



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Viabilidad de cepas vacunales del virus de la enfermedad de Newcastle en arroz o maíz y respuesta inmune inducida en aves vacunadas vía alimento

NICOLAS UPEGUI PORRAS

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Maestría en Salud Animal
Bogotá, Colombia
2022

Viabilidad de cepas vacunales del virus de la enfermedad de Newcastle en arroz o maíz y respuesta inmune inducida en aves vacunadas vía alimento

NICOLAS UPEGUI PORRAS

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Salud Animal

Directora:

M.V, MSc. Diana Marcela Álvarez Mira

Codirectora:

M.V, Ph.D. Arlen Patricia Gómez Ramírez

Línea de Investigación:

Microbiología e Inmunología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Maestría en Salud Animal

Bogotá, Colombia

2022

*No te preocupes por tus problemas con las matemáticas,
te puedo asegurar que los míos son peores.*

Albert Einstein

*A mis padres, que me han acompañado en
cada etapa de mi vida brindándome su apoyo
para afrontar cada situación y que durante mi
maestría siempre estuvieron conmigo en todo
momento que los necesitaba.*

A la memoria de mi abuela Isabel

A mis amigos.

*La mayoría de las cosas importantes en el
mundo han sido logradas por personas que lo
han seguido intentando cuando parecía que no
había ninguna esperanza.*

Dale Carnegie

Declaración de obra original

Yo, Nicolás Upegui Porras declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Nombre: Nicolás Upegui Porras

Fecha 26/11/2021

Agradecimientos

A mis padres, que siempre están conmigo aún en la distancia.

A las Dras. Diana Marcela Álvarez Mira, Arlen Patricia Gómez Ramírez y Gloria Ramírez Nieto por su acompañamiento, sus aportes en mi formación académica y la confianza depositada para la realización de mi investigación.

Al Dr. William Frend Osorio Zambrano, a quien considero mi mejor ejemplo de que el mejor maestro no es el que sabe más, sino el que hace que sus alumnos aprendan más.

A la Dra. Sandra Milena Vásquez Mejía por brindarme su amistad, su incondicional apoyo y sus enseñanzas.

A la Federación Nacional de Avicultores (FENAVI) por el apoyo financiero para la realización de esta investigación.

A mis compañeros de los laboratorios de patología aviar y de virología por sus aportes y colaboración durante la realización del trabajo y al Bioterio de la facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia por el apoyo para el alojamiento de mis aves experimentales.

Resumen

Viabilidad de cepas vacunales del virus de la enfermedad de Newcastle en arroz o maíz y respuesta inmune inducida en aves vacunadas vía alimento

El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) es uno de los problemas respiratorios más graves que causa importantes pérdidas económicas a los productores avícolas. La aplicación de vacunas vivas a través del alimento se ha postulado como un método eficaz para el control de la enfermedad, siendo ideal para reducir la presentación de signos clínicos y mortalidad en aves de traspatio; sin embargo, en Colombia el uso de esta estrategia es pobremente entendido. El presente estudio determinó la viabilidad de dos virus de baja virulencia del NDV (cepas VH y La Sota) mezclados con arroz y maíz bajo diferentes tipos de preparación y evaluó indicadores de respuesta inmune humoral e innata en aves luego de vacunarlas por vía oral. El título viral fue determinado por el método de Reed & Muench. Luego se realizó RT-qPCR para cuantificar la carga viral. Se obtuvieron resultados más consistentes mezclando la cepa VH con maíz cocido, por lo que la cepa LaSota y todos los otros vehículos fueron descartados del estudio. Posteriormente, 160 pollos machos (Babcock) fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos: un control negativo, y tres grupos vacunados (vía ocular, agua de bebida y vía maíz). Las aves fueron inmunizadas al día 28 de edad con la cepa VH por las vías señaladas y se tomaron sueros al día 1, 15 y 25 de edad y a los 7, 14 y 21 días post-vacunación para su evaluación por IH. Se tomaron parámetros productivos como peso y conversión acumulada. Se cuantificó la excreción viral y la expresión relativa de IL-6 e IFN- γ los días 2 y 4 post-vacunación en macerados de bazo por RT-qPCR. Finalmente, se calcularon índices de peso de órganos linfoides y se tomaron muestras de tejido digestivo, linfoide y respiratorio para evaluación histopatológica. Los resultados indicaron que la cepa VH mostró más estabilidad y el maíz cocido fue el candidato como vehículo. En cuanto a los títulos de anticuerpos hubo diferencias estadísticas significativas entre las vías de administración al día 7, pero no a los 14 y 21 días post-vacunación. No hubo diferencias en los índices linfoides, pero se

observaron diferencias en el grado de lesión histopatológica en cornetes y laringe entre los grupos vacunados y el grupo control los días 2 y 4 post-vacunación. Se evidenció excreción viral en los grupos vacunados comparado con el control, siendo más alta en los grupos ocular y agua al día 2 post-vacunación y en el grupo maíz al día 4 post-vacunación. La expresión de IL-6 se evidenció temprano, pero la expresión de IFN- γ se evidenció solo hasta el día 4 post-vacunación. Este estudio mostró que la vía oral a través del alimento activa la respuesta inmune y que el maíz cocido y la cepa VH podrían ser una estrategia para un programa de control del NDV en aves de traspatio en Colombia.

Palabras clave: inhibición de la hemaglutinación, maíz, virus de la enfermedad de Newcastle, RT-qPCR, vacuna viva, administración oral en alimento.

Abstract

Viability of Newcastle disease virus vaccine strains in rice or corn and immune response induced in poultry vaccinated via feed

Newcastle disease virus (NDV) is one of the most serious respiratory problems causing significant economic losses to poultry producers. The application of live vaccines through food has been postulated as an effective method to control the disease, being ideal to reduce the presence of clinical signs and mortality in backyard birds; however, in Colombia the use of this strategy is poorly understood. The present study determined the viability of two low pathogenic NDV viruses (VH and La Sota strains) mixed with rice and corn under different types of preparation and evaluated both of humoral and innate immune responses in birds after oral vaccination. The viral titer was determined by the Reed & Muench procedure. Then RT-qPCR was performed to quantify viral load. Consistently results were obtained mixing VH strain with cooked corn, so that LaSota strain and the other vehicles were discarded. Subsequently, 160 male chickens (Babcock) were randomly divided into four groups: a negative control, and three vaccinated groups (ocular route, drinking water and corn). The birds were immunized at day 28 of age with the VH strain by the indicated routes and sera were taken at days 1, 15 and 25 of age and at 7, 14 and 21-days post-vaccination for evaluation by HI. Productive parameters such as weight and accumulated conversion were taken. Viral shedding and relative expression of IL-6 and IFN- γ were quantified on days 2 and 4 post-vaccination in spleen by RT-qPCR. Finally, lymphoid organ weight indices were calculated and digestive, lymphoid and respiratory tissue samples were taken for histopathological evaluation. The results indicated that the VH strain showed more stability and cooked corn was the candidate as a vehicle. Regarding antibody titers, there were statistically significant differences between administration routes on day 7, but there were no differences at 14 and 21 days post-vaccination. There were no differences in lymphoid indices, but differences in larynx and turbinates histopathological lesion scores

were seen on days 2 and 4 post-vaccination. Cloacal viral shedding was evident in vaccinated groups compared to the control being higher in eye and water groups on day 2 and in corn group on day 4 post-vaccination. IL-6 expression was evidenced early, but IFN- γ expression was evidenced only up to day 4 post-vaccination. This study showed that the oral route through food activates the immune response and that cooked corn and the VH strain could be a strategy to a NDV control program in backyard poultry in Colombia.

Keywords: corn, hemagglutination inhibition, Newcastle disease virus, live attenuated vaccine, qRT-PCR, oral administration in food.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XVI
Lista de tablas	XVIII
Lista de símbolos y abreviaturas	XIX
Introducción	1
1. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE.....	5
1.1 INTRODUCCIÓN	5
1.2 CONTEXTO HISTÓRICO DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE	7
1.3 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DEL VIRUS.....	8
1.3.1 Clasificación taxonómica	8
1.3.2 Organización del genoma del virus.....	8
1.3.3 Proteínas virales.....	10
1.3.4 Replicación.....	11
1.4 PATOTIPOS Y GENOTIPOS CAUSANTES DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE	13
1.5 HUÉSPEDES Y PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD	14
1.6 RESPUESTA INMUNE CONTRA EL VIRUS.....	16
1.6.1 Respuesta inmune innata	16
1.6.2 Respuesta inmune humoral	17
1.6.3 Respuesta inmune celular	18
1.7 INMUNIZACIÓN.....	19
1.7.1 Características de la respuesta inmune generada por vacunas	19
1.7.2 Dinámica de las inmunoglobulinas.....	20
1.8 PROGRAMAS DE VACUNACIÓN	22
1.9 VACUNACIÓN EN AVES DE TRASPATIO	24
1.9.1 Alternativas para la administración de vacunas	25
Bibliografía.....	28
2. VIABILIDAD DE DOS VIRUS LENTOGÉNICOS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE (CEPAS LASOTA Y VH) EN ARROZ COCIDO, ARROZ CRUDO ACEITADO Y MAÍZ COCIDO A TEMPERATURA AMBIENTE EN DIFERENTES TIEMPOS DE PREPARACIÓN	43
2.1 INTRODUCCIÓN	43
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	45
2.2.1 Cepas vacunales empleadas.....	45

2.2.2	Selección de los vehículos y tratamientos	46
2.2.3	Preparación de las vacunas y su mezcla con los vehículos.....	48
2.2.4	Inoculación en huevos embrionados SPF.....	49
2.2.5	Prueba de hemoaglutinación y determinación del título viral	49
2.2.6	Detección y cuantificación de la carga viral en los vehículos de estudio.....	50
2.3	RESULTADOS	53
2.3.1	Permeabilidad de los vehículos de estudio.....	53
2.3.2	Obtención del título viral	54
2.3.3	Amplificación de genes específicos del NDV	55
2.3.4	Curva estándar.....	56
2.3.5	Amplificación del gen F por RT-qPCR a diferentes dosis de vacuna	57
2.3.6	Cuantificación viral absoluta por RT-qPCR a partir de vehículos cargados con cepas VH y LaSota	58
2.3.7	Evaluación de la aceptabilidad de los vehículos de estudio en aves del Centro Agropecuario Marengo	59
2.4	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	60
	Bibliografía	68
3.	COMPARACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE UN VIRUS DE BAJA VIRULENCIA DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE SOBRE LA RESPUESTA INMUNE EN POLLOS	73
3.1	INTRODUCCIÓN	73
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS	74
3.2.1	Diseño experimental del ensayo de vacunación <i>in-vivo</i>	74
3.2.2	Cepa vacunal y vías de administración empleadas	75
3.2.3	Evaluación de títulos de anticuerpos por la prueba de Inhibición de la hemaglutinación.....	77
3.2.4	Cuantificación absoluta de la excreción de virus vacunal por RT-qPCR.....	77
3.2.5	Determinación de la expresión de genes de inmunidad innata por RT-qPCR	78
3.2.6	Evaluación de los índices de peso de órganos linfoides en respuesta a la vacunación.....	80
3.2.7	Valoración microscópica y macroscópica de lesiones en tejidos	80
3.2.8	Análisis estadístico	81
3.3	RESULTADOS	81
3.3.1	Anticuerpos maternos y respuesta serológica post-vacunación.....	81
3.3.2	Excreción del virus vacunal	83
3.3.3	Expresión relativa de genes de INF- γ e IL-6.....	84
3.3.4	Evaluación de índices de peso de órganos linfoides	86
3.3.5	Examen macro y micro de lesiones en tejidos	86
3.3.6	Monitoreo de reacciones post-vacunales.....	91
3.3.7	Evaluación de parámetros zootécnicos	92
3.4	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	94
3.5	Bibliografía.....	101
4.	Conclusiones y recomendaciones	107
4.1	Conclusiones	107
4.2	Recomendaciones	108
A.	Anexo: Aval del comité de bioética	111

Lista de figuras

Figura 1.1 Organización del genoma del virus de la enfermedad de Newcastle.....	8
Figura 1.2 Estructura del virus de la enfermedad de Newcastle	9
Figura 1.3 Ciclo replicativo del virus de la enfermedad de Newcastle	12
Figura 2.1 Amplificación de los genes M y F por PCR convencional	55
Figura 2.2 Regresión lineal de las curvas de qPCR probadas en el estudio.....	56
Figura 2.3 Consumo de arroz crudo aceitado y arroz y maíz cocidos por ponedoras comerciales.....	59
Figura 3.1 Amplificación de los genes de INF- γ e IL-6 por PCR convencional	85
Figura 3.2 Lesiones en conjuntiva y tráquea del grupo ocular y tonsilas cecales del grupo agua de bebida	87
Figura 3.3 Lesiones en sacos aéreos en grupos vacunados vía oral	87
Figura 3.4 Evaluación comparativa del tamaño y apariencia de órganos linfoides entre las aves de cada grupo	88
Gráfica 2.1 Consumo gramos/ave para cada ingrediente evaluado	60
Gráfica 3.1 Media geométrica de títulos de anticuerpos en la prueba de IH de pollos pre y post- vacunación.....	82
Gráfica 3.2 Excreción del virus vacunal a través de la cloaca	83
Gráfica 3.3 Niveles de expresión génica de IFN- γ e IL-6 a los 2 y 4 días post-vacunación	85
Gráfica 3.4 Monitoreo de reacciones post-vacunales en las unidades experimentales según vía de aplicación.....	91
Gráfica 3.5 Parámetros zootécnicos evaluados durante 7 semanas de experimentación	92

Lista de tablas

Tabla 2.1 <i>Primers</i> dirigidos al gen de la matriz y de fusión.....	51
Tabla 2.2 Títulos obtenidos por el método de Reed & Muench por cepa vacunal, vehículo y tiempo evaluado.....	55
Tabla 2.3 Valores de las curvas estándar probadas para la cuantificación absoluta de la carga viral por qPCR.....	57
Tabla 2.4 Valores de Ct y temperatura <i>melting</i> (Tm) de diferentes dosis de vacuna cargadas en maíz cocido.	58
Tabla 2.5 Comparación del número de copias detectadas por qPCR de cada cepa entre las preparaciones evaluadas.....	58
Tabla 3.1 <i>Primers</i> dirigidos a la amplificación de genes de inmunidad innata	79
Tabla 3.2 Proporción de aves con evidencia de excreción viral a través de la cloaca	84
Tabla 3.3. Índices de peso de bursa, timo y bazo a los 2, 4 y 21 días post-vacunación ..	86
Tabla 3.4 Grados de lesiones microscópicas en aparato digestivo	89
Tabla 3.5 Grados de lesiones microscópicas en aparato respiratorio.....	89
Tabla 3.6 Grados de lesiones microscópicas en sistema linfoide	90

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>NDV</i>	Virus de la enfermedad de Newcastle
<i>IH</i>	Inhibición de la hemaglutinación
<i>HA</i>	Hemoaglutinación
<i>IgA</i>	Inmunoglobulina A
<i>IgY</i>	Inmunoglobulina Y
<i>IgM</i>	Inmunoglobulina M
<i>RT-qPCR</i>	PCR transcriptasa reversa en tiempo real
<i>MPM</i>	Marcador de peso molecular
<i>pb</i>	Pares de bases
<i>rpm</i>	Revoluciones por minuto
<i>Primer F</i>	<i>Primer</i> Forward (hacia Adelante)
<i>Primer R</i>	<i>Primer</i> Reverse (reverso)
<i>IL-6</i>	Interleucina 6
<i>INF</i>	Interferon
<i>EID</i>	Dosis infectiva embrión
<i>Ct</i>	Cycle threshold (umbral de ciclo)
<i>Tm</i>	Temperature melting (temperatura de fusión)
<i>g</i>	gramos
<i>GMT</i>	Promedio geométrico
<i>dpv</i>	Días post-vacunación
<i>AL</i>	Agregados linfoides
<i>GALT</i>	Tejido linfoide asociado a intestino
<i>ND</i>	Newcastle disease (enfermedad de Newcastle)

Introducción

La enfermedad de Newcastle es una de las enfermedades virales más importantes para la industria avícola alrededor del mundo, presenta una amplia distribución en países donde la enfermedad se mantiene endémica causando graves pérdidas económicas y genera vulnerabilidad económica en aquellos países que pretenden exportar sus productos. En el caso colombiano, la industria avícola es bastante dinámica y evoluciona constantemente a través del tiempo, por lo que el acceso a mercados internacionales le exige al país mantener fuertes medidas para el control de esta enfermedad (ICA, 2009).

