las vacunas formuladas con cepas más similares al virus de desafío pueden disminuir la cantidad de virus de desafío derramada en hisopos orofaríngeos de aves vacunadas y potencialmente reducir el número de aves que arrojan virus (Miller *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2012).

### **Inmunidad celular inducida por el virus de Newcastle**

La inmunidad mediada por células (IMC) es la inmunidad adaptativa específica mediada por linfocitos T, y se ha sugerido que es un factor importante para el desarrollo de la protección en pollos vacunados contra VEN y contribuir a la eliminación del virus (Sharma, 1999; Kapczynski *et al.*, 2013). Los subconjuntos de los linfocitos T, incluyendo células CD4+ y CD8+,

constituyen el principal grupo de células de la respuesta de IMC (Kapczynski *et al.*, 2013).

Se ha comparado la IMC entre aves que recibieron vacunas vivas de VEN frente a vacunas inactivadas (Kapczynski *et al.*, 2013). En un estudio, se compararon los niveles de IFN- $\gamma$  por ELISA y la proliferación de VEN a partir de esplenocitos obtenidos de pollos que recibieron vacunas vivas o inactivadas de VEN. Los resultados indicaron un incremento de IMC con las vacunas vivas de VEN, las cuales estimulan tanto el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I (CD8+) y II (CD4+) en el huésped, la respuesta IMC derivada de las vacunas inactivadas NDV tardó más en desarrollarse y parece ser estimulada a través de los linfocitos CD4+ y la presentación CMH de clase II por la formación de anticuerpos en cadena probablemente a través de una secreción dirigida de citoquinas (Lambrecht *et al.*, 2004).

Se ha examinado el rol de la virulencia de la vacuna de VEN en la IMC, sin mayores sorpresas, la virulencia del virus parece desempeñar un papel en la estimulación de IMC (Kapczynski *et al.*, 2013), las cepas más virulentas permanecen más tiempo en el ave y por lo tanto son capaces de incrementar la magnitud y duración de la IMC (Rauw *et al.*, 2009).

Recientemente, se empleó el uso de la nanotecnología para examinar el efecto adyuvante en las vacunas inactivadas de VEN en pollos. En estos estudios, se aplicó la adición de fosfato de calcio (CP) a las vacunas inactivadas de VEN y se comparó la IMC resultante en relación a la inducida por la vacunación con VEN vivos. Los resultados indicaron que la IMC inducida con CP acoplado a la vacuna inactivada del VEN alcanzó niveles similares a los obtenidos con la vacuna viva de VEN. Los resultados demostraron que en la primera semana luego de la vacunación con la

incorporación de CP aumentó significativamente la IMC para VEN en comparación las vacunas vivas (Koppad *et al.*, 2011).

Los avances en la detección de IMC luego de la vacunación con virus vivo de VEN indican que mientras que los anticuerpos siguen siendo el principal mecanismo de protección contra VEN virulentos, las contribuciones de la IMC son importantes de cara al desafío de campo. Mientras se emplean nuevas estrategias de vacunación para proteger a las aves de corral contra VEN, parece obvio que la combinación de ambas ramas de la respuesta inmune adaptativa proporciona la mejor protección para las aves y disminuye el riesgo de transmisión a los animales susceptibles (Kapczynski *et al.*, 2013).

## **Características de las vacunas contra el virus de la enfermedad de Newcastle**

### ***Cepas vacunales***

Muchas cepas no velogénicas del VEN son utilizadas en la fabricación de vacunas (Moreno, 1994; Grimes, 2002; Orsi *et al.*, 2009), algunas de estas cepas son:

- V4: No virulenta. Se utiliza en pollos de todas las edades (Moreno, 1994; Grimes, 2002; Alexander *et al.*, 2004; OIE, 2014).
- V4-HR: No virulenta. Es una cepa V4 resistente al calor, termoestable y se utiliza en pollos de todas las edades (Grimes, 2002; Alexander *et al.*, 2004).
- Ulster 2C: No virulenta. Termoestable (Orsi *et al.*, 2009).
- I-2: No virulenta. Termoestable. Se utiliza en pollos de todas las edades (Grimes, 2002; Alexander *et al.*, 2004; OIE, 2014).
- PHY.LMV.42: No virulenta (Tafari Paniago, 2012).
- VH: No virulenta (Tafari Paniago, 2012).

- F: Lentogénica. Usualmente utilizada en pollitos, pero es adecuada para uso como vacuna en pollos de todas las edades (Moreno, 1994; Grimes, 2002).
- HB1: Lentogénica. Ligeramente más virulenta que F, se utiliza como vacuna en pollos de todas las edades (Moreno, 1994; Grimes, 2002; Alexander *et al.*, 2004; Orsi *et al.*, 2009; OIE, 2014).
- LaSota: Lentogénica. Causa a menudo síntomas respiratorios luego de la vacunación. Se utiliza como vacuna de refuerzo en parvadas vacunadas inicialmente con F o B1 (Moreno, 1994; Grimes, 2002; Alexander *et al.*, 2004; Orsi *et al.*, 2009; OIE, 2014).
- Clon 30: Lentogénica. Produce menos reacciones que la cepa LaSota. (Moreno, 1994; Alexander *et al.*, 2004; Orsi *et al.*, 2009).
- NDW: Lentogénica (OIE, 2014).
- VG-GA: Lentogénica (Orsi *et al.*, 2009; Tafuri Paniago, 2012).
- Mukteswar: Mesogénica. Es una cepa invasiva, utilizada como vacuna de refuerzo. Puede causar reacciones secundarias si se utiliza en pollos con inmunidad parcial (dificultad respiratoria, pérdida de peso, caída de la producción de huevos o muerte). Usualmente se administra mediante inyección (Grimes, 2002; Alexander *et al.*, 2004; OIE, 2014).
- Komarov: Mesogénica. Menos virulenta que Mukteswar, utilizada como vacuna de refuerzo. Usualmente administrada mediante inyección (Grimes, 2002; Alexander *et al.*, 2004; OIE, 2014).
- Roakin: Mesogénica. Causa reacciones secundarias, recomendada solo en aves de más de cuatro semanas de edad (Tafuri Paniago, 2012; OIE, 2014).



### ***Tipos de vacunas contra VEN***

El principio de la vacunación contra una enfermedad viral es conocida: provocar una respuesta inmunológica contra el virus de una manera que no cause la enfermedad. La forma más sencilla de hacerlo es tomar el virus, matarlo, y luego inyectarlo en el ave. Esta es una vacuna inactivada. Otro enfoque es seleccionar un virus de origen natural que no sea capaz de causar la enfermedad en forma grave o virulenta, e infectar a las aves con este virus. Esta es una vacuna viva. Este último enfoque se puede modificar aún más mediante la adopción de un virus natural no virulento y seleccionar un clon de la población de virus con propiedades deseables, tales como la falta de reacciones vacunales, o tolerancia al calor. Esta es una vacuna viva clonada. Por último, es posible modificar genéticamente una vacuna mediante, por ejemplo, tomar parte del material genético del virus que codifica para un antígeno de superficie, y la inserción de este en otro virus diferente, para producir una vacuna recombinante (Alexander *et al.*, 2004).

Estos diferentes enfoques de la vacunación se han aplicado a EN. Hay tres tipos de vacunas utilizadas para la EN: lentogénica viva, mesogénicas vivas e inactivadas (Alexander *et al.*, 2004).

Las vacunas lentogénicas vivas se derivan generalmente de virus de campo que se ha demostrado que tienen una baja patogenicidad para las aves de corral, pero producen una respuesta inmune adecuada. Cepas vacunales típicas son HB1, LaSota y F, y algunos virus del patotipo entérico asintomático, que se basan por lo general en los virus V4 o Ulster 2C (Alexander *et al.*, 2004).

### ***Vacunas inactivadas***

Las vacunas inactivadas son producidas por el crecimiento de VEN en huevos, y luego tratar el fluido alantoideo infeccioso con un agente de inactivación, tal como formalina o betapropiolactona. Un adyuvante, tal como aceite mineral, por lo general se añade para hacer al virus inactivado más inmunogénico. Dado que la vacuna no es capaz de replicarse o propagación, tiene que ser inyectada individualmente en cada ave. Normalmente se inyecta en la parte posterior del músculo del muslo (a veces se utiliza el músculo de la pechuga), utilizando 0,3 o 0,5 ml por ave. Las vacunas inactivadas producen niveles muy altos de anticuerpos contra VEN, y proporcionan una buena protección contra cepas de virus virulentas. Usualmente se aplican luego de una vacunación inicial con virus vivo (Alexander *et al.*, 2004).

### ***Vacunas vivas***

Las vacunas vivas difieren de las vacunas inactivadas en que se pueden replicar en el huésped. Esta es una ventaja y una desventaja. Es una ventaja, ya no es necesario vacunar cada ave individualmente, el virus vacunal puede propagarse por sí mismo de un ave a otra. Sin embargo, es una desventaja, ya que, dado que una infección con un virus vivo está involucrada, esta puede dar lugar a signos clínicos debido a la virulencia innata del virus vacunal o al exacerbar otros organismos que pueden estar presentes, especialmente en el tracto respiratorio (Alexander *et al.*, 2004). La gravedad de esta reacción depende de la cepa vacunal aplicada (Westbury *et al.*, 1984), y de la presencia o no de infección concurrente con otros patógenos (Alexander *et al.*, 2004).

Otra ventaja de las vacunas vivas en comparación con las vacunas inactivadas, es su facilidad de aplicación, ya que pueden ser aplicadas en

agua o por vía ocular. La mayoría de las vacunas vivas se derivan de cepas lentogénicas o entéricas asintomáticas (Alexander *et al.*, 2004).

El nivel de reacción vacunal es una consideración importante para la producción intensiva de aves de corral, dado que HB1 tiene reacciones vacunales muy suaves, ha sido ampliamente utilizada para la vacunación inicial de aves de corral en producciones intensivas. LaSota produce reacciones vacunales moderadas, especialmente en aves inmunológicamente desprotegidas y no se recomienda para la vacunación primaria (Alexander *et al.*, 2004).

Algunas vacunas lentogénicas han sido clonadas tomando un virus infeccioso y propagando una población homogénea de este, con el objetivo de seleccionar un virus con menos reacciones vacunales que los virus tipo LaSota, mientras conservan su inmunogenicidad superior en comparación con un virus tipo HB1. Un ejemplo de este tipo de vacuna es Clon 30 (Alexander *et al.*, 2004).

Todas las vacunas de virus vivo tienen la desventaja de necesitar conservarse a bajas temperaturas para mantener su eficacia (Alexander *et al.*, 2004).

Lambrecht *et al.* (2004) encontraron que tanto las vacunas vivas como las inactivadas inducen respuesta inmune tanto humoral como mediada por células, solo que esta última se alcanza más lentamente en las vacunas de virus inactivados, debido a que las cepas de las vacunas de virus vivos replican dentro del huésped y las inactivadas no.

Perozo (2012) indica que las vacunas de virus vivo por lo general replican en el tejido respiratorio o intestinal del huésped, dependiendo de la cepa vacunal induciendo respuesta inmune humoral y mediana por células,

mientras que la respuesta inducida por las vacunas inactivadas es dosis-dependiente y principalmente humoral.

### ***Vacunas tolerantes al calor***

Algunas cepas entéricas no virulentas han mostrado mucha más resistencia al calor que las cepas lentogénicas convencionales, esta propiedad ha sido aprovechada mediante selección y clonación a fin de obtener vacunas tolerantes al calor, este es el caso de la vacuna NDV4-HR, la cual ha dado buenos resultados en Malasia aplicándose en alimentos, y en África mediante aplicación ocular, otorgando en ambos buena protección contra cepas virulentas del virus (Alexander *et al.*, 2004).

Otra vacuna de esta naturaleza la constituye I-2, la cual ha mostrado buenos resultados en países en vías de desarrollo, especialmente en África, debido a su bajo costo, los pollos vacunados han mostrado buena respuesta contra cepas virulentas de VEN (Alexander *et al.*, 2004).

### ***Vacunas mesogénicas***

Algunas cepas mesogénicas han sido utilizadas durante largo tiempo con fines de vacunación. Sin embargo, estas producen severas reacciones vacunales en poblaciones inmunológicamente desprotegidas, por lo cual no se recomienda su uso en aquellos casos en las cuales las aves carecen de una protección primaria contra VEN. Normalmente las vacunas mesogénicas, tales como Komarov y Mukteswar, son utilizadas como una vacuna secundaria o refuerzo, luego de una vacunación inicial con una cepa lentogénica (Grimes, 2002; Alexander *et al.*, 2004).

### ***Vacunas recombinantes***

VEN tiene dos glicoproteínas de superficie, la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina/neuraminidasa (HN). Los genes que codifican para cualquiera de estas pueden ser insertados en un tipo diferente de virus para hacer una vacuna recombinante (Alexander *et al.*, 2004). Por ejemplo, el gen de fusión se inserta en el virus herpes de los pavos produjo una vacuna que dio una buena protección contra VEN virulento (Morgan *et al.*, 1993), recientemente, una vacuna de este tipo fue probada en Europa, obteniendo resultados similares, con ninguna reacción postvacunal y reducción de la excreción del virus del desafío (Palya *et al.*, 2012).

Una ventaja de esta técnica es que el virus del huésped puede tener mejor estabilidad que VEN. Otra ventaja es que los antígenos de múltiples patógenos diferentes pueden ser insertados en el mismo virus huésped para producir una sola vacuna contra varias enfermedades diferentes (Alexander *et al.*, 2004), por ejemplo, Ogawa *et al.* (1990) desarrollaron una vacuna recombinante insertando la glicoproteína HN de VEN en una región no esencial del virus de la viruela aviar, la vacuna resultante dio buena protección contra ambas enfermedades.

Quizás la ventaja más significativa para uso en campo es que es posible monitorizar la respuesta a la vacuna de forma independiente del virus salvaje pero en su presencia, y por el contrario, es posible detectar anticuerpos contra el virus salvaje en presencia de la vacunación. Esto se hace mediante el uso de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que utiliza un antígeno purificado, y comparando los resultados con los de un ELISA utilizando un antígeno del virus de conjunto (Alexander *et al.*, 2004). Por ejemplo, Makkay *et al.* (1999) prepararon un ELISA utilizando sólo proteína N de VEN como antígeno (ELISA restringido). Este detecta anticuerpos contra el virus salvaje, pero no los anticuerpos contra el virus de

la viruela aviar recombinante que expresan la glicoproteína HN. Un ELISA paralelo usando el virus completo como antígeno detectó anticuerpos contra la vacuna. Este tipo de vacunas se conoce como vacunas con propiedades de diferenciación serológica o vacunas DIVA (OIE, 2014). La figura 5 muestra un esquema del mecanismo de detección de anticuerpos vacunales y de virus salvaje con la aplicación de vacunas DIVA, por simplicidad se supondrá que la vacuna vectorizada solo porta el gen que codifica para la proteína F, y el ELISA restringido solo reconoce como antígeno a la proteína HN.

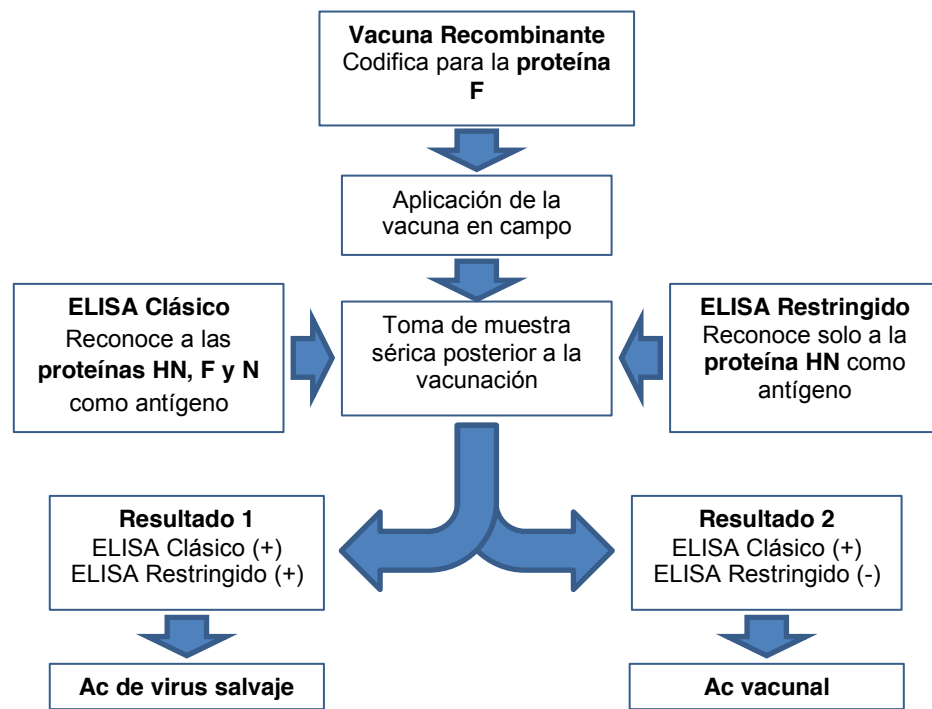


Figura 5. Mecanismo de reconocimiento de anticuerpos vacunales y de virus salvaje de una vacuna recombinante DIVA.

Otros ejemplos de estas vacunas recombinantes (OIE, 2014), son las basadas en virus vaccinia (Meulemans, 1988), virus de la viruela aviar (Bournell *et al.*, 1990; Ogawa *et al.*, 1990; Karaca *et al.*, 1998), virus de la

viruela de las palomas (Letellier *et al.*, 1991), herpesvirus del pavo (Morgan *et al.*, 1992; Morgan *et al.*, 1993; Heckert *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1996), virus de la enfermedad de Marek (Sakaguchi *et al.*, 1998) y virus aviar asociado a adenovirus (Perozo *et al.*, 2008b).

OIE (2014) indica que otros enfoques consisten en el desarrollo de vacunas de subunidades basadas en la expresión a gran escala de proteínas del VEN (normalmente F y/o HN) empleando vectores baculovirus (Nagy *et al.*, 1991; Mori *et al.*, 1994; Fukanoki *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2008) o plantas (Berinstein *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007) y el uso de vacunas de ADN, es decir, ADN de plásmido que codifique proteínas del VEN inmunógenas relevantes (Loke *et al.*, 2005; Rajawat *et al.*, 2008). El establecimiento de un sistema de genética inversa para el VEN (Peeters *et al.*, 1999; Römer-Oberdörfer *et al.*, 1999) ha hecho posible modificar genéticamente el genoma del VEN y desarrollar cepas de VEN con nuevas propiedades, por ejemplo la propiedad de diferenciación serológica (vacunas DIVA) (Peeters *et al.*, 2001; Mebatsion *et al.*, 2002), y la incorporación y expresión de genes extraños, consiguiendo así que el propio VEN sea un vector vacunal para la aplicación a aves de corral (Nakaya *et al.*, 2001; Steel *et al.*, 2008; Schröer *et al.*, 2009).

Una desventaja de las vacunas recombinantes desarrolladas comercialmente ha sido su alto costo (Alexander *et al.*, 2004).

### **Administración de vacunas contra VEN**

Al Garib *et al.* (2003) señalan que la vacunación de aves criadas comercialmente es la única manera de reducir la EN y las pérdidas ocasionadas por la infección, asimismo debe tomarse en cuenta el tipo de vacuna a aplicar, el *status* inmune de las aves, y el nivel de protección requerido en función de las condiciones locales. Indican además que también

es deseable que cuando la vacunación se aplique para detener la transmisión del virus debería inducir suficiente inmunidad a la parvada.