Los problemas sanitarios asociados a esta entidad ocurren debido a infecciones por cepas virulentas del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), que pertenece al orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, género *Orthoavulavirus*, el cual posee un índice de patogenicidad intra-cerebral de 0.7 - 2.0 o un sitio de activación de la proteína de fusión con múltiples aminoácidos básicos y fenilalanina en la posición 117 (OIE, 2018). Debido a que todos los virus pertenecen a un mismo serotipo, la vacunación a través de cepas lentogénicas como LaSota han sido eficientes para el control de la enfermedad en países endémicos; sin embargo, es frecuente que en poblaciones vacunadas se presenten brotes que conducen a elevada mortalidad y disminuciones drásticas en la producción (Cornax et al., 2012).

Es posible que una de las causas asociadas a la presentación de brotes de la enfermedad sea la presencia de individuos que no tienen inmunidad, un aspecto que es bastante frecuente en predios avícolas de economía familiar. La presencia de aves de traspatio en áreas de producción avícola, el comercio y el movimiento indiscriminado de aves de combate son aspectos de alto riesgo sanitario para la presentación de focos de la enfermedad debido a la ausencia de planes de vacunación en estos individuos, que por su condición de alta susceptibilidad a infectarse podrían ser diseminadoras potenciales en las poblaciones de aves industriales o de traspatio que entren en contacto directo o indirecto

con ellas (Khatun et al., 2018). La prevalencia del virus en aves de patio en países en desarrollo donde la avicultura es principalmente de economía a pequeña escala ha demostrado seroconversión en estos animales (Bell et al., 1990; Bell y Mouloudi, 1988), por lo que es posible encontrar individuos bajo diferentes estadios de infección.

En Colombia la avicultura de traspatio o “familiar” es una fuente importante de sustento en familias campesinas como una estrategia de alivio a las crisis o como diversificación de los medios de vida. En algunas regiones como Boyacá, Antioquia, Cundinamarca y Santander se ha encontrado que estos sistemas generan recursos alimenticios de manera versátil, de alto valor nutritivo y sin mayores gastos debido a que su manejo es sencillo, permitiendo la obtención de los productos a bajo costo, lo cual sirve para el auto-sustento o el acceso a mercado veredal (Alain, 2010).

Estos sistemas pueden incluir varios tipos de aves de corral, predominando gallinas y pollos, con un número aproximado de 50 aves por predio (Calderón y Mora, 2010). Estas características junto a la ausencia de insumos para mantenimiento de la cadena de frío, diferente grado de confinamiento de las aves y la heterogeneidad de las edades en los lotes hace difícil la aplicación de vacunas de forma convencional, lo que convierte a estas unidades productivas en sitios críticos de diseminación del NDV en el territorio nacional.

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la respuesta inmune generada por la administración de una vacuna atenuada contra el NDV a través del alimento en aves obtenidas de una incubadora comercial, determinando la capacidad de ingredientes como arroz y el maíz para ser el vehículo del virus vacunal y la estimulación de la respuesta innata y adaptativa.

Para el desarrollo del trabajo se tomaron muestras de arroz y maíz sometidos a diferentes preparaciones previamente mezclados con una vacuna viva de NDV, a partir de los cuales se determinó el título viral por inoculación de la mezcla en huevos embrionados y la presencia del virus vacunal por RT-qPCR. Adicionalmente se determinó la presencia de anticuerpos producto de la inmunización contra el NDV en aves vacunadas por vía oral en el alimento y se compararon con los títulos obtenidos a través de la técnica de inhibición de la hemaglutinación en aves vacunadas por las vías convencionales. Por último, se midió el nivel de excreción viral a partir de hisopos cloacales y el desarrollo de la respuesta

inmune innata a través de la cuantificación relativa de la expresión de IFN- γ e IL-6 por RT-qPCR en muestras de bazo.

Los resultados de este estudio contribuyen a la implementación de un método alternativo para la administración de una vacuna viva del NDV en aves de corral, con el fin de superar las dificultades que tiene la aplicación de vacunas de manera convencional en los sistemas de traspatio, ampliar la cobertura vacunal en estas unidades productivas y reducir la aparición de brotes de NDV en la población avícola.

1. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

1.1 INTRODUCCIÓN

El NDV es uno de los virus que provoca pérdidas económicas en la avicultura colombiana desde su aparición en los años cincuenta. Dichas pérdidas están representadas entre otras, por incrementos súbitos de la mortalidad que puede llegar a un 100%, exacerbación de enfermedades bacterianas y disminución del rendimiento zootécnico que resulta en efectos negativos en la producción y la calidad del huevo (Mossos et al., 2004). Esta enfermedad es de reporte obligatorio ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y por lo tanto de forma paralela en el país existe su respectivo programa de control y erradicación (ICA, 2009).

La gran similitud en la presentación clínica del NDV con otras enfermedades respiratorias hace que en la mayoría de los casos a nivel de campo no se pueda precisar el agente causal, principalmente durante la fase respiratoria que puede complicarse con agentes secundarios que agravan el cuadro y provocan la muerte de los individuos (Alexander, 2000). Lo anterior hace que se incurra en posibles errores de diagnóstico, lo cual muy posiblemente pueda ser una de las principales causas del endemismo que tiene el virus en Colombia.

Bajo las condiciones del país, se debe tener en cuenta que la presentación de focos es generalmente un resultado multifactorial. Por ejemplo, fallas en los procesos de vacunación que dejan aves susceptibles que facilitan la circulación del virus entre individuos con diferentes niveles de inmunidad (Dortmans et al., 2012), lo cual hace que, a pesar de la implementación de vacunaciones extensivas, aún se produzcan pérdidas económicas por la enfermedad.

El inadecuado manejo de las aves en las granjas como las altas densidades o la mala calidad del ambiente facilita la cadena de transmisión. También debido a fallas de bioseguridad asociadas al reducido control de movimiento de personas, la presencia de insectos, higiene deficiente y a la interacción entre los sistemas de traspatio con los industriales que complica el panorama epidemiológico (Choi et al., 2014).

De las 201.600.918 aves censadas en Colombia el 95,4% son aves de predios tecnificados y el restante 4,6% son aves de traspatio (ICA, 2020). Sin embargo, si se evalúa la proporción en términos de predios ésta se invierte totalmente, donde el 98,7% (463.113) corresponde a aves de traspatio y 1,3% (6.027) a granjas industriales (ICA, 2020). Esto refleja que la abundancia de predios aviares de economía a pequeña escala se ve enmascarada por su amplia dispersión en pequeñas unidades en todo el territorio nacional. Esta situación es relevante, debido a que es muy probable que la presentación impredecible y esporádica de brotes del NDV pueda deberse a que las aves rurales pueden servir como reservorios del virus ya que muchos de los casos reportados involucran a estos sistemas productivos. Por ejemplo, para el año 2014 se presentaron 51 casos en el departamento de Santander relacionado con la cercanía a predios de traspatio (FENAVI, 2018). Finalizando el año 2017 y a inicios del 2018 surgió una inusual presentación de focos de ND en Cundinamarca asociados de igual manera a la cercanía con estos predios. Así mismo, en 2018 la emergencia sanitaria se presentó en los departamentos de Cundinamarca, Huila, Boyacá, Bolívar, Meta, Casanare y Tolima en los cuales se presentaron un total de 39 focos de la enfermedad, que se reportaron tanto en predios de traspatio como de aves de combate (FENAVI, 2018).

Es probable que la principal causa de estos brotes sea la ausencia de condiciones sanitarias adecuadas en estos predios (Calderón y Mora, 2010) por ejemplo, la ausencia de planes de vacunación estrictos; hecho que también se ha reportado en otros países (Abdi et al., 2016; Mebrahtu et al., 2018; Wegdan, Mahasin, & Khalafalla, 2015; Asfaw et al., 2014).

1.2 CONTEXTO HISTÓRICO DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

La enfermedad fue reportada por primera vez en Java (Indonesia) en 1926 y al poco tiempo en Newcastle-Upon Tyne (Inglaterra) en 1927 de donde obtuvo su nombre (Lancaster, 1976). La entidad fue descubierta durante el inicio de la expansión de la avicultura a comienzos del siglo XX y desde 1940 el virus prevaleció en el hemisferio occidental. Posteriormente en 1970 un brote reportado en Estados Unidos fue atribuido a un virus de NDV que fue denominado como velogénico viscerotrópico debido a las lesiones hemorrágicas características en intestino (Alexander y Allan, 1974). En Honduras, y Nicaragua se reportan virus del genotipo V, el cual es el predominante de América del Norte y América Central con reportes tanto en aves comerciales como silvestres (Susta et al., 2014). La manifestación grave de la enfermedad causó confusión con la influenza aviar; sin embargo el nuevo virus también podía manifestarse de forma leve, lo cual dió origen a las primeras ideas en la generación de vacunas vivas con base en cepas poco virulentas (Alexander, Aldous, y Fuller, 2012).

Hacia la década de 1970 los estudios realizados para la caracterización de la entidad lograron brindar información acerca de las proteínas antigénicas del virus, las características bioquímicas de sus aminoácidos y sus interacciones, dando un primer panorama a cerca de las capacidades infectivas de los diferentes aislados (Scheid y Choppin, 1973). Hacia la década de 1980 y 1990 se hicieron importantes avances en la investigación diagnóstica, como fue el desarrollo de técnicas de biología molecular principalmente para la secuenciación del genoma y la estimación de su tamaño (Alexander et al., 2012) y pruebas moleculares robustas para la detección y diferenciación de aislamientos de NDV (Wise et al., 2004).

Los brotes reportados alrededor del mundo como Vietnam, Indonesia, Malasia y Camboya (Choi et al., 2014), Minnesota, Massachusetts, Maine, New Hampshire y Maryland (Miller et al., 2012) y California (Dimitrov et al., 2019a).han establecido dos nichos epidemiológicos típicos: las aves migratorias y las aves de traspatio, de los cuales se ha logrado hacer aislamientos de virus velogénicos en aves muertas lo que demuestra que este virus puede adaptarse a las aves de corral infectando rápidamente aves jóvenes y

adultas, causando lesiones típicas y excretando virus en grandes cantidades, razón por la cual a nivel mundial la vacunación es la mejor manera de controlar la presentación de la enfermedad.

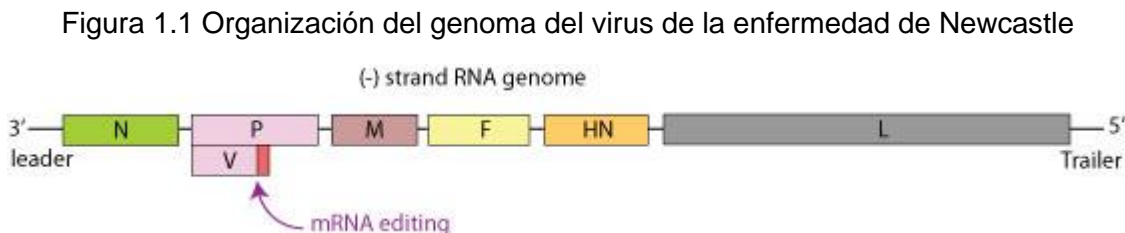
1.3 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DEL VIRUS

1.3.1 Clasificación taxonómica

El Orthoavulavirus aviar tipo I también conocido como el Paramyxovirus aviar tipo I pertenece a la familia *Paramyxoviridae* del orden *Mononegavirales*. El comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) lo agrupa dentro de la subfamilia *Avulavirinae* género *Orthoavulavirus* (ICTV, 2019). Según su patogenicidad se clasifican en velogénicos (viscerotrópicos y neurotrópicos), lentogénicos y mesogénicos, los cuales se refieren al tiempo medio de muerte embrionaria en huevos generado por cada patotipo viral (Alexander y Allan, 1974). Cada patotipo presenta variación en los signos clínicos que produce y sitio de tropismo (Aldous y Alexander, 2001).

1.3.2 Organización del genoma del virus

El NDV posee un genoma RNA de cadena sencilla de polaridad negativa, no segmentado que puede presentar variabilidad en su tamaño, ya sea 15186, 15192 o 15198 nucleótidos de longitud (Czeglédi et al., 2006). El genoma codifica seis proteínas estructurales que incluyen nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), proteína de fusión (F), hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y RNA polimerasa (L) (Nagai et al., 1989) (Figura 1.1).



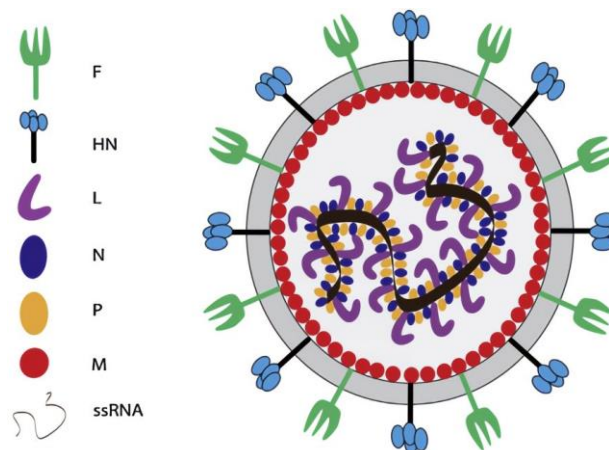
F: gen de fusión, HN: gen de la hemaglutinina-neuraminidasa, L: gen de la proteína larga, N: gen de la nucleocápside, P: gen de la fosfoproteína, M: gen de matriz Fuente: ViralZone. *Paramyxoviridae*.
https://viralzone.expasy.org/556?outline=all_by_species

Típicamente el genoma se organiza de la siguiente manera: una cadena líder promotora de 55 nucleótidos en su extremo 3' y una cadena de 114 nucleótidos en el extremo 5' que flanquean los seis genes en el orden 3'-N-M-P-F-HN-L-5', separados el uno del otro por secuencias intergénicas y su transcripción es dirigida por la presencia de señales de inicio y terminación (Kolakofsky et al., 2005). Una característica importante del genoma es que se entrelaza con un polímero de nucleoproteína a lo largo de toda la plantilla formando una nucleocápside de simetría helicoidal (Kolakofsky et al., 2011). Adicionalmente puede codificar dos proteínas no estructurales (V y W) producto de edición del RNA a partir del segmento que codifica para la fosfoproteína.

El virus presenta una forma esférica con tendencia hacia el pleomorfismo, rodeado por una membrana lipídica que obtiene a partir de las membranas de las células que infecta (Nagai et al., 1989). En su superficie presenta dos moléculas (glicoproteínas) que se ubican a manera de proyecciones interactuando químicamente entre ellas (Jardetzky y Lamb, 2014) (Figura 1.2).

Al interior de la membrana lipídica el genoma viral está rodeado por las proteínas NP que junto con la polimerasa viral y la P forman el complejo ribonucleoproteína (RNP), el cual es responsable tanto de formar la cápside como de la transcripción y replicación del genoma.

Figura 1.2 Estructura del virus de la enfermedad de Newcastle



F: proteína de fusión, HN: hemaglutinina-neuraminidasa, L: proteína larga, N: nucleocápside, P: fosfoproteína, M: proteína de matriz, ssRNA: RNA de cadena sencilla. Fuente: Ganar et al., 2014.

1.3.3 Proteínas virales

El gen NP se transcribe abundantemente en el ciclo viral y cubre la totalidad del genoma como medio de protección contra la degradación intracelular (Dortmans et al., 2010). Su organización le confiere al péptido una simetría helicoidal, que al microscopio electrónico se asemeja a una espina de pescado (Errington y Emmerson, 1997).

Consiste en una proteína altamente fosforilada de 395 aminoácidos que participa en los procesos de replicación y transcripción del genoma. Forma un complejo con la proteína L ejerciendo la función de cofactor de la enzima durante el proceso de síntesis de hebras negativas a partir del anti-genoma de polaridad positiva (Dortmans et al., 2010).