El programa de vacunación ideal para EN sería aquel que protegiera contra la mortalidad de un desafío por un virus virulento en campo, y prevenga la excreción del virus. Desafortunadamente, tal vacuna o plan de vacunación no existe para EN, en parte porque la duración de la inmunidad en las aves es variable dependiendo de la vacuna utilizada, nivel de inmunidad del receptor al momento de la vacunación, y el nivel de inmunogenicidad de la vacuna aplicada. Además, se requieren múltiples exposiciones de vacunas de virus vivo o una combinación de vacunas inactivadas oleosas y de virus vivo para proveer protección contra un desafío virulento en campo. Sin embargo, en la mayoría de las aves, aún con altos niveles de anticuerpos circulantes no se previene la infección o excreción del virus (Senne *et al.*, 2004).

Malo (2008), Cuello *et al.* (2011) y Perozo (2012) destacan que adicionalmente a un plan de vacunación contra VEN es importante considerar como un punto muy importante mantener altos niveles de bioseguridad en la unidad de producción, así, el control de la enfermedad sólo se logra vinculando de una manera correcta un buen programa de bioseguridad y un efectivo programa de vacunación, que incluya tanto a los progenitores como a la progenie.

Si bien tanto las vacunas convencionales como las desarrolladas por ingeniería genética han mostrado buena protección contra desafíos virulentos en campo, las vacunas convencionales siguen siendo las más utilizadas a nivel mundial. Siendo las vacunas de virus vivo las más utilizadas por su facilidad de aplicación por agua o por aerosol y por su bajo costo, las cuales adicionalmente pueden ser aplicadas por goteo en el ojo de las aves (Senne *et al.*, 2004). En ese sentido se han desarrollado y fabricado toda una



serie de equipos que permiten su aplicación a gran escala (Alexander *et al.*, 2004).

Alexander *et al.* (2004) indican que si bien es cierto que la vacunación por vía ocular es más trabajosa que la administración por agua, esta última no garantiza una uniforme aplicación de la vacuna y por ende no necesariamente se alcance una protección homogénea de la parvada.

Las vacunas inactivadas oleosas son utilizadas a menudo para vacunar ponedoras y reproductoras antes del inicio de puesta y luego de una primera inoculación con vacunas de virus vivo. Esta práctica ha mostrado que produce altos niveles de anticuerpos que pueden ser pasados a la progenie. Sin embargo, tal aplicación es costosa y requiere ser aplicada individualmente ave por ave (Senne *et al.*, 2004).

Se han aplicado vacunas a través del alimento utilizando cepas resistentes al calor, usualmente NDV4-HR e I-2, las experiencias en Malasia y países africanos demuestran que se pueden alcanzar niveles aceptables de protección contra EN mediante este tipo de aplicación (Senne *et al.*, 2004; Olabode *et al.*, 2010).

Los planes más utilizados corresponden a una vacunación inicial con vacunas derivadas de HB1, también se utilizan vacunas con cepas Ulster 2C, F y V4, seguida por una vacunación de refuerzo utilizando virus LaSota, la cual es más inmunogénica que HB1 pero también más patogénica, no se recomienda el uso de vacunas del virus LaSota como vacunación inicial en pollitos por sus posibles reacciones, las cuales pueden incluir la muerte de las aves (Senne *et al.*, 2004).

Actualmente están en desuso las vacunas con virus mesogénicos Roakin, Komarov o Mukteswar, si bien estas cepas producen una alta respuesta inmune contra desafíos virulentos en campo, por sus reacciones

postvacunales y mortalidad, solo podrían aplicarse en aves mayores que hayan recibido previamente inmunizaciones con cepas menos patogénicas (Senne *et al.*, 2004).

Serfati-Mizrahi *et al.* (2010) condujeron un ensayo en el cual probaron diferentes dosis de una vacuna recombinante de VEN LaSota utilizando al virus de la influenza aviar H5 como vector, la misma fue aplicada a pollitos de 8 días de edad con altos anticuerpos maternos, los resultados indicaron que la vacuna recombinante mostró mayor sobrevivencia que la vacuna LaSota convencional utilizada como control, y al mismo tiempo protegió a las aves contra ambas enfermedades, EN e influenza aviar. No se reportaron resultados correspondientes a reacciones postvacunales ni excreción del virus del desafío.

### **Excreción del VEN y reacciones postvacunales**

Las vacunas actuales contra VEN pueden ser efectivas en la prevención de la enfermedad clínica, y reducen considerablemente la excreción del virus durante la infección. Sin embargo, las vacunas comerciales no producen inmunidad esterilizante y no pueden prevenir la replicación viral; por lo cual las aves vacunadas aún excretan VEN en niveles considerables (Afonso y Miller, 2013).

Las diferencias antigénicas entre las vacunas y las cepas virulentas actualmente en circulación pueden facilitar el escape y la evolución de una cepa virulenta de VEN al permitir altos niveles de excreción viral de tales cepas virulentas heterólogas (Afonso y Miller, 2013). En ese sentido, Miller *et al.* (2007) encontraron que la excreción del virus es función de la distancia filogenética entre la cepa vacunal y la cepa de desafío, es decir, mientras más cercanas son las cepas vacunales y de desafío, hay menos excreción de VEN.

En otro estudio, Kapczynski y King (2005) encontraron que las vacunas comerciales mostraron buena protección contra una cepa muy virulenta aislada en California durante un brote en los años 2002-2003, pero ninguno de los planes de vacunación aplicados evitaron la presencia de aves que excretaron VEN virulento.

Otro ensayo similar, conducido por Miller *et al.* (2009) mostró que si bien la distancia filogenética disminuye la excreción viral por parte de las aves infectadas, no la elimina del todo, lo interesante de este estudio fue que el mismo incluyó dos vacunas recombinantes construidas a partir de las proteínas F y HN de la cepa desafío, siendo estas vacunas las que presentaron menor excreción del VEN. Estos resultados parecen indicar que las vacunas actuales protegen contra la enfermedad clínica, pero no evitan la excreción del VEN en un desafío de campo con una cepa virulenta, así, para minimizar la excreción de VEN lo ideal sería elaborar vacunas basadas o construidas a partir de la cepa de desafío aislada en campo (Afonso y Miller, 2013; Miller *et al.*, 2013).

Si bien muchas de las vacunas recombinantes desarrolladas hasta ahora no han tenido mucha aplicación en campo a gran escala, principalmente por su alto costo, Afonso y Miller (2013) reportan que ya en USA los productores están utilizando vacunas recombinantes basadas en herpesvirus de pavo (vacunas HTV vectorizadas), la cual cuenta entre sus ventajas el que no produce las secuelas respiratorias que suelen ocurrir tras la aplicación de vacunas de virus vivo.

Actualmente en Venezuela se están comercializando dos vacunas vectorizadas basadas en herpesvirus de pavo, las cuales son de aplicación *in ovo*, o a pollitos de 1 día de edad por vía subcutánea, y protegen tanto para EN como para la enfermedad de Marek (MSD Animal Health, s. f.; Swiss Agro, s. f.).

Una serie de ensayos conducidos por Higuera *et al.* (2012) indicaron que la aplicación de una de tales vacunas HTV vectorizadas disminuyó significativamente la excreción del virus virulento de desafío, tanto por vía cloacal como por vía traqueal, llegando incluso a estar ausente en varias ocasiones en ambas vías. Resulta interesante señalar que los autores recomiendan la aplicación única de tal vacuna solo en aquellos casos en los que la presión de EN sea baja, en países con alta presión de EN, como es el caso de Venezuela, es recomendable que esta sea parte de un plan de vacunación que incluya refuerzos con vacunas de virus vivo. En ese sentido, Malo (2008), igualmente recomienda vacunar con un refuerzo de vacuna viva para proteger a las aves mientras desarrollan la inmunidad completa con la vacuna recombinante, aproximadamente a las tres semanas de edad.

Perozo (2012) indica que la recomendación que se desprende las experiencias de campo es que es necesaria al menos una vacunación con virus vivo en la incubadora acompañando al producto vectorizado. Esto probablemente por el requerimiento de replicación local en tracto respiratorio para garantizar el establecimiento de una adecuada inmunidad mediada por células en el epitelio respiratorio y/o digestivo.

En la tabla 1 se muestran las variables más significativas de cada tipo de vacuna, como lo son: tipo de cepa, vector, resistencia al calor, aplicación, reacciones post vacunales, excreción del virus, uso en el plan de vacunación, tecnología requerida y costo. Respecto al tipo de cepa, las vacunas vectorizadas pueden utilizar cualquier cepa, a diferencia de la vacuna viva que necesita una cepa asintomática y la vacuna inactivada una cepa lentogénica, por otra parte el vector que utiliza una vacuna vectorizada puede ser cualquiera, en cambio las vacunas vivas como inactivadas necesitan al mismo virus. Las vacunas vivas tienen diferentes vías de aplicación como son por aerosol, agua, alimento y vía sistémica, a diferencia de las vacunas

inactivadas y vectorizadas que solo utilizan la vía sistémica como medio de aplicación. Otro punto importante es que la excreción viral en las vacunas vectorizadas es poca o nula y contrasta con el alto nivel de excreción viral de las vacunas vivas e inactivadas. Para terminar se puede decir que a nivel económico las vacunas vectorizadas por utilizar mayor tecnología para su fabricación tienen un mayor costo respecto a las vacunas vivas e inactivadas.

Tabla 1. Comparativo de las vacunas utilizadas contra el VEN.