La unión entre la membrana y el complejo RNP está mediado por la proteína de matriz. El gen M no presenta alta variabilidad debida a mutaciones, por lo tanto, está ampliamente conservado entre los *Paramyxovirus*. Esto ha dado pautas en la interpretación de las pruebas moleculares para la detección del NDV, ya que detectar por RT-PCR el gen de la matriz comprueba la presencia del virus en las muestras procesadas (Wise et al., 2004), sin embargo, no se determina si es de alta o baja virulencia.

El péptido F es sintetizado como un precursor (F0) que posteriormente es dividido por proteasas de la célula huésped en dos subunidades. Ambas interactúan con la membrana de la célula iniciando así el proceso de fusión (Jardetzky y Lamb, 2014).

El proceso de clivaje de la proteína F ocurre como primer paso durante el proceso de infección al dividirse en sus dos formas activadas (F1 y F2). La especificidad del punto de escisión es determinada por la secuencia de aminoácidos presente, la cual varía entre cepas y da un panorama de su virulencia (Toyoda et al., 1987).

La HN participa con la proteína de fusión en el proceso de unión a la membrana celular (Gravel y Morrison, 2003). La actividad de la neuraminidasa previene la re-unión de la progenie de virus a las células a medida que brotan de una célula infectada al ambiente extracelular (Bossart et al., 2013).

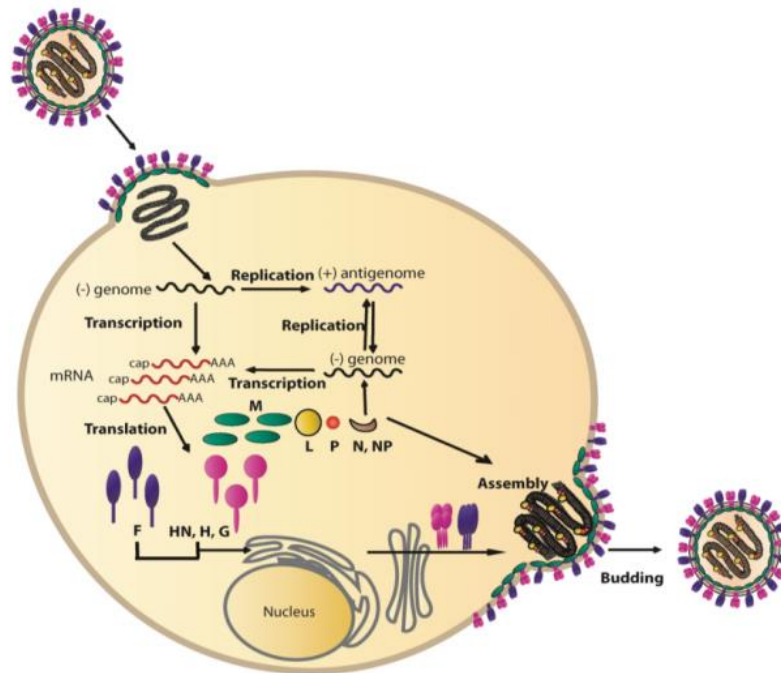
El gen “L” es el más grande y el último en transcribirse. La proteína que genera a partir de su transcripción y traducción se une a P formando el complejo de la RNA polimerasa viral, cuya función es la replicación del genoma, la síntesis de RNA mensajero y la adición tanto del extremo poliadenilado como de la caperuza en la misma molécula (Dortmans et al., 2010). La polimerasa reconoce el complejo RNP durante la replicación y produce nuevas copias al usar éste como template.

La proteína “V” es una proteína no estructural producto de edición del RNA viral debido a la inserción de una Guanina en el marco de lectura abierto (ORF) del gen de la proteína “P” durante el proceso de replicación. Esta proteína modula el proceso de replicación junto con el gen N y es considerado como un factor de virulencia importante ya que participa en el proceso de evasión del sistema inmune al inhibir la respuesta pro-apoptótica de la célula anfitriona. (Park et al., 2003). Así mismo, el péptido inhibe las vías de señalización intracelular para la producción de interferón a través de procesos de degradación proteosomal (Yingjie Sun et al., 2019).

1.3.4 Replicación

Luego de ingresar al organismo el virus se replica en el citoplasma de células del epitelio respiratorio, en donde el RNA de sentido negativo se transcribe desde el extremo 3' generando RNA mensajeros individuales para cada gen a medida que la polimerasa se desplaza a lo largo del genoma, dirigido por secuencias de señales de inicio y terminación durante el proceso de transcripción (Fearn y Collins, 1999). Posteriormente los RNA mensajeros subgenómicos son traducidos a proteínas por ribosomas asociados al retículo endoplásmico. Una vez se ha alcanzado un umbral en la producción de proteína de la nucleocápside el RNA de sentido negativo es convertido a un intermediario replicativo de polaridad positiva que funciona como molde para la síntesis de nuevas copias de RNA negativas (Noton y Fearn, 2015) (Figura 1.3).

Figura 1.3 Ciclo replicativo del virus de la enfermedad de Newcastle



Fuente: Najjar et al., 2014.

En el NDV cada subunidad de la proteína “N” se une de forma precisa a 6 nucleótidos cubriendo la longitud total de la plantilla. Esta característica influye de manera importante en la replicación del virus, ya que ésta es más eficiente cuando la proteína “N” se une a 6 nucleótidos en la secuencia promotora del extremo 3’ (Peeters et al., 2000). Así mismo, al final del proceso cuando las partículas virales se ensamblan la nucleoproteína se debe unir a una secuencia de 6 nucleótidos (Calain y Roux, 1993).

La unión de las nuevas cadenas sintetizadas con el complejo ribonucleoproteína da inicio al proceso de ensamblaje de las partículas virales (Horikami et al., 1996). La proteína M y las glicoproteínas de superficie se ensamblan posteriormente a este complejo y los nuevos virus son liberados de la célula anfitriona.

1.4 PATOTIPOS Y GENOTIPOS CAUSANTES DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

Los diferentes aislados del NDV se han clasificado en patotipos debido a la diversidad de formas de presentación de la enfermedad. Dicha clasificación se ha hecho por medio de pruebas biológicas *in-vivo*, destacando el uso del índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) y el tiempo medio de muerte embrionaria (MTD) (OIE, 2018).

Los virus lentogénicos generan cuadros respiratorios leves en aves jóvenes principalmente, mientras que las cepas velogénicas, a su vez divididas en neurotrópicas y viscerotrópicas, son responsables de cuadros de curso agudo y letal. Las cepas mesogénicas producen sintomatología respiratoria, disminuyen la producción de huevo y la mantienen así por varias semanas. (Aldous y Alexander, 2001; Alexander, 2000). Los aislados del NDV también pueden ser clasificados por su patogenicidad por medio de la determinación de las secuencias de nucleótidos que predicen las características estructurales que inducen el proceso de fusión o las secuencias del sitio de clivaje, dada la importancia del gen F en la virulencia (Millar et al., 1988; Toyoda et al., 1987).

Genéticamente, las cepas del NDV están divididas en dos clases: virus de clase I y de clase II (Diel et al., 2012). Se ha encontrado que los virus de la clase I circulan principalmente en aves silvestres y en su mayoría se han identificado como virus de baja virulencia para las aves domésticas, mientras que los virus de la clase II son mucho más diversos, con al menos XXI genotipos ampliamente distribuidos incluyendo tanto cepas de baja como de alta virulencia que son los principales responsables de la presentación de la enfermedad (Afonso, 2016; Diel, et al., 2012; Dimitrov et al., 2019).

La alta similitud de NDV del genotipo V aislados de diferentes especies de aves resalta la importancia de realizar vigilancia epidemiológica en estas especies, así como de mantener adecuadas medidas de bioseguridad y de vacunación para evitar la introducción de estos virus en los lotes comerciales (Diel, Miller, et al., 2012). Los genotipos VI, XVI, XVII y XVIII endémicos en África oriental y central son los principales responsables de pérdidas económicas en esta zona del continente. La caracterización de virus del genotipo VI aislados de aves asintomáticas principalmente palomas en mercados de aves vivas

sugiere que normalmente hay circulación de este agente en estos individuos produciendo enfermedad de forma ocasional, no obstante, los brotes en pollos donde se ha implicado a este genotipo han sido fruto del contacto con estas aves (Snoeck et al., 2013). De forma similar, la aparición de aves de traspatio con signos clínicos durante reportes de mortalidad por el genotipo XVIII en aves comerciales supone la transmisión directa o indirecta entre estas poblaciones (Snoeck et al., 2013), por lo que la intensificación de la vacunación en aves rurales ha sido alta en el continente africano.

En Suramérica se ha descrito la circulación de los genotipos VII y XII. El primero ha causado brotes de la enfermedad en Venezuela produciendo signos clínicos y alta mortalidad en lotes de pollonas (Perozo et al., 2012), mientras que el segundo ha sido responsable de brotes en Perú, donde análisis filogenéticos han mostrado que estos virus tienen una alta identidad genética con virus aislados de mercados de aves vivas en China (Diel et al., 2012). Así mismo, virus del genotipo XII han sido aislados de brotes en Colombia sugiriendo que pudo haber diseminación por la frontera con Perú (Berhane et al., 2017).

Los genotipos que circulan en Colombia han demostrado ser genéticamente diversos al ser caracterizados por análisis filogenéticos de secuencias completas del gen F, sin embargo, todos se han incluido dentro de la clase II. Los virus aislados han correspondido a los genotipos VII (subgenotipo VIIId), II, XII y I (subgenotipo Ia), demostrando la circulación de cepas virulentas y avirulentas en el país, estas últimas probablemente son de origen vacunal. Varios brotes de gran magnitud asociados al genotipo VII se han relacionado con infecciones producidas por este virus en aves de traspatio y de combate (Berhane et al., 2017).

1.5 HUÉSPEDES Y PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD

El NDV puede afectar aves domésticas tales como pavos, codornices, gansos, gallinas y pollos, así como también un amplio rango de aves silvestres (Alexander, 1986). Se ha reportado la aparición de algunos genotipos que incluyen virus tanto de alta como de baja patogenicidad en aves de hábitos acuáticos (Allison, Gottdenker, y Stallknecht, 2005), aves

ornamentales pertenecientes al orden de las psitácidas (Brown y Bevins, 2017) y palomas (Qiu et al., 2017), siendo importante para estas últimas el genotipo VI que es capaz de transmitirse a las aves de corral y se excreta activamente sin mostrar signos clínicos en los animales infectados (Li et al., 2020).

La transmisión del NDV ocurre entre aves y granjas de manera horizontal principalmente por inhalación o ingestión de partículas virales que entran en contacto con mucosas del tracto respiratorio o la conjuntiva debido al contacto directo con aves infectadas a través de secreciones, heces o contacto indirecto con objetos inanimados, incluso se puede diseminar la enfermedad a grandes distancias por el movimiento no controlado de estos elementos contaminados (Kinde et al., 2004).

La transmisión vertical no se ha probado, sin embargo, se ha encontrado que los pollitos al nacer pueden infectarse al tener contacto con la cáscara del huevo ya que el virus puede permanecer en ella (Roy y Venugopalan, 2005). Por fuera del huésped el virus es estable y puede ser capaz de sobrevivir en el entorno durante más de 16 días en gran variedad de materiales que pueden encontrarse en los ambientes donde viven las aves (Kinde et al., 2004).

La presentación de la enfermedad en las aves de corral puede variar según el tipo de ave, aunque la aparición de los signos clásicos dependerá de la cepa, la edad y el estado inmune del animal (Brown y Bevins, 2017). El período de incubación suele ser de 2 a 15 días después de la exposición (Li et al., 2020). En el pollo la enfermedad se manifiesta con un cuadro respiratorio severo caracterizado por signos como disnea, secreción nasal, inflamación de la cabeza y estornudos que cursan con disminución en la ganancia de peso y alta mortalidad (Swayne, 2013). En gallinas es típico encontrar una disminución abrupta en la producción de huevo con alta mortalidad, signos respiratorios y pérdida de la calidad del huevo asociada a deformación y despigmentación de la cáscara (Rao et al., 2002); hallazgo que es bastante evidente en aves de huevo color marrón. No obstante, si el causante de la infección es una cepa de baja patogenicidad generalmente no se observan signos clínicos en animales adultos, a menos que haya presencia de agentes secundarios o inmunosupresores que exacerben la manifestación clínica (Kapczynski et al., 2013).

Los signos clínicos mencionados pueden acompañarse de sintomatología nerviosa especialmente en aves con baja inmunidad que a menudo desarrollan una infección crónica, y suelen incluir temblores, ataxia, tortícolis, paresia, parálisis de las alas o patas, que se desarrollan aproximadamente a los 5 días después de la infección cuando la cepa implicada es de alta virulencia (Swayne, 2013).

Las aves que se infectan con virus velogénicos como el genotipo VII o genotipo VI son capaces de excretar partículas virales hasta por un período de 2 semanas (aves de corral) con un pico de excreción entre los 2 a 4 días post-infección (Li et al., 2020) y en aves ornamentales como loros y guacamayos hasta 1 año después (Brown y Bevins, 2017).

1.6 RESPUESTA INMUNE CONTRA EL VIRUS

1.6.1 Respuesta inmune innata

La respuesta inmune más primitiva de las aves está diseñada para ser la primera línea de defensa al tratar de inhibir la replicación del NDV, reconociendo patrones moleculares generales de este patógeno para el desarrollo posterior de la respuesta específica, la cual se logra a través del sistema inmune adaptativo (Rue et al., 2011).

Inicialmente este patógeno es reconocido por proteínas presentes en el organismo del ave (TLR por sus siglas en inglés *Toll like receptors*) que funcionan como “centinelas”, produciendo una rápida señalización intracelular y activación de factores como citoquinas proinflamatorias e interferones. Por ejemplo, el NDV estimula la transcripción de genes en leucocitos esplénicos que se traducen para producir IFN α , IFN β IFN- γ e interleuquinas IL-1, 1 β , IL-18, IL-6, IL-8 a las pocas horas del inicio de la infección seguido de la producción de quimioquinas como K203, ah221, CXCL13/BCA-1, CCL21 y MIP3 α que funcionan para configurar la respuesta celular por medio del reclutamiento de leucocitos efectores como los heterófilos (Rue et al., 2011). Así mismo la expresión de beta-defensinas aviares en órganos como el pulmón, proventrículo, tonsilas cecales, glándula de Harder, riñón y cerebro se puede evidenciar a las 48 horas post-infección (Zhang et al., 2019).

La inmunidad innata se desarrolla entre las 24-48 horas post-infección en respuesta a la acelerada replicación del NDV y su intensidad está asociada al nivel de carga viral en el tejido, que a su vez dependerá de la cepa implicada. Tal es el caso de cepas de alta patogenicidad como el genotipo VII que han mostrado ser capaces de producir daño en órganos linfoides en pollos, donde la intensidad de la acción de citoquinas amplifica los efectos inflamatorios, lo cual es responsable de los efectos patológicos en el ave (Zhang et al., 2019).

Por lo tanto, la producción de citoquinas caracteriza estrictamente la patogénesis temprana del virus, el aumento exponencial de estas sustancias asociado con la replicación viral en tejidos con abundantes células linfoides como párpados, bazo o tonsilas cecales provoca una marcada depleción linfocítica a los tres primeros días post-infección; que junto con la producción excesiva de óxido nítrico (NO) por heterófilos y macrófagos generan una respuesta potencialmente destructiva del tejido (Zhang et al., 2019); no obstante, la presencia de inmunidad local (IgA) generada por cepas vacunales de baja patogenicidad como LaSota previene suficientemente la inducción de esta tormenta de citoquinas cuando los títulos vacunales van desde 10^4 EID 50 (Cornax et al., 2012).

1.6.2 Respuesta inmune humoral

El rol de los anticuerpos generados por las aves es un factor clave en la protección contra la infección y futura exposición al NDV. Estas moléculas comienzan a aparecer tan pronto como a los 4-6 días post-infección o post-vacunación (Al-Garib et al., 2003). La presencia de células plasmáticas productoras de las diferentes inmunoglobulinas en órganos linfoides secundarios como la glándula de Harder, el bazo y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) siguen un patrón de distribución y movilización.

Se ha observado que desde el día de edad la tonsila cecal desempeña un papel importante en la inmunidad de las aves debido a que allí se encuentran en mayor proporción células productoras de IgY, IgM e IgA y conforme avanza la edad de los animales comienzan a infiltrar más la glándula de Harder, en donde por medio de ensayos de inmunohistoquímica se ha detectado su presencia en el espacio intersticial de la glándula, el lumen de los lóbulos, espacio interacinar y la parte apical acinar. Este hecho puede deberse a una atrofia

funcional de la tonsila cecal a medida que el ave crece, se enfrenta a su medio ambiente y recibe vacunas contra el NDV (Nasrin et al., 2013).