<b>Factor</b>	<b>Virus vivo</b>	<b>Virus inactivado</b>	<b>Recombinantes-vectorizadas</b>
<b>Tipo de cepa</b>	Asintomáticas	Lentogénicas	Cualquiera
<b>Vector</b>	El mismo virus	El mismo virus	El mismo virus, otros virus, baculovirus, plásmidos
<b>Resistencia al calor</b>	Depende de la cepa	No	No
<b>Aplicación</b>	Agua, aerosoles, vía ocular, alimentos, inyecciones	Inyecciones, vía ocular	Inyecciones, <i>in ovo</i>
<b>Reacciones post vacunales</b>	Algunas, la severidad depende de la cepa utilizada	Muy pocas o ninguna	Ninguna
<b>Excreción del virus</b>	Alta, si hay cercanía genética entre la cepa de la vacuna y la cepa de campo, poca excreción	Alta, si hay cercanía genética entre la cepa de la vacuna y la cepa de campo, poca excreción	Poca o ninguna
<b>Uso en el plan de vacunación</b>	Refuerzo de otras vacunas	Reproductores, 1ra vacuna, requiere refuerzo	Única vacuna o 1ra vacuna
<b>Tecnología requerida</b>	Cultivos celulares	Inactivación por métodos físicos y químicos	Vectores obtenidos por ingeniería genética (PCR)
<b>Diagnostico</b>	ELISA, HI, PCR	ELISA, HI, PCR	DIVA (Differentiate infected from vaccinated animals)

## **Planes de vacunación para el control del virus de Newcastle en Venezuela**

Los planes de vacunación contra la EN deben ser adaptados a cada región de acuerdo a las cepas presentes en la misma, manteniendo una vigilancia permanente a través de evaluaciones serológicas periódicas, que indiquen el estatus inmunológico de las aves (Perozo *et al.*, 2004).

En las explotaciones comerciales, la realidad es que los esquemas de vacunación deben planificarse a la medida de cada integración, se debe tomar en cuenta el tipo de ave, la carga viral y el tipo de desafío. Es vital poseer la mayor información posible sobre el virus que afecta la zona (caracterización biológica y molecular) y sobre el estatus inmunológico de las aves (Perozo, 2012).

En Venezuela y como consecuencia del alto nivel de desafío presente durante los últimos años, la vacunación al día de edad se realiza con cepas que se replican tanto en el epitelio respiratorio como el digestivo (cepa VG/GA) o con cepas enterotrópicas asintomáticas (V4, Ulster), acompañadas de vacunas inactivadas en *spray* al día 1 y revacunaciones con cepas respirotópicas más invasivas entre 8 y 18 días de edad; esta es una práctica común que genera buenos resultados (Cabello, 2015).

La edad a la cual son aplicadas las vacunas contra la EN es uno de los datos más variables entre granjas, e incluso entre los lotes de una misma granja, siendo una situación común que haya diferencia entre la edad especificada en el plan de vacunación del lote y el momento en el cual realmente se le aplica, las edades (en días) más usadas son (1-4 días, 7-12 días, 14-21 días, observándose que se utiliza de 2 a 3 aplicaciones. En un plan de vacunación cerrado se contempla hasta 5 aplicaciones de vacuna, siendo los días (1-8-10-12 y 16) la edad de vacunación; mientras que para un plan simple se

usan 2 aplicaciones, siendo los días (1 y 14) la edad de vacunación. (Tablas 2 y 3). En Venezuela las empresas avícolas tienen hasta 4 aplicaciones de vacunas contra la enfermedad de Newcastle, siendo la edad en días (1-7-17) los mayormente usados (Tablas 4 al 7) (Cabello, 2015). Actualmente dada la situación del país las empresas avícolas tienen 3 aplicaciones de vacunas contra la enfermedad de Newcastle, siendo la edad en días (1-8-18), como se observa en tabla 8.

Tabla 2. Plan de vacunación cerrado.

<b>DÍA</b>	<b>VACUNA</b>	<b>CEPA</b>	<b>VÍA APLICACIÓN</b>
<b>1</b>	Marek-Gumboro	HVT	Subcutánea
<b>1</b>	Newcastle-Bronquitis-Metaneumovirus	B1B1-Mass	<i>Spray</i>
<b>1</b>	NC	Oleosa	Subcutánea
<b>8</b>	Gumboro	Intermedia	Ocular
<b>10</b>	HCI-Coriza	Inactivada	Subcutánea
<b>12</b>	NC	La Sota	Agua
<b>16</b>	NC-Gumboro	VG/GA-Intermedia plus	Spray

Fuente: Cabello, 2015.

Tabla 3. Plan de vacunación simple.

<b>DÍA</b>	<b>VACUNA</b>	<b>CEPA</b>	<b>VÍA APLICACIÓN</b>
<b>1</b>	Marek-IBD	Vectorizada	Subcutánea <i>in ovo</i>
<b>1</b>	NC-BI	Entérica / H120	<i>Spray</i>
<b>1</b>	NC	Oleosa	Subcutánea
<b>14</b>	NC	Entérica	<i>Spray</i>

Fuente: Cabello, 2015.

Tabla 4. Plan de vacunación estándar empresa privada 2007.

DÍA	VACUNA	CEPA	VÍA APLICACIÓN
1	Marek-Gumboro	HVT-Intermedia	Subcutánea
1	Newcastle-Bronquitis	QV4-H120	<i>Spray</i>
1	Newcastle	Oleosa	Subcutánea
7	Newcastle-Gumboro	La Sota-Intermedia	Oral
14	Newcastle-Gumboro	La Sota-Intermedia Plus	Oral
21	Newcastle	QV4	Oral

Fuente: Cabello, 2015.

Tabla 5. Plan de vacunación estándar para los años 2007-2008.

DÍA	VACUNA	CEPA	VÍA APLICACIÓN
1	Marek-Gumboro	Vectorizada	Subcutánea
1	Bronquitis	H120	<i>Spray</i>
1	Newcastle	Oleosa	Subcutánea
7	Newcastle-Gumboro	La Sota-Intermedia	Oral
17	Newcastle	La Sota	Oral

Fuente: Cabello, 2015.

Tabla 6. Plan de vacunación estándar para los años 2011-2012.

DÍA	VACUNA	CEPA	VÍA APLICACIÓN
1	Marek-Newcastle	Vectorizada	<i>In ovo</i>
1	Bronquitis	H120	<i>Spray</i>
7	Newcastle-Gumboro	La Sota-Intermedia	Oral
17	Gumboro	Intermedia Plus	Oral

Fuente: Cabello, 2015.



Tabla 7. Plan de vacunación estándar para los años 2013-2014.

DÍA	VACUNA	CEPA	VÍA APLICACIÓN
1	Gumboro	Winterfield 2512 y VPI	Oleosa
1	Newcastle	Enterotrópica apatógena PHY.LMV.42	<i>Spray</i>
10	Bronquitis- Newcastle	H120- La Sota	<i>Spray</i>
14	Gumboro	viva atenuada Moulthrop	Agua
20	Newcastle	La Sota	<i>Spray</i>

Fuente: Empresa privada, 2014.

Tabla 8. Plan de vacunación estándar para el año 2015.

DÍA	VACUNA	CEPA	VÍA APLICACIÓN
1	Marek-Gumboro	Vectorizada	Subcutánea/ <i>In ovo</i>
1	Newcastle	Oleosa	Subcutánea
8	Newcastle	La Sota	<i>Spray</i>
12	Gumboro	Luker, intermedia	Agua
18	Newcastle-Gumboro	La Sota-Intermedia	<i>Spray</i>

Fuente: Empresa privada, 2015.

En Venezuela hay un desafío permanente de Newcastle velogénico viscerotrópico, por esta razón tanto productores y empresas privadas han diseñado planes de vacunación basándose principalmente en las zonas donde están ubicadas las granjas de producción, diversidad de explotaciones avícolas (pollo de engorde, ponedora comercial, cría y levante de pollona, reproductoras, incubadoras y otras especies) y sobrepoblación de aves.

Por ejemplo zonas como la Molinera, San Francisco de Asís, Santa Cruz estado Aragua, Barrera, Tinaquillo estado Cojedes, Guigue, Belén estado Carabobo y Tejería estado Miranda son zonas altamente endémicas de

Newcastle donde generalmente empresas privadas y productores integrados utilizan planes de vacunación cerrados donde aplican tanto vacunas vivas e inactivadas hasta 5 veces durante el ciclo productivo (tabla 2).

Las posibles ventajas de establecer este tipo de plan de vacunación es que durante gran parte de su vida, el animal va a estar en contacto con cepas vacunales que pueden desplazar el virus de campo y prevenir la enfermedad. Por otra parte al haber una vacuna inactivada y dos aplicaciones de virus vivo en campo, garantiza que el animal tenga una inmunidad por mayor tiempo y minimice el riesgo de la aparición de la enfermedad al final del ciclo productivo.

Las desventajas es que el animal va a estar sometido en gran parte de su vida a stress por la cantidad de vacunaciones que se le aplican, también ocurre un gasto metabólico disminuyendo los parámetros zootécnicos como peso y conversión, por otra parte hay riesgo que por el intervalo de tiempo tan corto entre cada aplicación de la vacuna, ocurran reacciones en cadena que generen problemas respiratorios, que al estar acompañados con problemas de manejo pueden causar la misma mortalidad y pérdidas económicas que causa la enfermedad de Newcastle.

Otras partes del país como Nirgua estado Yaracuy, Bejuma estado Carabobo y Maracaibo estado Zulia son zonas de incidencia media del virus de Newcastle, en estas zonas las empresas privadas y productores integrados utilizan planes de vacunación que constan de una vacuna Vectorizada donde se utiliza el herpesvirus de pavo como vector, al cual se le inserta el gen que codifica la proteína VP2 del virus de Gumboro, se aplica una vacuna oleosa de Newcastle al día de edad y dos vacunas de virus vivo de Newcastle en campo a los 7 y 17 (tabla 5) o 8 y 18 días (tabla 8). Otras integraciones utilizan el plan de vacunación que comprende una vacuna Vectorizada Marek- Gumboro, vacuna virus vivo Newcastle- Bronquitis más una vacuna

de Newcastle al día de edad y tres vacunas virus vivo de Newcastle los días 7,14 y 21 (tabla 4). Tomando como referencia experiencia y vivencia de campo de médicos veterinarios Venezolanos en la época del 2007 al 2011 la industria avícola tuvo grandes pérdidas económicas causadas por altas mortalidades que genero la enfermedad de Newcastle, la cual se acompañaban por cuadros de inmunosupresión donde estaba involucrado principalmente el virus de Gumboro, agente predisponente para la aparición del virus de Newcastle, dada la inmunosupresión y poca o nula respuesta a las vacunas de Newcastle u otro agente causal.

Por tal razón se observa que la vacuna Vectorizada era la de Gumboro y no la de Newcastle. Una de las ventajas de una vacuna Vectorizada es la disminución en la excreción del virus y que solo se requiere de un refuerzo en campo, esto ayudo a que muchas granjas bajaran su carga viral y al momento de estar en cuarentena disminuyera la incidencia de presentación de cepas agresivas de campo del virus de Gumboro. Sin embargo, las empresas realizaban dos a tres aplicaciones de vacunas virus vivo de Newcastle por el temor de seguir perdiendo animales por la enfermedad de Newcastle.

Por ultimo hay estados como Mérida, Nueva Esparta, Sur de Aragua, Guárico en donde por su geografía, distancia entre granjas y población de aves, el nivel de incidencia y prevalencia de la enfermedad de Newcastle es baja, por esta razón algunas empresas privadas aplican un plan simple de vacunación el cual consta de una vacuna Vectorizada de Marek- Gumboro, una vacuna viva del virus de Newcastle- Bronquitis, una vacuna oleosa de Newcastle al día de edad y una aplicación con una cepa entérica de Newcastle al día catorce en campo (tabla 3). Hay otros productores que utilizan una vacuna Vectorizada de Marek- Newcastle *in ovo*, vacuna de bronquitis al día de edad y una sola aplicación en campo del virus de Newcastle a los 7 días de edad

(tabla 6), a diferencia de la gran mayoría de los planes de vacunación donde se utiliza una vacuna Vectorizada de Marek-Gumboro y revacunaciones en campo del virus de Newcastle, en este plan las revacunaciones que se realizan son del virus de Gumboro. La principal ventaja de este plan de vacunación es que las reacciones postvacunales ocasionadas por múltiples vacunaciones de Newcastle en campo disminuyen. Es decir que bajan o desaparecen problemas respiratorios en los pollos de engorde y progresivamente se reduce la carga viral de Newcastle en las granjas, también hay menor margen de error por la aplicación de vacuna en campo teniendo en cuenta el actual problema que tienen las empresas con el personal de granjas.

Otras integraciones que no tienen acceso a vacunas vectorizadas utilizan vacunas de complejo inmune para el virus de Gumboro y el virus de Newcastle al día de edad más dos revacunaciones en campo con virus vivo de Newcastle y una vacunación contra el virus de Gumboro (tabla 7).

Para concluir se puede decir que la situación que actualmente atraviesa el país y la industria avícola invita a que todos los empresarios, médicos veterinarios y productores independientes sean más eficientes y tengan en cuenta todos los factores externos al momento de elegir el tipo de vacuna, edad de aplicación, vía de aplicación y sobre todo el objetivo final de por qué elegir entre una vacuna virus vivo o una vacuna recombinante para la prevención de la enfermedad de Newcastle en pollo de engorde. ¿Saber si se quiere controlar o erradicar el virus?

Perozo *et al.* (2004) encontraron que bajo condiciones de campo, el plan de vacunación constituido por vacuna viva más inactivada primer día de edad, más dos refuerzos con vacunas vivas mostró mayor protección que el plan de vacunación constituido por vacuna viva al primer día de edad, más dos

refuerzos con vacunas de virus vivo, al ser desafiados con una cepa de EN virulenta venezolana.

Marcano, (2013) condujo un ensayo en el cual se comparó el comportamiento de un plan de vacunación constituido por cepa VG/GA e inactivada oleosa al primer día de edad y dos refuerzos con vacunas de virus vivo, bajo condiciones de laboratorio y de campo. Los animales fueron desafiados a los 28 días con una cepa viscerotrópica velogénica venezolana, y se encontró que bajo condiciones de campo, la presencia de enfermedades inmunosupresoras juega un papel importante en la protección vacunal, ya que las aves en campo presentaron menor protección que las de laboratorio por haber estado las primeras expuestas la enfermedad de Gumboro.

Estos resultados indican que los planes de vacunación aplicados en Venezuela presentan una respuesta muy variable en condiciones de campo, por lo cual deben ser evaluados y seleccionados cuidadosamente antes, durante y después de su aplicación, de tal manera de establecer, dadas las condiciones particulares de cada unidad de producción, el plan más adecuado.

### **Cepas vacunales utilizadas para el control de Newcastle en Venezuela**

Las principales cepas usadas para la elaboración de vacunas son la lentogénicas y mesogénicas, tanto para las inactivadas como para las atenuadas, cuyos valores correspondientes a sus Índices de Patogenicidad Intracerebral, patogenicidad intravenosa y tiempo medio de muerte embrionaria, lo han obtenido a lo largo de los años, (Tabla 9), (Hernández, 2002)

Tabla 9. Cepas vacunales para el control de Newcastle.

Cepas virales	Índice de patogenicidad intracerebral	Índice de patogenicidad Intravenosa	Tiempo de muerte embrionaria (horas)	Virulencia
<b>B1</b>	0,15-0,20	0,0	90-110	Lentógena
<b>La Sota</b>	0,30-0,60	0,0	90-110	Lentógena
<b>Clon 30</b>	0,15	0,0	120	Lentógena
<b>VG/GA</b>	0,1	0,0	120	Lentógena
<b>NDV 6/10</b>	0,0	0,0	> 120	Lentógena
<b>Ulster</b>	0,0	0,0	> 150	Lentógena
<b>Queensland V4</b>	0,16	0,0	> 150	Lentógena
<b>Komarov</b>	1,41	0,0	69	Mesogénica
<b>Roakin</b>	1,45	0,0	68	Mesogénica
<b>Mukterswar</b>	1,44	0,08	46,4	Mesogénica

Fuente: Hernández, 2002.

Dentro de los programas de vacunación bien sea cerrados o simples las vías de aplicación de vacunas para la EN pueden ser subcutánea, *spray*, ocular, agua de bebida o punción alar, esto según la edad y cepa a utilizar; para los programas de control de la enfermedad, las vacunas de virus vivos se aplican, generalmente mediante métodos en masa, es decir, por aerosol o en el agua de bebida. Estas vacunas tienen un efecto protector contra la enfermedad, pero no contra la infección (Perozo, 2012).

En la mayoría de las incubadoras de Venezuela, se realiza la vacunación contra la EN por inyección subcutánea, aplicándose simultáneamente vacunas acuosas y oleosas en una sola inyección; anteriormente se inyectaban por separado y los pollitos tenían que recibir dos inyecciones, lo cual los lastimaba enormemente (Cabello, 2015).

## **CONCLUSIONES**

1. No existe un plan de vacunación que permita eliminar el virus de Newcastle o en su defecto prevenir la enfermedad clínica en el 100% de los animales en granja.
2. Para poder diseñar una vacuna que sea eficiente y específica para una zona o granja como tal, es indispensable aislar el virus de campo y crear una vacuna con la misma cepa, esto no garantiza eliminar totalmente la excreción del virus, pero la minimiza significativamente, estos estudios se han hecho a nivel de laboratorio, pero aún falta una mayor aplicabilidad en el campo.
3. La elección de un plan de vacunación en Venezuela y Latinoamérica está basada en los costos de producción, por tal razón la gran mayoría de productores avícolas prefieren las vacunas vivas, aun existiendo en el mercado vacunas recombinantes-vectorizadas.
4. Las vacunas recombinantes-vectorizadas no se utilizan ampliamente en Venezuela debido principalmente a su alto costo y requerimientos tecnológicos.
5. La vacunación es solo una parte de la bioseguridad que se debe implantar en las granjas avícolas del país, por sí sola no garantiza la protección eficiente contra la enfermedad de Newcastle, debido principalmente a las cepas virulentas que circulan en el país y en Latinoamérica.