La inmunidad local representada por la IgA también brinda protección cuando el ingreso del virus se da a través de las mucosas respiratoria, digestiva, o la conjuntiva, siendo activamente transportada a través de células epiteliales por un componente secretorio (Al-Garib et al., 2003); su frecuencia y distribución en aves de un día de edad es mayor, seguido de IgM e IgY (Nasrin et al., 2013).

Los anticuerpos dirigidos contra las HN impiden la unión del virus con su receptor, mientras que los que son dirigidos contra la proteína de fusión evitan que la membrana viral se una con la membrana de la célula; evento que ocurre inclusive en individuos con un nivel bajo de inmunoglobulinas (Kapczynski et al., 2013).

La inmunidad pasiva se da a través de la transferencia de anticuerpos en la fase embrionaria con una vida media (tasa de decadencia) de aproximadamente 3-4 días (Vrdoljak et al., 2017). Estas inmunoglobulinas son: IgY que se depositan en la yema de huevo e IgA que se deposita en la albúmina, la cual será consumida por el embrión generando protección de las mucosas que puede persistir hasta los 21 días de vida del pollito en la conjuntiva, tráquea y pulmones (Nasrin et al., 2013).

1.6.3 Respuesta inmune celular

La protección mediada por células aparece de forma rápida ante la infección por un virus de campo o la aplicación de vacunas vivas, inactivadas o cepas vacunales que bajo condiciones de laboratorio se les hayan retirado componentes estructurales (virus modificados). Esta respuesta participa aún en presencia de bajos niveles de anticuerpos circulantes (títulos de 2 hasta 32) o incluso en ausencia de éstos, por lo que es un componente importante de la respuesta inmune contra el NDV (Reynolds y Maraqa, 2000).

La inmunidad celular protege a las aves induciendo actividad citotóxica, presentando células infectadas en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad y produciendo

citoquinas (Rohollahzadeh et al., 2018). Se ha mostrado que los animales generan una respuesta celular sin diferencias significativas y una respuesta de anticuerpos incluso hacia el virus vacunal sometido a alteración en su estructura en laboratorio, dirigidos a la nucleoproteína o a la fosfoproteína, resaltando la importancia de la conformación de los epítomos para inducir una respuesta, sin embargo, las aves que desarrollan inmunidad celular pero que no producen anticuerpos son susceptibles al desafío por el NDV y por lo tanto desarrollan signos clínicos de la enfermedad (Reynolds y Maraqa, 2000).

Las subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8 son los principales componentes de la respuesta inmune celular contribuyendo a la depuración de células infectadas con el NDV. Esta respuesta puede detectarse a los 2-3 días post-infección así como al poco tiempo luego de un proceso de inmunización, sin embargo, pueden encontrarse algunas diferencias según el tipo de vacunas, por ejemplo, el tiempo de inicio de respuesta es más rápido y fuerte con virus activo, estimulando la proliferación de esplenocitos junto a una marcada producción de IFN- γ . Por su parte, las vacunas inactivadas toman más tiempo en generar este efecto inmunológico (Lambrecht et al., 2004).

Así mismo, al emplear virus activo como LaSota al día 1 con revacunación al día 21 se ha obtenido proliferación de linfocitos T en circulación y en esplenocitos detectado a través de citometría de flujo a partir del día 7 post-vacunación, con mayor proporción de linfocitos CD3 y CD8 en el bazo a los 24 días después de haber vacunado (Martínez et al., 2018).

1.7 INMUNIZACIÓN

1.7.1 Características de la respuesta inmune generada por vacunas

La vacunación se lleva a cabo normalmente mediante el uso de cepas avirulentas que protegen a las aves susceptibles al producir anticuerpos a nivel local, sistémico o ambos.

La aplicación de virus de baja patogenicidad induce inmunidad local y sistémica, mientras que la administración intramuscular o subcutánea de vacunas inactivadas generalmente

induce inmunidad sistémica (Al-Garib et al., 2003). En general la aplicación de vacunas vivas genera un nivel de protección con títulos desde Log 2³ por Inhibición de la hemaglutinación (Mostafijur et al., 2017), a partir del cual se puede tener protección en las aves frente a un brote.

Los títulos alcanzan su pico máximo (6.5 Log₂) entre los 21-28 días con posterior caída de sus niveles hacia la cuarta semana post-vacunación si no se vacuna posteriormente (Al-Garib et al., 2003; Dimitrov et al., 2017).

El nivel máximo de anticuerpos alcanzado por la administración por vía oral en el agua de bebida de la cepa vacunal LaSota ha mostrado perdurar hasta por 4 semanas, momento en el cual empiezan a descender estos niveles de forma gradual durante 7 semanas aproximadamente (Owolodun y Ajiboye, 1975). Las aves que reciben la vacuna son capaces de transmitir el virus vacunal a aves que no se hayan vacunado pero que hayan estado en contacto con las que si la recibieron, sin embargo, aunque la generación de protección en animales susceptibles de esta forma es posible, la protección conferida no se mantiene por largo tiempo y se pierde de manera más rápida que en aves que son vacunadas de manera directa (Owolodun y Ajiboye, 1975).

Las aves vacunadas que se infectan excretarán virus por secreciones respiratorias y cloaca en un periodo de 3-9 días post-infección aún con altos niveles de anticuerpos; dicha excreción puede extenderse hasta al día 21 post desafío en animales con baja inmunidad que hayan estado en contacto con aves vacunadas, por lo que continúan siendo susceptibles a una reinfección (Fentie et al., 2014). Este hecho refleja la importancia de la inmunidad en la mucosa del tracto respiratorio (Sedeik et al., 2019)

1.7.2 Dinámica de las inmunoglobulinas

La cinética de los anticuerpos sistémicos y locales es similar, pero la distribución es diferente si se compara el uso de una vacuna viva con una inactivada, incluso al comparar su aparición en el suero *versus* otros fluidos corporales en donde también pueden ser detectados. Los anticuerpos séricos son producidos principalmente por células

plasmáticas, mientras que aquellos que se pueden detectar en fluidos son producidos localmente gracias a la presencia de centros germinales en sitios como el sistema digestivo o el tracto respiratorio (Chimeno Zoth et al., 2008).

Los anticuerpos vacunales pueden ser detectados luego de 6-7 días al emplear vacunas vivas, los niveles de IgM se incrementan incluso desde el día 4 post-vacunación con pico al día 7, posteriormente disminuyen de manera abrupta. Normalmente se puede detectar esta inmunoglobulina en el suero a niveles basales usando anticuerpos monoclonales por medio de la técnica de ELISA de captura. La IgM puede detectarse también en la bilis, aunque sólo al día 7 post-vacunación (Al-Garib et al., 2003).

La activación de la inmunidad local se evidencia por niveles elevados de IgA en el sistema inmune asociado a la cabeza cuando se replica el virus vivo en la glándula de Harder. La respuesta máxima de la IgA es detectada entre el día 7 y 14 post-vacunación en el suero luego de aplicar la vacuna por vía óculo-nasal y puede persistir en bajos niveles los días 21 a 28 (Al-Garib et al., 2003). Así mismo, este anticuerpo es secretado en la superficie mucosa de la tráquea al emplear el método de vacunación por aerosol; a este nivel el virus es opsonizado cuando ingresa por vía respiratoria antes de que alcance la circulación sistémica.

Pese a que la generación de la inmunidad local es importante, la producción de anticuerpos circulantes (IgY) armoniza la protección al impedir la replicación del NDV en órganos como el oviducto, aspecto principalmente importante en aves de postura comercial o reproductoras debido a que la presencia de anticuerpos antes de que las aves entren en contacto con el virus de campo durante la fase productiva es crucial para reducir los efectos sobre la producción de huevo (Miller et al., 2013).

La IgY puede ser detectada al emplear vacunas vivas desde el día 7 post-vacunación en el suero, en fluidos traqueales y en la bilis a niveles muy cercanos a los encontrados en el suero. En general la respuesta sérica de IgM se mantiene alta a partir del día 14 y los días 21 y 28 post-vacunación. En bilis la IgM solo se detecta a partir del día 14, así como la IgY en suero, tráquea y bilis (Al-Garib et al., 2003).

Cuando se aplican vacunas inactivadas la aparición de los anticuerpos suele ser más retardada, no obstante, el efecto persiste por más tiempo debido al fuerte estímulo de anticuerpos sistémicos. Por su parte, la IgA no se detecta al emplear este tipo de vacunas (Al-Garib et al., 2003).

1.8 PROGRAMAS DE VACUNACIÓN

La comprensión de los mecanismos de desarrollo, maduración y acción del sistema inmune en el ave permiten una mejor gestión de los planes vacunales en las unidades productivas. Las aves se ven expuestas a múltiples desafíos infecciosos desde la incubación, por lo que se debe mantener buen nivel de inmunidad desde temprana edad (Martínez et al., 2018).

La respuesta humoral es ideal para la protección eficiente contra el virus, por lo tanto, los planes de vacunación buscan una adecuada cantidad de anticuerpos circulantes que además duren en el tiempo (Dimitrov et al., 2017). Al plantear un protocolo de vacunación en aves es importante tener pleno conocimiento del estado inmune del lote; esto es, la ausencia de factores inmunosupresores y el nivel de inmunidad pasiva; aspectos que impiden una respuesta vacunal adecuada. Aunque de forma general se prefiere generar protección al día de edad en los lotes es importante tener en cuenta que los niveles de anticuerpos maternos hayan disminuido en los pollitos antes de iniciar un programa de vacunación, ya que pueden bloquear el virus vivo impidiendo su replicación y la consecuente respuesta serológica (Mostafijur et al., 2017), aunque en la práctica se prefiere la vacunación temprana para generar inmunidad en mucosa respiratoria. No obstante, la vacunación en presencia de anticuerpos maternos podría llegar a ser efectiva si el nivel es lo suficientemente bajo (título por inhibición de la hemaglutinación de aproximadamente 4.8) empleando la vía óculo-nasal (Vrdoljak et al., 2017).

La efectividad de las vacunas vivas depende en gran medida de la viabilidad del virus vacunal previo a su aplicación (cadena de frío), su correcta administración y el tiempo para que se genere la respuesta inmune en las aves gracias a su capacidad de replicación. Para conferir una inmunidad prolongada con este tipo de vacunas se debe adoptar un método

de vacunaciones progresivas con cepas cada vez menos atenuadas o complementar con el uso de vacunas inactivadas (Fentie et al., 2014). En Colombia las vacunas registradas incluyen virus vivos, inactivados y recombinantes y se basan en las cepas La Sota, VG/GA, VH y B1. La vacunación en pollo de engorde se hace a edad temprana de manera obligatoria en la planta de incubación por aspersión con refuerzos durante los primeros días de vida. Las aves de larga vida son vacunadas repetidas veces durante la cría-levante y para prevenir la caída de la producción de huevo es común que se aplique una vacuna inactivada antes del inicio de la postura. De esta forma los anticuerpos circulantes y los producidos localmente en el oviducto pueden disminuir la replicación del virus en el tracto reproductivo (Rauw et al., 2017).

La aplicación de vacunas vivas como primo-vacunación cuando la inmunidad pasiva ha disminuido genera una respuesta inmune robusta que luego al combinarse con vacunas inactivadas prolonga la protección y a su vez reduce en gran medida la excreción viral por la tráquea y cloaca (Kapczynski et al., 2013; Martínez et al., 2018). Así mismo, el tropismo de la cepa vacunal determina la efectividad, por ejemplo, las vacunas vivas convencionales pueden ser respiratorias (ej. LaSota, B1) o enterotrópicas (ej. VG/GA), induciendo fuerte inmunidad de mucosas al imitar la ruta de ingreso del virus de campo. Por ende, su administración puede realizarse por vía oral en el agua de bebida, aerosol y óculo-nasal (Dimitrov et al., 2017; Martínez et al., 2018).

La dosis recomendada para aplicar virus vivos es de 10^6 dosis infectivas embrión 50, aunque algunas investigaciones han evaluado la posibilidad de aumentar la respuesta de anticuerpos de estas vacunas al incrementar la dosis de aplicación, en donde puede o no haber un beneficio adicional por encima de manejar el doble de la dosis recomendada dependiendo del título de la vacuna (Cornax et al., 2012; Igwe et al., 2019).

Ya que todos los NDV se agrupan en un solo serotipo y poseen similitud antigénica, es posible utilizar vacunas de genotipo heterólogo para proteger a las aves independientemente del virus implicado, sin embargo, utilizar una vacuna de genotipo homólogo puede otorgar una reducción significativa del nivel de excreción viral al ambiente (Miller et al., 2013). Para el caso de los genotipos II y V vacunar con cepas homólogas al virus de campo significativamente reduce la excreción comparado con el uso de vacunas heterólogas (Miller et al., 2013). Así mismo, esquemas similares se pueden aplicar contra

el genotipo VII que actualmente circula con mayor frecuencia a nivel mundial (Bu et al., 2019), en el que se logra una mejor protección en términos de mortalidad y baja excreción viral al usar vacunas inactivadas de genotipo homólogo (Sedeik et al., 2019)

1.9 VACUNACIÓN EN AVES DE TRASPATIO

La adopción de un esquema de vacunación eficiente en aves de traspatio presenta ciertas limitantes si se compara con los sistemas de producción industrializados. La viabilidad de las vacunas (cadena de frío) y el tipo de manejo que reciben las aves en estos predios son algunas de ellas. Por ejemplo, la presencia de múltiples edades es un factor que impacta directamente la dinámica de población del predio debido a que no es posible vacunar cada vez que nacen nuevos individuos, lo que implica que aquellas aves que nacen durante el intervalo entre vacunaciones solo estarán protegidas por algunas semanas gracias a la inmunidad pasiva (Shrestha et al., 2017). Adicionalmente, estas aves no están confinadas, lo que dificulta la aplicación de biológicos por las vías convencionales aumentando los costos de mano de obra (Samuel et al., 1993).

En países en desarrollo de Asia y África se ha popularizado el uso de cepas termoestables superando la limitante de la inactivación de los biológicos por la ausencia de cadena de frío (Abdi et al., 2016; Mebrahtu et al., 2018; Wegdan, Mahasin, y Khalafalla, 2015), ya que en condiciones de traspatio generalmente no es posible lograr este objetivo.

La base molecular que explica la termorresistencia de aquellos NDV que han demostrado poseerla parece deberse a la proteína hemaglutinina-Neuraminidasa (HN). Cuando la proteína HN de una cepa termolábil del NDV se expone a altas temperaturas esta se inactiva y por consiguiente la unión con el receptor no tiene lugar. Algunos virus quimeras de Newcastle creados en laboratorio con proteínas HN provenientes de virus termoestables y colocadas en cápsides de cepas convencionales han mejorado hasta 9 veces la resistencia a temperaturas de 56°C, induciendo una alta respuesta de anticuerpos en aves luego de haber sido almacenadas a 30°C durante 16 días (Wen et al., 2016). El proceso de selección de cepas termoestables podría ocurrir también de forma natural. El 38% de asilados de campo en algunos estudios han presentado hemaglutininas más

termorresistentes que las de las cepas vacunales comúnmente usadas, por lo que estas poblaciones de virus podrían derivarse de selección de poblaciones heterogéneas presentes en cepas vacunales. Aunque dicha selección podría tomar mucho más tiempo ya que normalmente no se alcanzan temperaturas de 56°C en el ambiente (King, 2001).

1.9.1 Alternativas para la administración de vacunas

La adopción de esquemas de vacunación por vía oral ha sido ampliamente aplicado tanto en sistemas de producción tecnificados como en sistemas de traspatio, para este último es el método de preferencia por su practicidad (Olabode et al., 2010; Asfaw et al., 2014).

La aplicación de vacunas vivas en el agua de bebida puede emplearse en el traspatio con un nivel de protección similar a la vía ocular y aerosol, ya que se logran títulos de anticuerpos suficientemente altos ($\text{Log}_2 > 3$) con un nivel significativo a las 2 semanas post-vacunación sin diferencias significativas entre estos tres métodos, sin embargo, al hacer una comparación más estricta, los títulos de anticuerpos pueden ser ligeramente más altos al emplear la vía aerosol seguida por la ocular y la oral en agua (Mebrahtu et al., 2018).

Otros estudios reportan que se obtienen mejores títulos por medio de la vía ocular comparado con aerosol (Wegdan et al., 2015). La cepa lentogénica LaSota ha mostrado ser eficaz al ser aplicada en poblaciones aviares de traspatio de edades variadas a través de la vía ocular, alcanzando títulos de anticuerpos por encima de los niveles protectores, no obstante, estas aves deben ser revacunadas debido a que pueden permanecer en el predio por períodos de tiempo prolongados y ser susceptibles a la infección en el momento en que su inmunidad cese (Wegdan et al., 2015).

Es posible hacer la primo-vacunación y la posterior revacunación con LaSota o revacunar con una cepa mesogénica, de esta forma se pueden incrementar los anticuerpos y mantener la inmunidad de estos lotes con niveles de mortalidad que pueden variar entre 0 a 5% (Shrestha et al., 2017), sin embargo esto solo se hace en países asiáticos con altos niveles de desafío en donde se ha autorizado su uso.

El método que se escoja debe aplicarse de acuerdo con las características particulares de cada predio de traspatio y con los recursos disponibles por parte del avicultor. En predios con números por encima de 20 individuos es más factible emplear la vía oral ya sea en el agua de bebida o en el alimento ya que es menos laborioso que buscar y atrapar aves individualmente. Adicionalmente es necesario revacunar entre 2-4 semanas después de una primera inmunización para alcanzar un porcentaje de protección de más del 70% de la población con anticuerpos protectores ($\log_2 > 3$), lo cual es ideal para que una población enfrente exitosamente un brote de Newcastle de alta patogenicidad (Mebrahtu et al., 2018). En el caso de la revacunación, los métodos masivos ofrecen más facilidad desde el punto de vista logístico, por lo que el alimento como vehículo de vacunas podría ser una buena estrategia partiendo del hecho que la calidad del agua no siempre se puede garantizar en predios no tecnificados, por lo que su aplicación tiene limitaciones.

La administración de vacunas por vía oral puede hacerse a través del alimento como vehículo, estimulando inicialmente una respuesta inmune en las superficies mucosas del intestino y de tracto respiratorio seguida de la producción de anticuerpos sistémicos en las aves (Wambura, 2009b).

Se debe utilizar un grano de fácil acceso para los trabajadores rurales para que los esquemas vacunales sean al más bajo costo posible (Samuel et al., 1993). Por ejemplo, se ha descrito el uso de granos como maíz, cebada, sorgo, trigo (Abdi et al., 2016) o arroz (Wambura et al., 2011). Se debe tener en cuenta la presencia de sustancias inhibidoras de virus en los granos, las cuales han sido consideradas como una limitante de la efectivización de la vehiculización. Algunas de estas como las lectinas, taninos, alcaloides y ácidos son abundantes en granos como el maíz, la cebada, el sorgo (Musa et al., 2010; Rehmani y Spradbrow, 1995; Abdi et al; 2016) y el arroz (Wambura et al., 2011).

Para superar esta limitante se pueden emplear preparaciones sencillas para aumentar la probabilidad de éxito en la entrega de la vacuna. Los métodos de preparación a emplear pueden ser cocción, trituración, remojo o la combinación de los tres (Asfaw et al., 2014). A modo de ejemplo, se obtienen resultados favorables con el uso de cebada hervida y el maíz triturado, con un nivel de anticuerpos por encima del punto de corte de protección ($\log_2 > 3$) mediante la prueba de Inhibición de la hemaglutinación en más del 60% de la

población (Abdi et al., 2016), sin embargo, es recomendable realizar una revacunación entre las 2-3 semanas después para aumentar el porcentaje de individuos con anticuerpos protectores (Asfaw et al., 2014). Por su parte, el uso de maíz entero en remojo por tres días o su cáscara bajo el mismo tratamiento también ha mostrado mejorar la recuperación de adecuados títulos del virus vacunal a través de pasajes de estas preparaciones en huevos embrionados SPF. Luego de administrar la vacuna los anticuerpos generados también han mostrado oscilar alrededor del punto de corte anteriormente mencionado (Olabode et al., 2010).

El arroz también es una buena alternativa para vacunar aves de patio, es de bajo costo y funciona bien para inmunizar diferentes tipos de aves como palomas, gallinas de guinea y pollos (Wambura y Kataga, 2011). La respuesta serológica al emplear este vehículo se puede obtener a los 7 días post-vacunación con una seroconversión del 100% de los individuos al día 28 post-vacunación, con excepción de las palomas que inician la respuesta inmune 7 días más tarde que las demás especies de aves (día 14 post-vacunación). Se ha reportado que su eficacia aumenta si se suministra crudo embebido en aceite vegetal o cocinado para posteriormente ser mezclado con la vacuna. Ambos métodos son bien aceptados por las aves, demostrado por un consumo rápido del mismo, aproximadamente entre 15 y 30 minutos en pollos y palomas respectivamente (Wambura, 2009; Wambura y Wilson, 2009) o entre 5 y 45 minutos en pollos (Samuel et al., 1993). En términos de títulos la protección de la vacuna vía arroz cocinado ofrece una protección similar a la vía intranasal, (título IH en Log₂ de 9.6 y 10.1 respectivamente).

De acuerdo con lo anterior, todos los métodos de aplicación de vacunas se han probado en traspatio y han mostrado diferentes resultados, sin embargo, la administración masiva es más atractiva debido a las características de manejo de estos predios, por lo que es necesario explorar estrategias para la vacunación en masa de estas aves, como el uso del alimento como vehículo de vacunas a virus activo. En general los tratamientos reportados en la literatura científica para preparar diferentes granos han mostrado una efectividad similar para evitar que los componentes propios de los vehículos afecten al virus vacunal luego de ser mezclados, sin embargo, son pocos los estudios realizados en este campo donde se evalúen componentes adicionales que ofrezcan mayor información sobre la efectividad de inmunizar con este método, como la estabilidad del biológico una vez

mezclado con el vehículo, la caracterización del tipo de respuesta inmune que se estimula y la seguridad del proceso.

Bibliografía

- Abdi, R. D., Amsalu, K., Merera, O., Asfaw, Y., Gelaye, E., Yami, M., y Sori, T. (2016). Serological response and protection level evaluation in chickens exposed to grains coated with I2 Newcastle disease virus for effective oral vaccination of village chickens. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0785-6>
- Adhikari, B. ; Oli, P. ; Torley, P.J. y Ward, R. (2014). Parboiled Rice: Understanding from a Materials Science Approach. *Journal of Food Engineering*, 124, 173–183. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.09.010>
- Dimitrov, K.M., Ramey, A.M., Qiu, X., Bahl, J y Afonso, C.L. (2016). Temporal, geographic, and host distribution of Avian paramyxovirus 1. *Infection, Genetics and Evolution*, 39, 22-34. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.008>
- Al-Garib, S. O., Gielkens, A. L. J., Gruys, E., Hartog, L., y Koch, G. (2003). Immunoglobulin Class Distribution of Systemic and Mucosal Antibody Responses to Newcastle Disease in Chickens. *Avian Diseases*, 47(1), 32–40. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2003\)047\[0032:icdosa\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2003)047[0032:icdosa]2.0.co;2)
- Alain, H. y Florian, M. (2010). Estudio comparativo del estado de la viabilidad de la pequeña avicultura en cuatro micro regiones de Colombia. 1–112. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/850/eam68.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Alders, R. G. (2014). Making Newcastle disease vaccines available at village level. *The Veterinary Record*, 174(20), 502–503. <https://doi.org/10.1136/vr.g3209>
- Alders, R., y Spradbrow, P. (2001). *Controlling Newcastle Disease in Village Chickens: a Field Manual*.
- Aldous, E. W., y Alexander, D. J. (2001). Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathology*, 30(2), 117–128.

- <https://doi.org/10.1080/03079450120044515>
- Alexander, D. J. (2000). Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 19(2), 443–462. <https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1231>
- Alexander, D. J., y Allan, W. H. (1974). Newcastle disease virus pathotypes. *Avian Pathology*, 3(4), 269–278. <https://doi.org/10.1080/03079457409353840>
- Alexander, Dennis J., Aldous, E. W., y Fuller, C. M. (2012). The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathology*, 41(4), 329–335. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.697991>
- Bell, J. G., Kane, M., y Lejan, C. (1990). An investigation of the disease status of village poultry in Mauritania. *Preventive Veterinary Medicine*, 8(4), 291–294. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(90\)90086-W](https://doi.org/10.1016/0167-5877(90)90086-W)
- Bell, J. G., y Mouloudi, S. (1988). A reservoir of virulent Newcastle disease virus in village chicken flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, 6(1), 37–42. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(88\)90024-4](https://doi.org/10.1016/0167-5877(88)90024-4)
- Bensink, Z., y Spradbrow, P. (1999). Newcastle disease virus strain I2 - A prospective thermostable vaccine for use in developing countries. *Veterinary Microbiology*, 68(1–2), 131–139. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00069-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00069-3)
- Berhane, Y., Hisanaga, T., Xu, W., Campos, N. A. M., Kehler, H., Pasick, J., y Calderón, C. P. (2017). Characterization of Colombian serotype 1 avian paramyxoviruses, 2008–2010. *Virus genes*, 53(4), 584–592. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1461-z>
- Bossart, K. N., Fusco, D. L., y Broder, C. C. (2013). Paramyxovirus entry. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 790, 95–127. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7651-1_6
- Boumart, Z., Hamdi, J., Daouam, S., Elarkam, A., Tadlaoui, K. O., y El Harrak, M. (2016). Thermal Stability Study of Five Newcastle Disease Attenuated Vaccine Strains. *Avian Diseases*, 60(4), 779–783. <https://doi.org/10.1637/11426-042116-Reg.1>
- Brown, V. R., y Bevins, S. N. (2017). A review of virulent Newcastle disease viruses in the

United States and the role of wild birds in viral persistence and spread. *Veterinary Research*, 48(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0475-9>

Bu, Y. wen, Yang, H. ming, Jin, J. hui, Zhao, J., Xue, J., y Zhang, G. zhong. (2019). Recombinant Newcastle disease virus (NDV) La Sota expressing the haemagglutinin–neuraminidase protein of genotype VII NDV shows improved protection efficacy against NDV challenge. *Avian Pathology*, 48(2), 91–97. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1548754>

Calain, P., y Roux, L. (1993). The Rule of Six, a Basic Feature for Efficient Replication of Sendai Virus Defective Interfering RNA. *Journal of Virology* 67(8), 4822–4830. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.8.4822-4830.1993>

Calderón, J., y Mora Delgado, J. (2010). La avicultura familiar en el norte del Tolima (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 3(1), 64–67.

Cardenas-Garcia, S., Diel, D. G., Susta, L., Lucio-Decanini, E., Yu, Q., Brown, C. C., Miller, P. J., y Afonso, C. L. (2015). Development of an improved vaccine evaluation protocol to compare the efficacy of Newcastle disease vaccines. *Biologicals*, 43(2), 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2014.11.003>

Chakraborty, D., Guha, C., Biswas, U., Chatterjee, A., Jana, P. S., Biswas, S., Sharma, L., Pradhan, N., Bhagat, S., y Naha, B. C. (2014). Studies on thermo stability of Newcastle disease virus (local isolate) for preparation of vaccine. *Journal of Veterinary Science and Technology*, 5(2). <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000161>

Chimeno Zoth, S., Gómez, E., Carrillo, E., y Berinstein, A. (2008). Locally produced mucosal IgG in chickens immunized with conventional vaccines for Newcastle disease virus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(4), 318–323. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2008000400010>

Choi, K. S., Kye, S. J., Kim, J. Y., To, T. L., Nguyen, D. T., Lee, Y. J., Choi, J. G., Kang, H. M., Kim, K. Il, Song, B. M., y Lee, H. S. (2014). Molecular epidemiology of Newcastle disease viruses in Vietnam. *Tropical Animal Health and Production*, 46(1), 271–277. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0475-3>

- Cornax, I., Miller, P. J., y 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 Digest*, 7(3), 7–8. <https://doi.org/10.1637/10222-1004312-digest.1>
- Czeglédi, A., Ujvári, D., Somogyi, E., Wehmann, E., Werner, O., y Lomniczi, B. (2006). Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Research*, 120(1–2), 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.11.009>
- Schmittgen, K. J. L. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Degefa, T., Dadi, L., Yami, A., Gmariam, K., y Nassir, M. (2004). Technical and economic evaluation of different methods of newcastle disease vaccine administration. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 51(7–8), 365–369. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2004.00658.x>
- Diel, D. G., Luciana, H. A., Liu, H., Wang, Z., Miller, P. J., y Afonso, C. L. (2012). Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1 : Proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1770–1779. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.012>
- Diel, D. G., Miller, P. J., Wolf, P. C., Mickley, R. M., Musante, A. R., Emanuelli, D. C., Shively, K. J., Pedersen, K., y Afonso, C. L. (2012). Characterization of Newcastle Disease Viruses Isolated from Cormorant and Gull Species in the United States in 2010. *Avian Diseases*, 56(1), 128–133. <https://doi.org/10.1637/9886-081111-reg.1>
- Dimitrov, K. M., Afonso, C. L., Yu, Q., y Miller, P. J. (2017). Newcastle disease vaccines—A solved problem or a continuous challenge? *Veterinary Microbiology*, 206, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.019>
- Dimitrov, K.M., Albonik, C., Afonso, C.L., Albina, E., Bahl, J., Berg, M., Briand, F.X., Brown, I.H., Choi, K.S., Chvala, I., Diel, D.G., Durr, P.A., Ferreira, H.L., Fusaro, A., Gil, P., Goujgoulova, G.V., Grund, C., Hicks, J.T., Wong, F.Y.K. (2019). Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle

disease virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 74, 103917, 2-15.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103917>

Dimitrov, K. M., Ferreira, H. L., Pantin-Jackwood, M. J., Taylor, T. L., Goraichuk, I. V., Crossley, B. M., Killian, M. L., Bergeson, N. H., Torchetti, M. K., Afonso, C. L., y Suarez, D. L. (2019a). Pathogenicity and transmission of virulent Newcastle disease virus from the 2018–2019 California outbreak and related viruses in young and adult chickens. *Virology*, 531, 203–218. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.03.010>

Dortmans, J C F M, Rottier, P. J. M., Koch, G., Rottier, P. J. M., Koch, G., y Peeters, B. P. H. (2010). The Viral Replication Complex Is Associated with the Virulence of Newcastle Disease Virus. *Journal of Virology*, 84(19), 10113-20.

<https://doi.org/10.1128/JVI.00097-10>

Dortmans, J C.F.M., Peeters, B. P. H., y Koch, G. (2012). Newcastle disease virus outbreaks: Vaccine mismatch or inadequate application? *Veterinary Microbiology*, 160(1–2), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.003>

Errington, W., y Emmerson, P. T. (1997). Assembly of recombinant Newcastle disease virus nucleocapsid protein into nucleocapsid-like structures is inhibited by the phosphoprotein. *The journal of General Virology*, 78(9), 2335–2339. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-9-2335>

Fearn, R., y Collins, P. L. (1999). Model for Polymerase Access to the Overlapped L Gene of Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology*, 73(1), 388–397.

FENAVI. (2019). Situación sanitaria para la enfermedad de Newcastle notificable el Colombia y actualización sobre la Influenza aviar en el mundo (Vol. 13). <https://fenavi.org/publicaciones-programa-tecnico/boletin-sanitario-no-13-octubre-2018/>

Fentie, T., Dadi, K., Kassa, T., Sahle, M., y Cattoli, G. (2014). Effect of vaccination on transmission characteristics of highly virulent Newcastle disease virus in experimentally infected chickens. *Avian Pathology*, 43(5), 420–426.