## RECOMENDACIONES

1. Es importante que los médicos veterinarios antes de diseñar o instaurar un plan de vacunación en granja conozcan el virus, la patogenicidad, la respuesta inmune que genera y su excreción. Todo esto para saber en qué momento es ideal aplicar una vacuna, vía de aplicación, intervalo de aplicación entre vacunaciones y saber escoger el tipo de vacuna de acuerdo a la granja o zona donde está ubicada la explotación avícola.
2. Conducir ensayos de campo en los cuales se consideren los planes de vacunación usuales y planes de vacunación que incluyan vacunas recombinantes con y sin refuerzos con vacunas de virus vivo, a fin de evaluar su eficacia en presencia de desafíos con cepas velogénicas viscerotrópicas venezolanas.
3. En caso de utilizar vacunas recombinantes-vectorizadas en Venezuela, es recomendable que no se apliquen como vacuna única, sino que además reciban un refuerzo de vacunas de virus vivo a fin de optimizar su protección contra cepas virulentas circulantes en el país.
4. Es indispensable que en el corto plazo las empresas avícolas del país utilicen vacunas *in ovo* con la finalidad de minimizar errores por parte del personal y reducir el número de aplicaciones en campo para los diferentes ciclos y tipos de producción avícola.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso, C. L. & Miller, P. J. (2013). Newcastle disease: progress and gaps in the development of vaccines and diagnostic tools. In: Roth, J. A., Richt, J. A. & Morozov, I. (Eds.). *Vaccines and diagnostics for transboundary animal diseases. Developmental Biology, Vol 135*, pp. 95-106. Basel, Switzerland: Karger.
- Ahmed, K. A., Saxena, V. K., Ara, A., Singh, K. B., Sundaresan, N. R., Saxena, M. & Rasool, T. J. (2007). Immune response to Newcastle disease virus in chicken lines divergently selected for cutaneous hypersensitivity. *International Journal of Immunogenetics*, 34(6), 445-455.
- Alexander, D. J. & Allan, W. H. (1974). Newcastle disease virus pathotypes. *Avian Pathology*, 3(4), 269-274.
- Alexander, D. J. & Parsons, G. (1986). Pathogenicity for chickens of avian paramyxovirus type 1 isolates obtained from pigeons in Great Britain during 1983-85. *Avian Pathology*, 15(3), 487-493.
- Alexander, D. J. & Senne, D. A. (2008). Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Saif, Y. M., Fadly, A. M., Glisson, J. R., McDougald, L. R., Nolan, L. K. & Swayne, D. E. (Eds.). *Diseases of poultry*. 12<sup>th</sup> edition, pp. 75-116. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Professional.
- Alexander, D. J., Bell, J. G. & Alders, R.G. (2004). *Technology review: Newcastle disease with special emphasis on its effect on village chickens*. Roma, Italia: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Al-Garib, S. O., Gielkens, A. L. J., Gruys, E. & Koch, G. (2003). Review of Newcastle disease with particular references to immunity and vaccination. *World's Poultry Science Journal*, 59(2), 185-200.
- Berinstein, A., Sellers, H. S., King, D. J. & Seal, B. S. (2001). Use of a heteroduplex mobility assay to detect differences in the fusion protein cleavage site coding sequence among Newcastle disease virus isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3171-3178.

- Berinstein, A., Vazquez-Rovere, C., Asurmendi, S., Gomez, E., Zanetti, F., Zabal, O., Tozzini, A., Conte Grand, D., Taboga, O., Calamante, G., Barrios, H., Hopp, E. & Carrillo, E. (2005). Mucosal and systemic immunization elicited by Newcastle disease virus (NDV) transgenic plants as antigens. *Vaccine*, 23(48-49), 5583-5589.
- Bournell, M. E. G., Green, P. F., Samson, A. C. R., Campbell, J. I. A., Deuter, A., Peters, R. W., Millar, N. S., Emmerson, P. T. & Binns, M. M. (1990). A recombinant fowlpox virus expressing the hemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against challenge by NDV. *Virology* 178(1), 297-300.
- Brown, C., King, D. J. & Seal, B. S. (1999). Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. *Veterinary Pathology*, 36(2), 125-132.
- Burns Grogan, K., Fernández, R. J., Rojo Barañón, F. J. & García Espinoza, H. (2007). *El sistema inmune de las aves – Una breve revisión*. Recuperado de: <http://www.wattagnet.com/articles/3104-el-sistema-inmune-de-las-aves-una-breve-revision>
- Bwala, D. G., Clift, S., Duncan, N. M., Bisschop, S. P. R. & Oludayo, F. F. (2012). Determination of the distribution of lentogenic vaccine and virulent Newcastle disease virus antigen in the oviduct of SPF and commercial hen using immunohistochemistry. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 520-528.
- Cabello, E. (2015). *Estudio de los planes de vacunación para la enfermedad de Newcastle en pollos de engorde en Venezuela en el período 2002-2012*. Tesis, Especialización en Medicina Aviar, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.
- Cattoli, G., Susta, L., Terregino, C. & Brown, C. (2011). Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(4), 637-656.
- Chimeno Zoth, S., Gómez, E., Carrillo, E. & Berinstein, A. (2008). Locally produced mucosal IgG in chickens immunized with conventional vaccines for Newcastle disease virus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(4), 318-323.

- Cho, S. H., Kwon, H. J., Kim, T. E., Kim, J. H., Yoo, H. S., Park, M. H., Park, Y. H. & Kim, S. J. (2008). Characterization of a recombinant Newcastle disease virus vaccine strain. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(10), 1572-1579.
- Choi, K. S., Lee, E. K., Jeon, W. L. & Kwon, J. H. (2010). Antigenic and immunogenic investigation of the virulence motif of the Newcastle disease virus fusion protein. *Journal of Veterinary Science*, 11(3), 205-2011.
- Choi, K. S., Na, J. J., Ko, Y. J., Choi, C. U. & Kim, J. H. (2003). Characterization of antigenic sites on the rinderpest virus N protein using monoclonal antibodies. *Journal of Veterinary Science*, 4(1), 57-65.
- Cole, R. K. & Hutt, F. B. (1961). Genetic differences in resistance to Newcastle disease. *Avian Diseases*, 5(2), 205-214.
- Collins, M. S., Strong, I. & Alexander, D. J. (1994). Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses". *Archives of Virology*, 134(3), 403-411.
- Cornax, I., Miller, P. J. & Afonso, C. L. (2012). Characterization of live LaSota vaccine strain-induced protection in chickens upon early challenge with a virulent Newcastle disease virus of heterologous genotype. *Avian Diseases*, 56(3), 464-470.
- Cuello, S., Vega, A. & Noda, J. (2011). Actualización sobre la enfermedad de Newcastle. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 12(6). Recuperado de: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060611/061111.pdf>
- De Hoguera, C. M., De Rolo, M., Infante, D., León, A. y Herrera, A. (2000). La enfermedad de Newcastle. *FONAIAP Divulga*, 67, 46-47.
- Degefa, T., Dadi, L., Yami, A., G/mariam, K. & Nassir, M. (2004). Technical and economic evaluation of different methods of Newcastle disease vaccine administration. *Journal of Veterinary Medicine*, 51(7-8), 365-369.
- Dortmans, J. C. F. M., Koch, G., Rottier, P. J. M. & Peeters, B. P. H. (2009). Virulence of pigeon paramyxovirus type 1 does not always correlate with the cleavability of its fusion protein. *Journal of General Virology*, 90(11), 2746-2750.

- Dortmans, J. C. F. M., Peeters, B. P. H. & Koch, G. (2012). Newcastle disease outbreaks: Vaccine mismatch or inadequate application? *Veterinary Microbiology*, 160(1-2), 17-22.
- Dortmans, J. C. F. M., Rottier, P. J. M., Koch, G. & Peeters, B. P. H. (2010). The viral replication complex is associated with the virulence of Newcastle disease virus. *Journal of Virology*, 84(19), 10113-10120.
- Fukanoki, S., Iwakura, T., Iwaki, S., Matsumoto, K., Takeda, R., Ikeda, K., Shi, Z. & Mori, H. (2001). Safety and efficacy of water-in-oil-in-water emulsion vaccines containing Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. *Avian Pathology*, 30(5), 509-516.
- Ganar, K., Das, M., Sinha, S. & Kumar, S. (2014). Newcastle disease virus: current status and our understanding. *Virus Research*, 184, 71-81.
- Grimes, S. E. (2002). *A basic laboratory manual for the small-scale production and testing of I-2 Newcastle disease vaccine*. FAO. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/005/ac802e/ac802e04.htm>
- Härtle, S. & Kaspers, B. (2014). The avian respiratory immune system. In: Schat, K. A., Kaspers, B. & Kaiser, P. (Eds.). *Avian immunology*. 2<sup>nd</sup> edition, pp. 251-263. San Diego, California: Elsevier. Academic Press.
- Heckert, R. A., Riva, J., Cook, S., McMillen, J. & Schwartz, R. D. (1996). Onset of protective immunity in chicks after vaccination with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing Newcastle disease virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase antigens. *Avian Diseases*, 40(4), 770-777.
- Hernández, N. (2002). *Estudio retrospectivo sobre los planes de vacunación para la enfermedad de Newcastle entre 1998 y 2002 para pollos de engorde en la región central de Venezuela*. Tesis, Medicina Veterinaria, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.
- Higuera, S., Martínez, F., Lechuga, M., Dueñas López, D. & Soto García, A. (2012). *Nuevos enfoques en la prevención de la enfermedad de Newcastle velogénica*. Recuperado de: <https://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/nuevos-enfoques-prevencion-enfermedad-t4277/165-p0.htm>

- Instituto Colombiano Agropecuario. (2009). *Guía para la prevención, control y erradicación de la enfermedad de Newcastle*. Bogotá, Colombia: Produmedios.
- Kapczynski, D. R. & King, D. J. (2005). Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine*, 23(26), 3424-3433.
- Kapczynski, D. R., Afonso, C. L. & Miller, P. J. (2013). Immune response of poultry to Newcastle disease virus. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(3), 447-453.
- Karaka, K., Sharma, J. M., Winslow, B. J., Junker, D. E., Reddy, S., Cochran, M. & McMillen, J. (1998). Recombinant fowlpox viruses coexpressing chicken type I IFN and Newcastle disease virus HN and F genes: influence of IFN on protective efficacy and humoral response of chicken following *in ovo* or post-hatch administration of recombinant viruses. *Vaccine*, 16(16), 1496-1503.
- Kim, L. M., King, D. J., Guzman, H., Tesh, R. B., Travassos da Rosa A. P. A., Bueno, R. Jr., Dennett, J. A. & Afonso, C. L. (2008). Biological and phylogenetic characterization of pigeon paramyxovirus serotype 1 circulating in wild North American pigeons and doves. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10), 3303-3310.
- Kommers, G. D., King, J. D., Seal, B. S. & Brown, C. C. (2003). Virulence of six heterogeneous-origin Newcastle virus isolates before and after sequential passages in domestic chickens. *Avian Pathology*, 32(1), 81-93.
- Kommers, G. D., King, J. D., Seal, B. S., Carmichael, K. P. & Brown, C. C. (2002). Pathogenesis of six pigeon-origin isolates of Newcastle disease virus for domestic chickens. *Veterinary Pathology*, 39(3), 353-362.
- Koppad, S., Raj, G. D., Gopinath, V. P., Kirubaharan, J. J., Thangavelu, A. & Thiagarajan, V. (2011). Calcium phosphate coupled Newcastle disease vaccine elicits humoral and cell mediated immune responses in chickens. *Research in Veterinary Science*, 91(3), 384, 390.