<https://doi.org/10.1080/03079457.2014.951832>

Gilad E. Gallili, D. B.-N. (1998). Newcastle Disease Vaccines. *Biotechnology Advances*

- 16(2), 343-66. [https://10.1016/s0734-9750\(97\)00081-5](https://10.1016/s0734-9750(97)00081-5).
- Goldhaft, T. M. (1980). Historical note on the origin of the LaSota strain of Newcastle disease virus. *Avian Diseases*, 24(2), 297–301. <https://doi.org/10.2307/1589696>
- Gravel, K. A., y Morrison, T. G. (2003). Interacting Domains of the HN and F Proteins of Newcastle Disease Virus. *Journal of Virology* 77(20), 11040–11049. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.20.11049.2003>
- Horikami, S. M., Smallwood, S., & Moyer, S. U. E. A. (1996). The Sendai Virus V Protein Interacts with the NP Protein to Regulate Viral Genome RNA Replication. *Virology* 222(2), 383–390. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0435>.
- ICA. (2009). Guía para la prevención, control y erradicación de la enfermedad de Newcastle. Primera edición. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). <https://es.slideshare.net/kaeslo/manual-enfermedad-newcastle>
- ICA. (2020). *Censo Pecuario Nacional*. <https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/epidemiologia-veterinaria/censos-2016/censo-2018.aspx>
- Igwe, A. O., Ihedioha, J. I., Eze, D. C., y Okoye, J. O. A. (2019). Pullets had higher bursal and thymic weight indices and more antibody response to La Sota vaccination than broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Veterinary Medicine and Science*, 1–8. <https://doi.org/10.1002/vms3.226>
- Igwe, A. O., Nnsewo, U. E., Eze, D. C., Abba, Y., y Okoye, J. O. A. (2019). Increased doses of La Sota vaccine increased Newcastle disease antibody response significantly in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Journal of Applied Animal Research*, 47(1), 423–428. <https://doi.org/10.1080/09712119.2019.1645675>
- Jaimes Olaya, J. A., Gómez Ramírez, A. P., Álvarez Espejo, D. C. M., Soler Tovar, D., Romero Prada, J. R., y Villamil Jiménez, L. C. (2010). Las enfermedades infecciosas y su importancia en el sector avícola. *Revista de Medicina Veterinaria*, 20, 49–61. <https://doi.org/10.19052/mv.582>
- Jang, J., Hong, S. H., y Kim, I. H. (2011). Validation of a real-time RT-PCR method to quantify newcastle disease virus (NDV) titer and comparison with other quantifiable

methods. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(1), 100–108.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1006.06006>

Jardetzky, T. S., y Lamb, R. A. (2014). Activation of paramyxovirus membrane fusion and virus entry. *Current Opinion in Virology*, 5(1), 24–33.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.01.005>

Kapczynski, D. R., Afonso, C. L., y Miller, P. J. (2013). Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(3), 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.012>

Kinde, H., Utterback, W., Takeshita, K., y McFarland, M. (2004). Survival of Exotic Newcastle Disease Virus in Commercial Poultry Environment Following Removal of Infected Chickens. *Avian Diseases*, 48(3), 669–674. <https://doi.org/10.1637/7161-020104r>

King, D. J. (2001). Note- Selection of Thermostable Newcastle Disease Virus Progeny from Reference and Vaccine Strains. *Avian Diseases*, 45(2), 512–516.
<https://doi.org/10.2307/1592997>

Kolakofsky, Dan, Ruigrok, R. W. H., y Cre, T. (2011). Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses. *Current Opinion in Microbiology*, 14(4), 504–510.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07>

Kolakofsky, Daniel, Roux, L., Garcin, D., y Ruigrok, R. W. H. (2005). Paramyxovirus mRNA editing, the “rule of six” and error catastrophe: A hypothesis. *Journal of General Virology*, 86(7), 1869–1877. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80986-0>

Lambrecht, B., Gonze, M., Meulemans, G., y Van Den Berg, T. P. (2004). Assessment of the cell-mediated immune response in chickens by detection of chicken interferon- γ in response to mitogen and recall Newcastle disease viral antigen stimulation. *Avian Pathology*, 33(3), 343–350. <https://doi.org/10.1080/0307945042000220318>

Lancaster, J. E. (1976). A History of Newcastle Disease with Comments on its Economic Effects. *World's Poultry Science Journal*, 32(2), 167–175. <https://doi.org/DOI:10.1079/WPS19760001>

- Li, S. yun, You, G. jin, Du, J. teng, Xia, J., Wen, Y. ping, Huang, X. bo, Zhao, Q., Han, X. feng, Yan, Q. gui, Wu, R., Cao, S. jie, y Huang, Y. (2020). A class I lentogenic newcastle disease virus strain confers effective protection against the prevalent strains. *Biologicals*, 63(November), 74–80.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.11.001>
- Lomniczi, B. (1975). Thermostability of Newcastle disease virus strains of different virulence. *Archives of Virology*, 47(3), 249–255. <https://doi.org/10.1007/BF01317812>
- M Khatun, S Islam, M Ershaduzzaman, HMS Islam, S Yasmin y A Hossen, M. H. (2018). *Economic Impact of Newcastle Disease on Village Chickens – A Case of Bangladesh*. 1, 358–367. <https://doi.org/10.31014/aior.1992.01.03.33>
- Martinez, J. C. S., Chou, W. K., Berghman, L. R., y Carey, J. B. (2018). Evaluation of the effect of live LaSota Newcastle disease virus vaccine as primary immunization on immune development in broilers. *Poultry Science*, 97(2), 455–462.
<https://doi.org/10.3382/ps/pex339>
- Mebrahtu, K., Teshale, S., Esatu, W., Habte, T., y Gelaye, E. (2018). Evaluation of spray and oral delivery of Newcastle disease I2 vaccine in chicken reared by smallholder farmers in central Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1186/s12917-018-1355-x>
- Mengesha, M., Tamir, B., y Dessie, T. (2011). Village chicken constraints and traditional management practices in Jamma District, South Wollo, Ethiopia. *Livestock Research for Rural Development*, 23(2).
- Millar, N. S., Chambers, P., y Emmerson, P. T. (1988). Nucleotide sequence of the fusion and haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein genes of Newcastle disease virus, strain Ulster: molecular basis for variations in pathogenicity between strains. *The Journal of General Virology*, 69 (Pt 3), 613–620. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-3-613>.
- Miller, P. J., Afonso, C. L., El Attrache, J., Dorsey, K. M., Courtney, S. C., Guo, Z., y 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. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.06.007>

- Mossos, N., Peña, E., y Correa, R. (2004). Guía metodológica para la definición y atención de focos de la enfermedad de Newcastle. Grupo Tran.
<https://www.solla.com/sites/default/files/productos/secciones/adjuntos/Newcastlefocos.pdf>
- Mostafijur, M., Deb, R., y Nooruzzaman, M. (2017). Evaluation of serum antibody titer level against Newcastle disease virus in vaccinated broiler chickens. *Tierärztl Prax*, 45, 151-158.
- Musa, U., Abdu, P.A, Mera, U.M., Emmenna, P.E. y Ahmed, M. S. (2010). Vaccination with newcastle disease vaccines strain i2 and lasota in commercial and local chickens in plateau state Nigeria. *Nigerian Veterinary Journal*, 31, 46–55.
- Nagai, Y., Hamaguchi, M., y Toyoda, T. (1989). Molecular biology of Newcastle disease virus. *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology*, 5, 16–64.
- Nasrin, M., Khan, M. Z. I., Siddiqi, M. N. H., y Masum, M. A. (2013). Mobilization of immunoglobulin (Ig)-containing plasma cells in Harderian gland, cecal tonsil and trachea of broilers vaccinated with Newcastle Disease Vaccine. *Tissue and Cell*, 45(3), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2012.12.001>
- Noton, S. L., y Fearn, R. (2015). Initiation and regulation of paramyxovirus transcription and replication. *Virology*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.014>
- Nssien, M. A. (2002). Thermostability of reconstituted Newcastle disease virus strains at 36C° temperature. *African Journal of Biomedical Research*, 5(1-2), 87–89.
- OIE. (2018). Enfermedad de Newcastle. In Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (Ed.), *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* (Octava). <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/enfermedad-de-newcastle/#E>
- Olabode, A. O., Ndako, J. A., Echeonwu, G. O., Nwankiti, O. O., y Chukwuedo, A. A. (2010). Use of cracked maize as a carrier for NDV4vaccine in experimental vaccination of chickens. *Virology Journal*, 7, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-67>

- Orsi, M. A., Zaroni, M. M. H., Doretto Júnior, L., Camillo, S. C. A., Ribeiro, S. A. M., Rosado Spilki, F., Buzinaro, M. da G., y Arns, C. W. (2009). Long-term stability studies on protection against Newcastle disease by commercial live vaccine used in Brazil. *Biologicals*, 37(4), 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.04.001>
- Owolodun, B. Y., y Ajiboye, E. A. (1975). Newcastle disease vaccines: a study of duration of immunity and properties of LaSota vaccine given in drinking water. *British Veterinary Journal*, 131(5), 580–585. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)35191-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)35191-6)
- Pandarangga, P., Brown, C. C., Miller, P. J., Haddas, R., Rehmani, S. F., Afonso, C. L., y Susta, L. (2016). Pathogenesis of New Strains of Newcastle Disease Virus From Israel and Pakistan. *Veterinary Pathology*, 53(4), 792–796. <https://doi.org/10.1177/0300985815622972>
- Park, M., García-sastre, A., Cros, J. F., Basler, C. F., y Palese, P. (2003). *Newcastle Disease Virus V Protein Is a Determinant of Host Range Restriction*. 77(17), 9522–9532. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.17.9522>
- Peeters, B. P. H., Gruijthuisen, Y. K., Leeuw, O. S. De, y Gielkens, A. L. J. (2000). *Genome replication of Newcastle disease virus : involvement of the rule-of-six*. 1829–1845.
- Perozo, F., Marcano, R., y 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* 1204–1208. <https://doi.org/10.1128/JCM.06506-11>
- Ramakrishnan M.A. (2016). Determination of 50% endpoint titer using a simple formula *World Journal of Virology*. 5(2), 85–86. <https://doi.org/10.1037/h0063767>
- Rao, M. S., Raj, G. D., y Manohar, B. M. (2002). An in vitro and in vivo evaluation of the virulence of Newcastle disease virus and vaccines for the chicken reproductive tract. *Avian Pathology*, 31(5), 507–513. <https://doi.org/10.1080/0307945021000005888>
- Rauw, F., Nguyen, T. G., Ngabirano, E., Marché, S., y Lambrecht, B. (2017). *Specific antibody-mediated immunity in the reproductive tract of laying chickens immunized*

against Newcastle disease with conventional attenuated and inactivated vaccines. 9457. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1304528>

Rehmani, S. F., y Spradbrow, P. B. (1995). The contribution of lectins to the interaction between oral Newcastle disease vaccine and grains. *Veterinary Microbiology*, 46(1–3), 55–62. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00071-H](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00071-H)

Reynolds, D. L., y Maraqa, A. D. (2000). Protective Immunity against Newcastle Disease: The Role of Cell-Mediated Immunity. *Avian Diseases*, 44(1), 145. <https://doi.org/10.2307/1592518>

Rima, B., Balkema-Buschmann, A., Dundon, W. G., Duprex, P., Easton, A., Fouchier, R., Kurath, G., Lamb, R., Lee, B., Rota, P., Wang, L., y Ictv Report Consortium. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Paramyxoviridae*. *The Journal of General Virology*, 100(12), 1593–1594. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001328>

Rohollahzadeh, H., Nili, H., Asasi, K., Mokhayeri, S., y Najjari, A. H. A. (2018). Respiratory and GIT tract immune responses of broiler chickens following experimental infection with Newcastle disease's virus. *Comparative Clinical Pathology*, 27(5), 1241–1255. <https://doi.org/10.1007/s00580-018-2728-z>

Roohani, K., Tan, S. W., Yeap, S. K., Ideris, A., Bejo, M. H., y Omar, A. R. (2015). Characterisation of genotype VII Newcastle disease virus (NDV) isolated from NDV vaccinated chickens, and the efficacy of LaSota and recombinant genotype VII vaccines against challenge with velogenic NDV. *Journal of Veterinary Science*, 16(4), 447–457. <https://doi.org/10.4142/jvs.2015.16.4.447>

Roy, P., y Venugopalan, A. T. (2005). Unexpected Newcastle disease virus in day old commercial chicks and breeder hen. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 28(4), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2005.07.001>

Ruan, B., Liu, Q., Chen, Y., Niu, X., Wang, X., Zhang, C., Guo, M., Zhang, X., Cao, Y., y Wu, Y. (2020). Generation and evaluation of a vaccine candidate of attenuated and heat-resistant genotype VIII Newcastle disease virus. *Poultry Science*. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.01.034>

Rue, C. A., Susta, L., Cornax, I., Brown, C. C., Kapczynski, D. R., Suarez, D. L., King, D.

- J., Miller, P. J., y Afonso, C. L. (2011). Virulent Newcastle disease virus elicits a strong innate immune response in chickens. *Journal of General Virology*, 92(4), 931–939. <https://doi.org/10.1099/vir.0.025486-0>
- Samuel, J. L., Bensink, Z., y Spradbrow, P. B. (1993). Oral vaccination of chickens with the V4 strain of Newcastle disease virus. Cooked and raw white rice as a vehicle. *Tropical Animal Health and Production*, 25, 2–10.
- Scheid, A., y Choppin, P. W. (1973). Isolation and purification of the envelope proteins of Newcastle disease virus. *Journal of Virology*, 11(2), 263–271. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4734650>
- Sedeik, M. E., Elbestawy, A. R., El-Shall, N. A., Abd El-Hack, M. E., Saadeldin, I. M., y Swelum, A. A. (2019). Comparative efficacy of commercial inactivated Newcastle disease virus vaccines against Newcastle disease virus genotype VII in broiler chickens. *Poultry Science*, 98(5), 2000–2007. <https://doi.org/10.3382/ps/pey559>
- Shrestha, S., Dhawan, M., Donadeu, M., y Dungu, B. (2017). Efficacy of vaccination with La Sota strain vaccine to control Newcastle disease in village chickens in Nepal. *Tropical Animal Health and Production*, 49(2), 439–444. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1205-4>
- Snoeck, C. J., Adeyanju, A. T., Owoade, A. A., Couacy-Hymann, E., Alkali, B. R., Ottosson, U., y Muller, C. P. (2013). Genetic diversity of newcastle disease virus in wild birds and pigeons in West Africa. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7867–7874. <https://doi.org/10.1128/AEM.02716-13>
- Suarez, D. L. (2017). Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Avian Metapneumovirus Infections: Introduction. *Diseases of Poultry: Thirteenth Edition*, 19(2), 89. <https://doi.org/10.1002/9781119421481.ch3>
- Susta, L., Hamal, K. R., Miller, P. J., Brown, C. C., Pedersen, J. C., Gongora, V., y Afonso, C. L. (2014). *Separate Evolution of Virulent Newcastle Disease Viruses from Mexico*. <https://doi.org/10.1128/JCM.00066-14>
- Swayne E., D. (2013). Diseases of Poultry 13th Edition (V. N. John R. Glisson, Larry R. McDougald, Lisa K. Nolan, David L. Suarez (ed.); 13th ed.).

- Takada, A., y Kida, H. (1996). Protective immune response of chickens against Newcastle disease, induced by the intranasal vaccination with inactivated virus. *Veterinary Microbiology*, 50(1–2), 17–25. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(96\)00004-1](https://doi.org/10.1016/0378-1135(96)00004-1)
- Toyoda, T., Sakaguchi, T., Imai, K., Inocencio, N. M., Gotoh, B., Hamaguchi, M., y Nagai, Y. (1987). Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of newcastle disease virus. *Virology*, 158(1), 242–247. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90261-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90261-3)
- Van Boven, M., Bouma, A., Fabri, T. H. F., Katsma, E., Hartog, L., y Koch, G. (2008). Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. *Avian Pathology*, 37(1), 1–5. <https://doi.org/10.1080/03079450701772391>
- Vrdoljak, A., Halas, M., y Süli, T. (2017). Vaccination of broilers against Newcastle disease in the presence of maternally derived antibodies. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere - Nutztiere*, 45(3), 151–158. <https://doi.org/10.15653/TPG-160661>
- Wambura, P. N. (2009a). Oral vaccination of chickens against Newcastle disease with I-2 vaccine coated on oiled rice. *Tropical Animal Health and Production*, 41(2), 205–208. <https://doi.org/10.1007/s11250-008-9176-8>
- Wambura, P. N. (2009b). Vaccination of chickens using raw rice coated with novel trehalose nano-organogels containing Newcastle disease (strain I-2) vaccine. *Tropical Animal Health and Production*, 41(5), 797–802. <https://doi.org/10.1007/s11250-008-9254-y>
- Wambura, P. N., y Wilson, C. (2009). Protective antibody response following oral vaccination of feral pigeons (*Columba livia*) with Newcastle disease vaccine (strain I-2) coated on oiled rice. *Veterinary Research Communications*, 33(8), 921–926. <https://doi.org/10.1007/s11259-009-9309-1>
- Wambura, Philemon N., y Kataga, S. (2011). Putative protective antibody response following oral vaccination of multi-age free ranging helmeted guinea fowls (*Numida meleagris*) with Newcastle disease virus strain I-2 coated on oiled rice. *Tropical Animal Health and Production*, 43(1), 99–102. <https://doi.org/10.1007/s11250-010->

- 9659-2
- Wambura, Philemon Nyangi, Meers, J., y Spradbrow, P. (2007). Survival of avirulent thermostable Newcastle disease virus (strain I-2) in raw, baked, oiled, and cooked white rice at ambient temperatures. *Journal of Veterinary Science*, 8(3), 303–305. <https://doi.org/10.4142/jvs.2007.8.3.303>
- Wegdan, H., Mahasin, E., y Khalafalla, A. I. (2015). The Effect of Route of Administration and Dose on the Immunogenicity and Protective Efficacy of Newcastle Disease Thermostable Vaccine I 2 Strain. *International Journal of Preventive Medicine Research* 1(5), 276–281.
- Wen, G., Hu, X., Zhao, K., Wang, H., Zhang, Z., y Zhang, T. (2016). Molecular basis for the thermostability of Newcastle disease virus. *Nature Publishing Group, February*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep22492>
- Wen, G., Hu, X., Zhao, K., Wang, H., Zhang, Z., Zhang, T., Yang, J., Luo, Q., Zhang, R., Pan, Z., Shao, H., y Yu, Q. (2016). Molecular basis for the thermostability of Newcastle disease virus. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep22492>
- Wise, M. G., Wise, M. G., Suarez, D. L., Suarez, D. L., Seal, B. S., Seal, B. S., Pedersen, J. C., Pedersen, J. C., Senne, D. a, Senne, D. a, King, D. J., King, D. J., Kapczynski, D. R., Kapczynski, D. R., Spackman, E., y Spackman, E. (2004). Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 329–338. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.329>
- Yingjie Sun, Hang Zheng, Shengqing Yu, Yunlei Ding, Wei Wu, Xuming Mao, Ying Liao, Chunchun Meng Zaib Ur Rehman, Lei Tan, Cuiping Song, Xusheng Qiu, Fengyun Wu, Chan Dinga. (2019). Newcastle Disease Virus V Protein Degrades Mitochondrial Antiviral Signaling Protein To Inhibit Host Type I Interferon Production via E3 Ubiquitin Ligase RNF5. *Journal of Virology*, 93(18), 1–19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00322-19>.
- Yohannes Tekle Asfaw. (2014). Evaluation of oral vaccination of village chickens against newcastle disease with I-2 vaccine coated parboiled cracked maize in Enderta

District, Tigray, Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*, 13, 4183–4187.

<https://doi.org/10.5897/AJB2014.14102>

Zhang, T., Ren, M., Liu, C., Xu, L., Wang, F., Han, Z., Shao, Y., y Ma, D. (2019).

Comparative analysis of early immune responses induced by two strains of Newcastle disease virus in chickens. *MicrobiologyOpen*, 8(4), 1–10.

<https://doi.org/10.1002/mbo3.701>

2.VIABILIDAD DE DOS VIRUS LENTOGÉNICOS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE (CEPAS LASOTA Y VH) EN ARROZ COCIDO, ARROZ CRUDO ACEITADO Y MAÍZ COCIDO A TEMPERATURA AMBIENTE EN DIFERENTES TIEMPOS DE PREPARACIÓN

2.1 INTRODUCCIÓN

A pesar de la aplicación de vacunas en avicultura la presentación de la enfermedad continua siendo un problema incluso en lotes vacunados (Roohani et al., 2015). En el caso de los predios de traspatio su uso es más limitado ya que la aplicación de esquemas de vacunación debe superar limitantes como la imposibilidad de mantener una adecuada cadena de frío, la carencia de un método adecuado de administración de vacunas en aves donde se dificulta la captura individual debido al escaso confinamiento en estos sistemas y la adquisición de vacunas cuya presentación comercial venga en pocas dosis (Chakraborty et al., 2014) razón por la cual en este tipo de predios no es posible utilizar eficientemente la vacunación como método de control de la misma forma que en la avicultura industrial. Esto es por lo tanto uno de los factores que contribuyen a que el NDV sea altamente prevalente y se disemine fácilmente entre sistemas productivos intensivos (industriales) y extensivos (traspatio).

El mantenimiento de condiciones adecuadas de cadena de frío es un aspecto crítico para la efectividad de las vacunas ya que afecta directamente su estabilidad (Orsi et al., 2009). Independientemente de su origen, las vacunas son en general sensibles a temperaturas por encima de los 4°C (Gilad y Gallili, 1998), por tanto, si son expuestas a variaciones de

dicho parámetro durante su uso o almacenamiento se producirá una disminución de la carga antigénica, lo cual afectará negativamente la inducción del efecto inmunológico esperado tras su aplicación y por ende una inadecuada protección contra la enfermedad.

En Colombia las vacunas vivas registradas para su uso en avicultura incluyen cepas tipo LaSota, VG/GA, VH y B1. En general son consideradas como termosensibles, sin embargo, son escasos los datos que evalúan su estabilidad en función de la temperatura tanto en laboratorio como en campo (Boumart et al., 2016), por lo que se desconocen sus características de vida útil frente a las condiciones ambientales y de manejo a las que se enfrentan los productores en la avicultura no industrializada.

Para la aplicación de vacunas vivas convencionales y termostables es posible emplear diferentes rutas como la vía ocular o intranasal; no obstante, estas vías de administración requieren de la manipulación individual de las aves, lo cual a nivel de traspatio en la mayoría de los casos se dificulta debido a que estas aves pueden encontrarse de forma alternada tanto en casetas artesanales como en pastoreo, o en algunos casos libres en el predio de forma permanente, lo cual en algunos casos dificulta la captura de los animales. Para superar esta limitante, el uso del alimento como vehículo para la administración de vacunas ha sido una estrategia adoptada en algunos países. Se ha observado que puede mantenerse la viabilidad de vacunas termoestables hasta por 24 horas en vehículos como el maíz o el arroz a temperatura ambiente (Abdi et al., 2016) y por lo tanto pueden prepararse en el sitio de aplicación el mismo día de la vacunación sin inactivarse (Wambura & Wilson, 2009). A pesar de esto, puede haber variaciones en cuanto al mantenimiento de una carga viral constante entre los vehículos que se utilizan, así como la cantidad de alimento consumido por el ave, lo cual afecta la entrega de una dosis vacunal adecuada generando niveles de protección subóptimos.

Con base en lo anteriormente expuesto, el escaso conocimiento sobre la estabilidad de algunos de los biológicos para el control de la enfermedad de Newcastle y la pobre recuperación de suficiente cantidad de virus vacunal a partir de granos empleados como vehículos limitan el proceso de vacunación a través del alimento (Rehmani & Spradbrow, 1995; Wambura et al., 2007). Por lo tanto, se requiere de la realización de estudios que aporten al conocimiento de la capacidad de ciertos alimentos de uso común en la dieta de

aves de corral como vehículos de vacunas vivas, así como de las características inmunogénicas del uso de la vía oral a través del alimento.

Con el objetivo de proponer un vehículo y la una cepa vacunal que puedan ser usados en la vacunación de aves de traspatio en el contexto colombiano, el presente estudio busca evaluar la estabilidad de dos virus lentogénicos (cepas LaSota y VH) de la enfermedad de Newcastle empleados de forma convencional para la vacunación de aves de corral luego de ser mezclados con arroz y maíz bajo diferentes preparaciones y en diferentes tiempos a temperatura ambiente, determinando el título viral de las suspensiones por medio de titulación en huevos embrionados SPF con posterior cálculo del título infectivo y la cuantificación de copias de ácido nucleico del virus vacunal presentes en cada grano mediante el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa en tiempo real (RT-qPCR).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron ensayos referentes a la definición de protocolos de preparación de los vehículos, estabilidad de los títulos de las vacunas y la carga viral a través de titulación en huevos embrionados SPF y RT-qPCR respectivamente, tanto en su forma pura como mezcladas con los granos de estudio en función del tiempo de permanencia a temperatura ambiente.

2.2.1 Cepas vacunales empleadas

Las vacunas empleadas en el estudio fueron cepas comerciales de virus vivo de LaSota, que viene liofilizada en frascos de 1000 dosis y la cepa VH, la cual tiene la característica de mantener su título infectivo hasta por cuatro horas a temperatura ambiente en su presentación original (sin diluir) y viene en pastillas efervescentes por 2000 dosis listas para su reconstitución en agua de bebida. Las vacunas fueron obtenidas directamente del proveedor. La refrigeración de la vacuna solo se mantuvo desde su adquisición hasta el día de inicio del experimento, en adelante la cepa se manejó a temperatura ambiente.

2.2.2 Selección de los vehículos y tratamientos

Para la determinación del vehículo más adecuado de una vacuna viva atenuada del NDV se seleccionaron dos opciones de acuerdo con lo reportado previamente en la literatura: arroz (Jayawardane , De Alwis, 1990; Wambura, 2009a; Wambura & Kataga, 2011) y maíz (Abdi et al., 2016; Olabode et al., 2010), que fueron obtenidos en almacenes de cadena. En el caso del maíz se evaluaron dos tipos: maíz tipo peto sin cáscara y tipo cuchuco sin cáscara. El arroz utilizado fue arroz blanco.

Los vehículos mencionados fueron preparados utilizando las siguientes metodologías:

- **Arroz cocido**

El arroz blanco se adicionó en una olla con agua a temperatura de 100°C en proporción 1:3 p/v y a continuación se dejó en cocción durante 20 minutos (Samuel et al., 1993). Se realizó una modificación al protocolo en donde en lugar de lavar el arroz con agua para enfriarlo, se dejó en reposo dentro de la misma olla hasta el día siguiente para su uso.

- **Arroz crudo embebido en aceite vegetal**

Esta preparación consistió en embeber el arroz crudo con aceite vegetal de soya, en una proporción 10:1 p/v (Wambura & Kataga, 2011). La mezcla se homogenizó manualmente y se dejó en reposo por 15 minutos.

- **Maíz pelado tipo peto y tipo cuchuco crudos en remojo por tres días**

El maíz tipo peto y tipo cuchuco fueron dejados en remojo en agua embotellada en proporción 1:3 p/v durante tres días con cambio diario del agua (Olabode et al., 2010). Para evaluar el incremento de peso en el grano asociado a ganancia de humedad, se emplearon 6 réplicas de 25 g de cada tipo de maíz. Diariamente se tomaron datos de la variación de los pesos de los granos al cumplir 24 horas en remojo.

- **Maíz pelado tipo peto y tipo cuchuco cocidos**

El proceso de cocción del maíz se llevó a cabo como se describió previamente en el caso del arroz. La preparación con aceite vegetal no se utilizó para este ingrediente.

Todas las metodologías de preparación se montaron por triplicado en tres ocasiones evaluando la ganancia de peso de los ingredientes. Para complementar los análisis de absorción de los granos de estudio y determinar que cada una de las preparaciones analizadas pudiera vehiculizar el virus vacunal, se observó que tan permeable fue cada grano a la vacuna reconstituida al estar en contacto con ella. Tomando como referencia una ración estándar de 10g usada en un estudio previo (Wambura et al., 2007), se hicieron 3 alícuotas de 10g de cada una de las preparaciones descritas en bolsas de cierre hermético a las que se les adicionaron 1, 2 y 3 mL respectivamente de vacuna (cepa VH) reconstituida en agua pura embotellada (1 pastilla de 2000 dosis en 50 mL de agua para un total de 40 dosis por mL). Cada alícuota fue examinada visualmente en el momento de la preparación, luego a la hora, a las dos horas, tres horas y doce horas postpreparación. Para este ensayo se adicionaron cada uno de los volúmenes mencionados por medio de una jeringa a cada alícuota. Al final se observó si el volumen adicionado a cada preparación fue absorbido por el vehículo.

- **Aceptabilidad de los vehículos evaluados**

El objetivo de esta prueba fue evaluar el consumo de arroz crudo embebido en aceite vegetal de soya y arroz y maíz cocidos en aves en condiciones de campo para determinar la preferencia de los animales hacia algún grano en particular. Este ensayo se realizó en gallinas de 54 semanas de edad en sistema de producción de semipastoreo del Centro Agropecuario Marengo de la Universidad Nacional de Colombia, que fueron asignadas al azar a cada uno de los tres ingredientes. Para cada preparación se emplearon 6 réplicas de 10 aves cada una para un total de 180 aves usadas en el estudio. A cada réplica se le ofrecieron 100g de cada vehículo en las primeras horas de la mañana (antes de la primera ración de alimento del día) con una temperatura ambiental de 12°C y humedad relativa de 75%. Se dio un tiempo de espera de 15 minutos para que los animales consumieran los granos. Culminado este tiempo se tomaron los datos de consumo y se calcularon los gramos/ave por cada réplica.

- **Análisis estadístico**

Se registraron parámetros descriptivos de promedios de ganancia de peso y desviación estándar en los procesos de preparación del grano. La preferencia en el consumo de arroz crudo aceitado y el arroz y maíz preparados por cocción se evaluó por ANOVA y la prueba de Tukey para determinar diferencias estadísticas entre los consumos de los tres vehículos con un nivel de significancia de 95%.

2.2.3 Preparación de las vacunas y su mezcla con los vehículos

La preparación de las cepas LaSota y VH y su mezcla con cada uno de los vehículos descritos se hizo de acuerdo con los tiempos establecidos para la evaluación de la variación del título viral a temperatura ambiente. A continuación, se describen los tiempos evaluados para cada cepa y vehículo:

Tiempo 0: Momento de la preparación (25 minutos)

Tiempo 1: Una hora post-preparación

Tiempo 2: Dos horas post-preparación (únicamente para la cepa VH para corroborar la estabilidad más prolongada de esta cepa reportada por el fabricante)

Para la preparación de la mezcla de los vehículos con la cepa VH se tomó una pastilla de un blíster de vacuna de 2000 dosis y se reconstituyó en 50 mL de agua embotellada de tal forma que la concentración de la solución preparada fue de 40 dosis por cada mililitro de agua. Se tomó un 1 mL de esta solución y se adicionó a 10g de cada uno de los vehículos evaluados, de manera que por cada 10g de alimento había 40 dosis de vacuna. Se permitió un tiempo de contacto entre vacuna y vehículo de 30 minutos y finalmente 20 mL de PBS con antibiótico al 1X fueron adicionados a cada tubo para que la concentración de dosis por mililitro fuera de 2 dosis. Luego la mezcla se homogenizó manualmente y se centrifugó a 5000 xg por 10 minutos. Para la preparación de la cepa LaSota un frasco de 1000 dosis se reconstituyó en 50 mL de agua pura obteniendo una concentración de 20 dosis por cada

mililitro de agua. Un mL de esta solución se agregó en 10 gramos de cada vehículo y se dio un tiempo de contacto de 30 minutos. Finalmente 10 mL de PBS con antibiótico al 1X fueron añadidos obteniendo una concentración final de 2 dosis por mililitro. La mezcla se homogenizó manualmente y los tubos se centrifugaron a 5000 xg por 10 minutos.

2.2.4 Inoculación en huevos embrionados SPF

El sobrenadante obtenido de la centrifugación fue tomado con jeringa de 10 mL y se hizo pasar a través de filtros de 0,45 μm . Posteriormente se hicieron diluciones en base 10 desde la dilución 10^{-1} hasta la dilución 10^{-9} en tubos de microcentrífuga estériles en un volumen total de 1 mL. De cada dilución se inoculó un volumen de 200 μL en la cavidad alantoidea de 192 huevos embrionados SPF de 9-11 días de incubación por triplicado. Los huevos fueron llevados a incubación a 37°C por 72 horas y cumplido este tiempo se colectó el líquido alantoideo, se filtró y se depositó en tubos de microcentrífuga estériles.