- Kouwenhoven, B. (1993). Newcastle disease. In: McFerran J. B. & McNulty M. S. (Eds.). *Virus infections of birds*. pp. 341–361. Amsterdam, Holanda: Elsevier Science Publishers B.V.
- Lam, K. M., Kabbur, M. B. & Eiserich, J. P. (1996). Newcastle disease virus-induced functional impairments and biochemical changes in chicken heterophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 53(3-4), 313-327.
- Lambrecht, B., Gonze, M., Meulemans, G. & van der Berg, T. P. (2004). Assessment of the cell-mediated immune response in chickens by detection of chicken interferon- $\gamma$  in response to mitogen and recall Newcastle disease viral antigen stimulation. *Avian Pathology*, 33(3), 343-350.
- Lee, Y. J., Sung, H. W., Choi, J. G., Lee, E. K., Yoon, H., Kim, J. H. & Song, C.S. (2008). Protection of chickens from Newcastle disease with a recombinant baculovirus subunit vaccine expressing the fusion and hemagglutininneuraminidase proteins. *Journal of Veterinary Science*, 9(3), 301–308.
- León, M. (2007). *Sistema inmunológico veterinario*. Recuperado de: <http://sistema-inmunologico-veterinario.blogspot.com>
- Letellier, C. Burny, A. & Meulemans, G. (1991). Construction of a pigeonpox virus recombinant: expression of the Newcastle disease virus (NDV) fusion glycoprotein and protection of chickens against NDV challenge. *Archives of Virology*, 118(1-2), 43-56.
- Loke, C. F., Omar, A. R., Raha, A. R., & Yusoff, K. (2005). Improved protection from velogenic Newcastle disease virus challenge following multiple immunizations with plasmid DNA encoding for F and HN genes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 106(3-4), 259-267.
- López Coello, C., Arce Menocal, J. & Ávila González, E. (s. f.). *Mitos y realidades del sistema digestivo y sus implicaciones en la productividad*. Recuperado de: [http://www.wpsa-aeca.es/aeca\\_imgs\\_docs/13\\_07\\_21\\_Mitos\\_y\\_realidades\\_del\\_sistema\\_digestivo.pdf](http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/13_07_21_Mitos_y_realidades_del_sistema_digestivo.pdf)

- López Pinedad, R., Machado Tugores, Y. & Serrano Pérez, H. Z. (s. f.). *Coccidiosis aviar. Algunas consideraciones*. Recuperado de: <http://www.monografias.com/trabajos40/coccidiosis-aviar/coccidiosis-aviar.shtml>
- Makkay, A. M., Krell, P. J. & Nagy, E. (1999). Antibody detection-based differential ELISA for NDV-infected or vaccinated chickens versus NDV HN-subunit vaccinated chickens. *Veterinary Microbiology*, 66(3), 209-222.
- Malo, A. (2008). *La enfermedad de Newcastle es una grave amenaza para las parvadas comerciales en América Latina*. Recuperado de: <http://www.wattagnet.com/articles/8863-la-enfermedad-de-newcastle-es-una-grave-amenaza-para-las-parvadas-comerciales-en-america-latina>.
- Marangon, S. & Busani, L. (2006). The use of vaccination in poultry production. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 26(1), 265-274.
- Marcano Martí, R. (2013). *Protección contra la enfermedad de Newcastle en pollos de engorde bajo condiciones experimentales y de campo*. Trabajo de Ascenso, Facultad de Ciencias Veterinaria, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.
- Mast, J. & Demeestere, L. (2009). Electron tomography of negatively strained complex viruses: application in their diagnostics. *Diagnostic Pathology*, 4(5).
- Matsubara, K., Iwata, S. & Nakayama, T. (2012). Antibodies against mumps virus component proteins. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 12(4), 466-471.
- Mebatsion, T., Koolen, M. J. M., de Vaan, L. T. C., de Haas, N., Braber, M., Römer-Oberdörfer, A., van den Elzen, P. & van der Marcel, P. (2002). Newcastle disease virus (NDV) marker vaccine: an immunodominant epitope on the nucleoprotein gene of NDV can be deleted or replaced by a foreign epitope. *Journal of Virology*, 76(20), 10138-10146.

- Meulemans, G., Letellier, C., Gonze, M., Carlier, M. C. & Burny, A. (1988). Newcastle disease virus F glycoprotein expressed from a recombinant vaccinia virus vector protects chickens against live-virus challenge. *Avian Pathology*, 17(4), 821-827.
- Meulemans, G., van der Berg, T. P., Decaesstecker, M. & Boschmans, M. (2002). Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. *Avian Pathology*, 31(5), 515-519.
- Miller, P. J., Afonso, C. L., Spackman, E., Scott, M. A., Pedersen, J. C., Senne, D. A., Brown, J. D., Fuller, C. M., Uhart, M. M., Karesh, W. B., Brown, I. H., Alexander, D. J. & Swayne, D. E. (2010). Evidence for a new avian paramyxovirus serotype 10 detected in rockhopper penguins from Falkland islands. *Journal of Virology*, 84(21), 11496-11503.
- Miller, P. J., Afonso, C. L., El Attrache, J., Dorsey, K. M., Courtney, S. C., Guo, Z. & Kapczynski, D. R. (2013). Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(4), 505-513.
- Miller, P. J., Estevez, C., Yu, Q., Suarez, D. L. & King, D. J. (2009). Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. *Avian Diseases*, 53(1), 39-49.
- Miller, P. J., King, D. J., Afonso, C. L. & Suarez, D. L. (2007). Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine*, 25(41), 7238-7246.
- Moreno Chan, R. (1994). La enfermedad de Newcastle y algunos avances recientes de diagnóstico. *Ciencia Veterinaria*, 6, 49-72.
- Morgan, R. W., Gelb, J., Pope, C. R. & Sondermeijer, P. J. A. (1993). Efficacy in chickens of a herpesvirus of turkeys recombinant vaccine containing the fusion gene of Newcastle disease virus: onset on protection and effect of maternal antibodies. *Avian Diseases*, 37(4), 1032-1040.



- Morgan, R. W., Gelb, J., Schreurs, C. S., Lütticken, D., Rosenberger, J. K. & Sondermeijer, P. J. A. (1992). Protection of chickens from Newcastle and Marek's diseases with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein. *Avian Diseases*, 36(4), 858-870.
- Mori, H., Tawara, H., Nakazawa, H., Sumida, M., Matsubara, F., Aoyama, S., Iritani, Y., Hayashi, Y. & Kamogawa, K. (1994). Expression of the Newcastle disease virus (NDV) fusion glycoprotein and vaccination against NDV challenge with a recombinant baculovirus. *Avian Diseases*, 38(4), 772-777.
- MSD Animal Health. (S. f.). *INNOVAX ND-SB®*. Recuperado de: [http://www.msd-salud-animal.com.ve/Products/INNOVAX-ND-SB/020\\_Detalle\\_de\\_Producto.aspx](http://www.msd-salud-animal.com.ve/Products/INNOVAX-ND-SB/020_Detalle_de_Producto.aspx)
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C. & Studdert, M. J. (1999). *Veterinary Virology*. (3rd ed.). San Diego, California: Academic Press. pp. 411-428.
- Nagy, E., Huber, P., Krell P. J. & Derbyshire J. B. (1991). Synthesis of Newcastle disease virus (NDV)-like envelopes in insect cells infected with a recombinant baculovirus expressing the haemagglutinin-neuraminidase of NDV. *Journal of General Virology*, 72(3), 753-756.
- Nakaya, T., Cros, J., Park, M. S., Nakaya, Y., Zheng, H., Sagrera, A., Villar, E., García-Sastre, A. & Palese, P. (2001). Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *Journal of Virology*, 75(23), 11868-11873.
- Ogawa, R., Yanagida, N., Saeki, S., Saito, S., Ohkawa, S., Gotoh, H., Kodama, K., Kamogawa, K., Sawaguchi, K. & Iritani, Y. (1990). Recombinant fowlpox viruses inducing protective immunity against Newcastle disease and fowlpox viruses. *Vaccine*, 8(5), 486-490.
- Olabode, A. O., Ndako, J. A., Echeonwu, G. O. N., Nwankiti, O. O. & Chukwuedo, A. A. (2010). Use of cracked maize as a carrier for NDV<sub>4</sub> vaccine in experimental vaccination of chickens. *Virology Journal*, 7:67.

- Oláh, I., Nagy, N. & Vervelde, L. (2014). Structure of the avian lymphoid system. In: Schat, K. A., Kaspers, B. & Kaiser, P. (Eds.). *Avian immunology*. 2<sup>nd</sup> edition, pp. 11-44. San Diego, California: Elsevier. Academic Press.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2014). Enfermedad de Newcastle. En: Organización Mundial de Sanidad Animal. (Ed.). *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres 2014, Volumen 1*. Recuperado de: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/>
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (s. f.). *Enfermedad de Newcastle. Fichas de información general sobre enfermedades animales*. Recuperado de: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media\\_Center/docs/pdf/Disease\\_cards/NEWCAS-ES.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/NEWCAS-ES.pdf)
- Orsi, M. A., Doretto Júnior, L., Reischak, D., da Silva, L. H. A., Spilki, F. R., Buzinaro, M. G. & Arns, C. W. (2009). Newcastle disease virus vaccine strains: immunogenicity is not influenced by ICPI. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 11(2), 129-133.
- Palya, V., Kiss, I., Tatár-Kis, T., Mató, T., Felföldi, B. & Gardin, Y. (2012). Advancement in vaccination against Newcastle disease: recombinant HVT NDV provides high clinical protection and reduces challenge virus shedding with the absence of vaccine reactions. *Avian Diseases*, 56(2), 282-287.
- Patología Aviar UPTC. (2006). *Cómo funciona y cuáles son las características del sistema inmune de las aves*. Recuperado de: <http://patologiaaviaruptc.blogspot.com/2006/11/como-funciona-y-cuales-son-las.html>
- Peeters, B. P. H., de Leeuw, O. S., Koch, G. & Gielkens, A. L. J. (1999). Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *Journal of Virology*, 73(6), 5001-5009.

- Peeters, B. P. H., de Leeuw, O. S., Verstegen, I., Koch, G. & Gielkens, A. L. J. (2001). Generation of a recombinant chimeric Newcastle disease virus vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. *Vaccine*, 19(13-14), 1616-1627.
- Perozo Marín, F. (2012). *Actualidades sobre la enfermedad de Newcastle*. Recuperado de: <https://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/actualidades-sobre-enfermedad-newcastle-t4179/165-p0.htm>
- Perozo, F., Marcano, R. & Afonso, C. L. (2012). Biological and phylogenetic characterization of a genotype VII Newcastle disease virus from Venezuela: efficacy of field vaccination. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1204-1208.
- Perozo, F., Nava, J., Rivera, S., Vale Echeto, O., Arrieta, D. & Mavárez, Y. (2004). Evaluación de dos planes de vacunación contra la enfermedad de Newcastle en pollos de engorde de la línea Ross criados bajo condiciones de campo en el estado Zulia, Venezuela. 2. Respuesta inmune y protección ante un desafío experimental. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 14(5), 387-394.
- Perozo, F., Villegas, P., Dolz, R. Afonso, C. L. & Purvis, L. V. (2008a). The VG/GA strain of Newcastle disease virus: mucosal immunity, protection against lethal challenge and molecular analysis. *Avian Pathology*, 37(3), 237-245.
- Perozo, F., Villegas, P., Estevez, C., Alvarado, I. R., Purvis, L. B. & Saume, E. (2008b). Avian adeno-associated virus-based expression of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein for poultry vaccination. *Avian Diseases*, 52(2), 253-259.
- Rajawat, Y. S., Sundaresan, N. R., Ravindra, P. V., Kantaraja, C., Ratta, B., Sudhagar, M., Rai, A., Saxena, V. K., Palia, S. K. & Tiwari, A. K. (2008). Immune responses induced by DNA vaccines encoding Newcastle virus haemagglutinin and/or fusion proteins in maternal antibody-positive commercial broiler chicken. *British Poultry Science*, 49(2), 111-117.

- Rauw, F., Gardin, Y., Palya, V., van Borm, S., Gonze, M., Lemaire, S., van der Berg, T. & Lambrecht, B. (2009). Humoral, cell-mediated and mucosal immunity induced by oculi-nasal vaccination of one-day-old SPF and conventional layer chicks with two different live Newcastle disease vaccines. *Vaccine*, 27(27), 3631-3642.
- Reddy, S. K., Sharma, J. M., Ahmad, J., Reddy, D. N., McMillen, J. K., Cook, S. M., Wild, M. A. and Schwartz, R. D. (1996). Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as an *in ovo* vaccine against Newcastle and Marek's diseases in specific-pathogen-free chickens. *Vaccine*, 14(6), 469-477.
- Reynolds, D. L. & Maraqa, A. D. (2000). Protective immunity against Newcastle disease: the role of cell-mediated immunity. *Avian Diseases*, 44(1), 145-154.
- Römer-Oberdörfer, A., Mundt, E., Mebatsion, T., Buchholz U. J. & Mettenleiter T. C. (1999). Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *Journal of General Virology*, 80(11), 2987-2995.
- Römer-Oberdörfer, A., Werner, O., Veits, J., Mebatsion, T. & Mettenleiter, T. C. (2003). Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *Journal of General Virology*, 83(11), 3121-3129.
- Sakaguchi, M., Nakamura, H., Sonoda, K., Okamura, H., Yokogawa, K., Matsuo, K. & Hira, K. (1998). Protection of chickens with or without maternal antibodies against both Marek's and Newcastle diseases by one-time vaccination with recombinant vaccine of Marek's disease type 1. *Vaccine*, 16(5), 472-472.
- Sánchez, V. M. (2013). *Aplicación de técnicas moleculares para la detección de contaminación con otros agentes virales en vacunas de Newcastle*. Tesis, Maestría en Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

- Schröer, D., Veits, J., Grund, C., Dauber, M., Keil, G., Granzow, H., Mettenleiter, T. C. & Römer-Oberdörfer, A. (2009). Vaccination with Newcastle disease virus vectored vaccine protects chickens against highly pathogenic H7 avian influenza virus. *Avian Diseases*, 53(2), 190-197.
- Seal, B. S., King, D. J. & Meinersmann, R. J. (2000). Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix. *Virus Research*, 66(1), 1-11.
- Senne, D. A., King, D. J. & Kapczynski, D. R. (2004). Control of Newcastle disease by vaccination. *Developments in Biologicals*, 119, 165-170.
- Serfati-Mizrahi, D., Lozano-Dubernard, B., Soto-Priante, E., Castro-Peralta, F., Flores-Castro, R., Loza-Rubio, E. & Gay-Gutiérrez, M. (2010). Protective dose of a recombinant Newcastle disease LaSota-avian influenza virus H5 vaccine against H5N2 highly pathogenic avian influenza virus and velogenic viscerotropic Newcastle disease virus in broilers with high maternal antibody levels. *Avian Diseases*, 51(Supl. 1), 239-241.
- Sharma, J. M. (1999). Introduction to poultry vaccines and immunity. *Advances in Veterinary Medicine*, 41, 481-494.
- Sick, C., Schneider, K., Staeheli, P. & Weining, K. C. (2000). Novel chicken CXC and CC chemokines. *Cytokine*, 12(3), 181-186.
- Sick, C., Schultz, U., Münster, U., Meier, J., Kaspers, B. & Staeheli, P. (1998). Promoter structures and differential responses to viral and nonviral inducers of chicken type I interferon genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 9749-9754.
- Song, Q., Cao, Y., Li, Q., Gu, M., Zhong, L., Hu, S., Wan, H. & Liu, X. (2011). Artificial recombination may influence the evolutionary analysis of Newcastle disease virus. *Journal of Virology*, 85(19), 10409-10414.
- Spickler, A. R. & Sorden, S. (2008). *Enfermedad de Newcastle*. *Archivo de imágenes*. Iowa State University. Recuperado de: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease-images.php?name=newcastle-disease&lang=es>

- Steel, J., Burmakina, S. V., Thomas, C., Spackman, E., García-Sastre, A., Swayne, D. E. & Palese, P. (2008). A combination *in-ovo* vaccine for avian influenza virus and Newcastle disease virus. *Vaccine*, 26(4), 522-531.
- Swiss Agro. (s. f.). *Vectormune HVT NDV*. Recuperado de: <http://www.swissagro.com/productos123f9.html?recordID=62>
- Tafari Paniago, M. (2012). *Prevention of Newcastle disease –past, present and future–*. Eggs Program online. Recuperado de: [http://fs-1.5mpublishing.com/images/ceva/EPO\\_No2-Mar2012.pdf](http://fs-1.5mpublishing.com/images/ceva/EPO_No2-Mar2012.pdf)
- Terregino, C. & Capua, I. (2009). Clinical traits and pathology of Newcastle disease infection and guidelines for farm visit and differential diagnosis. In: Capua, I. & Alexander, D. J. (Eds.). *Avian influenza and Newcastle disease*. pp. 113-122. Milan, Italia: Springer Milan.
- Timms, L. & Alexander, D. J. (1977). Cell-mediated immune response of chickens to Newcastle disease vaccines. *Avian Pathology*, 6(1), 51-59.
- Vargas, M. N. & Uribe, J. W. (2008). Evaluación inmunológica del efecto de un producto inmunoestimulante mannanoligosacárido contra *Salmonella enteritidis* en pollos de engorde. Tesis, Medicina Veterinaria, Universidad La Salle, Bogotá, Colombia.
- Villegas, P. & Perozo, F. (2008). *Experiencias prácticas en el control de la enfermedad de Newcastle*. En: X Congreso Internacional de Avicultura, Maracaibo, Venezuela, Mayo 2008. Recuperado de: [http://www.wpsa-aeca.es/aeca\\_imgs\\_docs/experiencias\\_practicas\\_control\\_newcastle\\_villegas.pdf](http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/experiencias_practicas_control_newcastle_villegas.pdf)
- Westbury, H. A., Parsons, G. & Allan, W. H. (1984). Comparison of the residual virulence of Newcastle disease vaccine strains V4, Hitchner B1 and La Sota. *Australian Veterinary Journal*, 61(2), 47-49.
- Xiao, S., Nayak, B., Samuel, A., Paldurai, A., Kanabagattebasavarajappa, M., Prajitno, T. Y., Bharoto, E. E., Collins, P. L. & Samal, S. K. (2012). Generation by reverse genetics of an effective, stable, live-attenuated Newcastle disease virus vaccine based on a currently circulating, highly virulent Indonesian strain. *PLOS ONE*, 7(12), e52571.

- Yang, Z. Q., Liu, Q. Q., Pan, Z. M., Yu, H. X. & Jiao, X. A. (2007). Expression of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus in transgenic rice and its immunogenicity in mice. *Vaccine*, 25(4), 591-598.
- Yusoff, K. & Tan, W. S. (2001). Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathology*, 30(5), 439-455.