2.2.5 Prueba de hemoaglutinación y determinación del título viral

Con el líquido alantoideo cosechado de los huevos de embrión de pollo SPF se realizó la prueba de hemoaglutinación (HA) para confirmar la actividad hemoaglutinante del virus. Se depositaron 100 μL del filtrado en el primer pozo de una placa fondo en V de 96 pozos y a partir de allí se realizaron diluciones seriadas en base 2 en PBS. Luego se adicionaron 50 μL de glóbulos rojos de pollo al 1%. Finalmente, la placa se dejó en incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente y una vez culminado este tiempo se realizó la lectura de la prueba.

Al final se hizo el cálculo del título viral por el método de Reed & Muench usando el número de huevos positivos en la prueba de HA usando la fórmula:

$$\frac{\% \text{ infectados a la dilución inmediatamente por encima del } 50\% - 50\%}{\% \text{ infectados a la dilución por encima del } 50\% - \% \text{ infectados a la dilución por debajo del } 50\%}$$

(Reed y Muench, 1938)

2.2.6 Detección y cuantificación de la carga viral en los vehículos de estudio

▪ Extracción del RNA viral y síntesis de cDNA

A partir de los tubos que contenían 400 µl de la dilución 10^{-1} se realizó la extracción de ácido nucleico empleando el kit High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche GmbH; Dresden, DE Cat No. 11 858 882) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. La cantidad de RNA extraído se midió usando un espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 (Thermo Scientific). Para la transcripción reversa (RT), el RNA extraído fue convertido en DNA complementario (cDNA) usando el kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Cheshire, UK. Cat No. 4374966). Los componentes de la mezcla maestra fueron: 1.6 µl de agua ultrapura, 1 µl de Buffer RT (10X), 1 µl de Random primers (10X), 0.4 µl de Mix dNTPs (100mM), 0.5 µl de RNase inhibitor (20U/µl) y 0.5 µl de enzima Multiscribe (50U/µl). Posteriormente 5 µl del RNA extraído fueron adicionados a la solución maestra para un volumen final de 10 µl. La RT se corrió en el termociclador Bio-Rad Laboratories® bajo las siguientes condiciones: incubación a 25°C por 6 minutos, 37°C por 72 minutos, 85°C por 3 minutos y 4°C por 6 minutos. Al final se realizó una dilución 1:5 de los cDNA antes de su corrida por PCR tiempo real.

▪ Detección y cuantificación de la carga viral

Con el fin de seleccionar los *primers* (cebadores) más adecuados para la detección del virus vacunal a partir de los granos cargados con cada una de las cepas empleadas en este estudio se realizaron ensayos con secuencias dirigidas a la amplificación del gen de la proteína M, los cuales amplifican un fragmento de 232 pares de bases (bp), otros cebadores específicos del gen de la proteína F que amplifican un segmento de 299 bp y unos adicionales de este mismo gen dirigidos a una región de 254 bp. Las secuencias de los *primers*, su tamaño y región de amplificación se relacionan en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 *Primers* dirigidos al gen de la matriz y de fusión

Gen	Secuencia	Tamaño del amplicón (bp)	Referencia
F	Forward:CCTTGGTGAITCTATCCGIAG	254	Seal et al., 1995
	Reverse:CTGCCACTGCTAGTTGIGATAATCC		
F	Forward:TCAAACAGGACATTGACCACTTTGCTCAC	299	Jang et al., 2011
	Reverse:TGCATCTTCCCAACTGCCACTGC		
M	Forward:GTCCGAGCACATCACTGAGC	232	Seal et al., 1995
	Reverse:TCGAGICTGTACAATCTTGC		

Se corrió una PCR de punto final del gen de matriz y de fusión empleando GoTaq® master mix (PROMEGA) en un volumen final de reacción de 10 µl de la siguiente manera: 4.35 µl de agua ultrapura, 2 µl de Buffer (1X), 0.3 µl de dNTPs (0.3 Mm), 1 µl de MgCl (1X) 0.5 µl de *primer* Forward (10mM), 0.5 µl de *primer* Reverse (10mM), 0.15 µl de enzima Go Taq Flexi y 1.2 µl de cDNA con las siguientes condiciones de amplificación: Desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y elongación final de 72°C por 10 minutos. El producto amplificado de cada gen se determinó por electroforesis en gel de agarosa ultrapura al 1.5% en buffer TBE 0.5X durante 40 minutos a 80v. Se empleó 1µl de EZ VISION® (PROMEGA) como buffer de carga y colorante con 3 µl de DNA GeneRuler 100 pb Plus® (Fermentas) como marcador de peso molecular. La visualización del gel se hizo en un fotodocumentador GelDoc-XR® (Bio-Rad Laboratories) bajo luz ultravioleta. Para el análisis del gel se usó el software Quantity One Analysis 1-D 4.6.3 ® (Bio-Rad Laboratories).

La curva estándar para la cuantificación de la carga viral empleó un antígeno de referencia del NDV obtenido a partir de pasajes en embriones de pollo SPF y adquirido en el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). El antígeno fue utilizado como control de concentración conocida para la generación de la curva usada en el estudio. El RNA viral fue extraído usando el kit High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche GmbH; Dresden, DE Cat No. 11 858 882) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto amplificado fue purificado y se cuantificó con espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 (Thermo Scientific). Se construyeron y probaron dos curvas estándar (curva 1 y curva 2) empleando los *primers* dirigidos a la amplificación del gen de la proteína de fusión descritos anteriormente. Usando

agua libre de nucleasas se prepararon 10 diluciones seriadas en proporción 1:10 del antígeno purificado. Estas diluciones partieron de una concentración de producto purificado del antígeno de 71ng/ μ l. Los componentes de la mezcla de qPCR para un volumen final de 10 μ l fueron: 3.6 μ l de agua grado biología molecular, 5 μ l de LightCycler® 480 SYBR Green I Master (1X), 0.15 μ l de *primer* Forward (10mM), 0.15 μ l de *primer* Reverse (10mM) y 1.1 μ l de cDNA. Cada dilución del producto purificado fue adicionada por triplicado para su corrida por qPCR. Las condiciones de la PCR fueron: 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 segundos, anillamiento para la primera curva a 59°C por 10 segundos, anillamiento para la segunda curva a 60°C y extensión a 72°C por 10 segundos en el equipo LightCycler 480 II.

Las curvas estándar se determinaron con base en los valores de umbral de ciclo obtenidos de las diluciones del producto purificado del antígeno de NDV en el software LightCycler 480®. El análisis de regresión lineal incluyó los valores de Ct versus el logaritmo del número inicial de copias en cada muestra diluida. Por último, se realizó el análisis de las curvas de *Tm* para asegurar que solo productos específicos se amplificaran en los rangos de temperatura esperados.

Con el fin de cuantificar la cantidad de ácido nucleico del virus vacunal en los vehículos según los tiempos y métodos de preparación descritos, se realizó la técnica de RT-qPCR para identificar el gen que codifica la proteína de fusión del NDV empleando *primers* específicos. La mezcla de qPCR se preparó para un volumen final de reacción de 10 μ l de la siguiente manera: 3.1 μ l de agua ultrapura, 5 μ l de LightCycler® 480 SYBR Green I Master (1X), 0.15 μ l de *primer* Forward (10mM), 0.15 μ l de *primer* Reverse (10mM), 0.5 μ l de DMSO (0.5X) y 1.1 μ l de cDNA. El proceso de amplificación se realizó en el equipo LightCycler 480 II bajo las siguientes condiciones térmicas: 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 segundos, alineación a 59°C por 10 segundos y extensión a 72°C por 10 segundos. La especificidad de las amplificaciones se determinó por análisis de las curvas de *melting* donde estos valores y los de Ct se calcularon usando el software LightCycler 480®. Para el proceso de obtención del número de copias de ácido nucleico se tomaron las diluciones 10^{-7} y 10^{-5} de la curva descrita anteriormente como concentraciones estándar. Al final se observó y comparó la concentración absoluta de virus de las dos cepas vacunales puras y luego de ser mezcladas con cada uno de los vehículos probados según

el tiempo de permanencia de las preparaciones a temperatura ambiente, determinando que ingrediente podría ser el más adecuado para ser usado en un proceso de vacunación en aves contra el NDV a través del alimento.

Adicionalmente, para determinar la mínima cantidad de virus vacunal que puede ser detectada y amplificada en una muestra de alimento usado como vehículo, se probaron diferentes dosis de vacuna (cepa VH) que fueron cargadas en maíz cocido y evaluadas en el tiempo 0 y tiempo 1 de preparación a temperatura ambiente. Para esta prueba el maíz se preparó mediante el proceso de cocción tal como se describió previamente en el numeral 2.2.2. Posteriormente fue pesado y distribuido en alícuotas de 10 g en tubos cónicos de 50 mL y mezclado con dos, cinco y diez dosis de la cepa vacunal VH. Para obtener las dosis, una pastilla de la cepa vacunal VH fue reconstituida en 50mL de agua pura obteniendo una solución de 40 dosis por mL. Para obtener 2, 5 y 10 dosis en 1mL, se tomaron 50 μ l, 125 μ l y 250 μ l respectivamente de la solución inicial y cada una fue llevada a un volumen final de 1 mL adicionando 950 μ l, 875 μ l y 750 μ l de PBS al 1X respectivamente. Finalmente, 1mL de cada una de las dosis fueron adicionadas en cada alícuota de 10 gramos de maíz cocido, luego se lavaron con 1 mL de PBS con antibiótico al 1X y se mezclaron por agitación manual. Los tubos se centrifugaron a 5000 xg por 5 minutos y el sobrenadante obtenido fue llevado al proceso de extracción de RNA y síntesis de cDNA descritos en el numeral 2.2.6. Los cDNA obtenidos fueron diluidos en una proporción 1:5 antes de su corrida por qPCR en tiempo real. Las condiciones de mezcla de PCR y amplificación se manejaron como se describió anteriormente para cuantificar la cantidad de ácido nucleico del virus vacunal en los vehículos.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Permeabilidad de los vehículos de estudio

Luego de emplear el protocolo de remojo durante tres días hubo un incremento en peso del maíz peto en 1.43 ± 0.1 g y de 1.3 ± 0.4 g en el caso del maíz cuchuco, mientras que al preparar los granos por cocción el aumento de peso fue de 1.8 g y 1.95 g respectivamente. En todos los ensayos realizados se evidenció que el protocolo de remojo tuvo la particularidad de que al tercer día de recambio de agua el maíz sufrió un proceso

de fermentación, razón por la cual se descartó su uso para la posterior mezcla con las cepas vacunales y cuantificación absoluta por qPCR.

En los experimentos realizados con arroz crudo aceitado se observó que el aceite es absorbido por el grano inmediatamente luego de ser mezclados en la proporción utilizada. Después del proceso de cocción el arroz tuvo un incremento promedio de 2.5 veces su peso.

Con respecto a la absorción de diferentes volúmenes de vacuna adicionada a cada preparación, solo después de adicionar 1 mL del biológico se produjo absorción total en todos los granos al momento de la mezcla. Por su parte, la adición de 2 mL de solución vacunal al arroz en sus dos preparaciones tomó dos horas para ser absorbida y hasta 3 horas al añadir 3 mL, tomando una apariencia apelmazada en este último caso. Tampoco hubo absorción por parte del maíz en ninguna de sus preparaciones luego de añadir 2 y 3 mL aún con el paso del tiempo.

2.3.2 Obtención del título viral

En la tabla 2.2 se resumen los títulos obtenidos de las vacunas mezcladas con cada uno de los vehículos. Al analizar los resultados se pudo observar variación de los títulos según el tiempo de permanencia de las preparaciones a temperatura ambiente. En el caso del tiempo 0 (momento de la preparación de la mezcla de vacuna y el grano) el título obtenido en las dos vacunas sin ser mezcladas con ningún tipo de grano mostraron títulos por encima del reportado en el inserto del biológico (0.7 y 1.7 logaritmos en la cepa VH y LaSota respectivamente); sin embargo, luego de ser mezcladas con el arroz crudo embebido en aceite en el mismo tiempo de evaluación se observó una disminución en aproximadamente 2.6 y 2.2 logaritmos para la vacuna VH y LaSota respectivamente, siendo el grano en el que menos viabilidad viral se obtuvo. Por su parte, las vacunas mezcladas con el arroz y el maíz bajo la preparación de cocción presentaron disminución en aproximadamente 0.6 y 1.8 logaritmos para las cepas VH y LaSota respectivamente, una reducción menor comparada con la obtenida en las preparaciones crudas. En el tiempo

1 (una hora post-preparación) los títulos continuaron descendiendo, pero se observó un patrón similar entre preparaciones crudas versus cocidas al descrito en el tiempo 0.

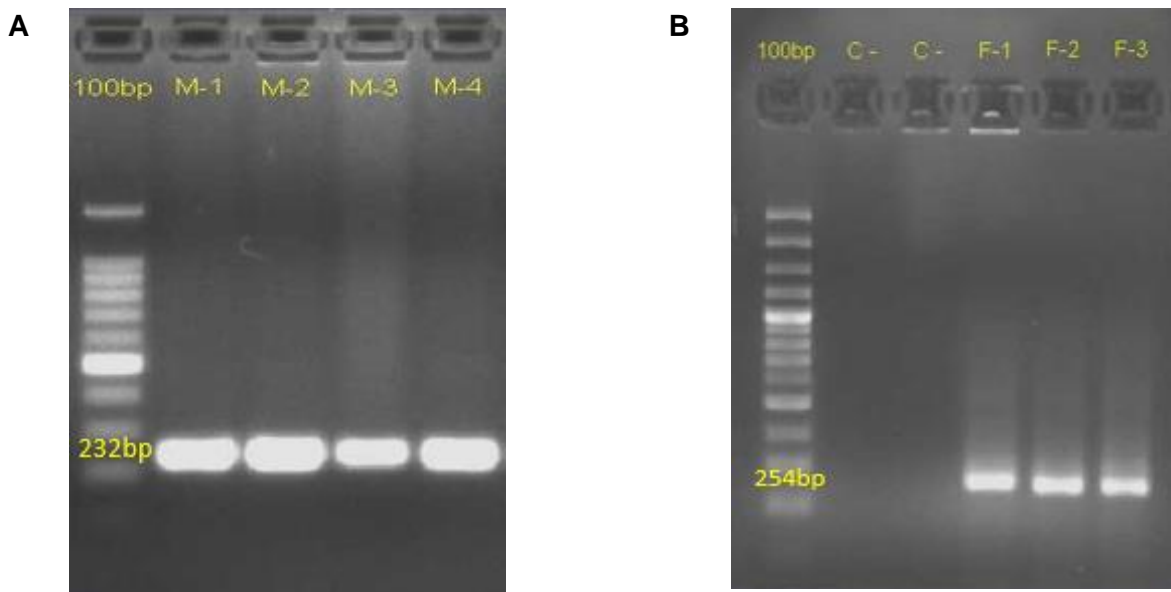
Tabla 2.2 Títulos obtenidos por el método de Reed & Muench por cepa vacunal, vehículo y tiempo evaluado

Ingrediente	Tiempo 0		Tiempo 1	
	VH	La Sota	VH	La Sota
Vacuna sola	10 ^{7.2}	10 ^{8.2}	10 ^{2.5}	10 ^{8.2}
Arroz + aceite	10 ^{4.6}	10 ⁶	10 ^{2.7}	10 ^{3.5}
Arroz cocido	10 ^{6.6}	10 ^{6.4}	10 ^{3.3}	10 ^{4.4}
Maíz cocido	10 ^{6.3}	10 ^{7.0}	10 ^{6.3}	10 ^{4.5}

2.3.3 Amplificación de genes específicos del NDV

Como parte del proceso de estandarización se amplificaron genes del NDV como el gen M y F. La figura 2.1 muestra los productos de amplificación obtenidos por medio del uso de *primers* dirigidos a los genes en mención por PCR convencional. Para la cuantificación de ácido nucleico del virus vacunal por qPCR a partir de granos cargados con las cepas evaluadas en este estudio se emplearon los *primers* dirigidos al gen F descritos por Jang et al., 2011, ya que estos permitieron la amplificación de productos a partir de muestras de maíz cocido a diferentes dosis de vacuna.

Figura 2.1 Amplificación de los genes M y F por PCR convencional

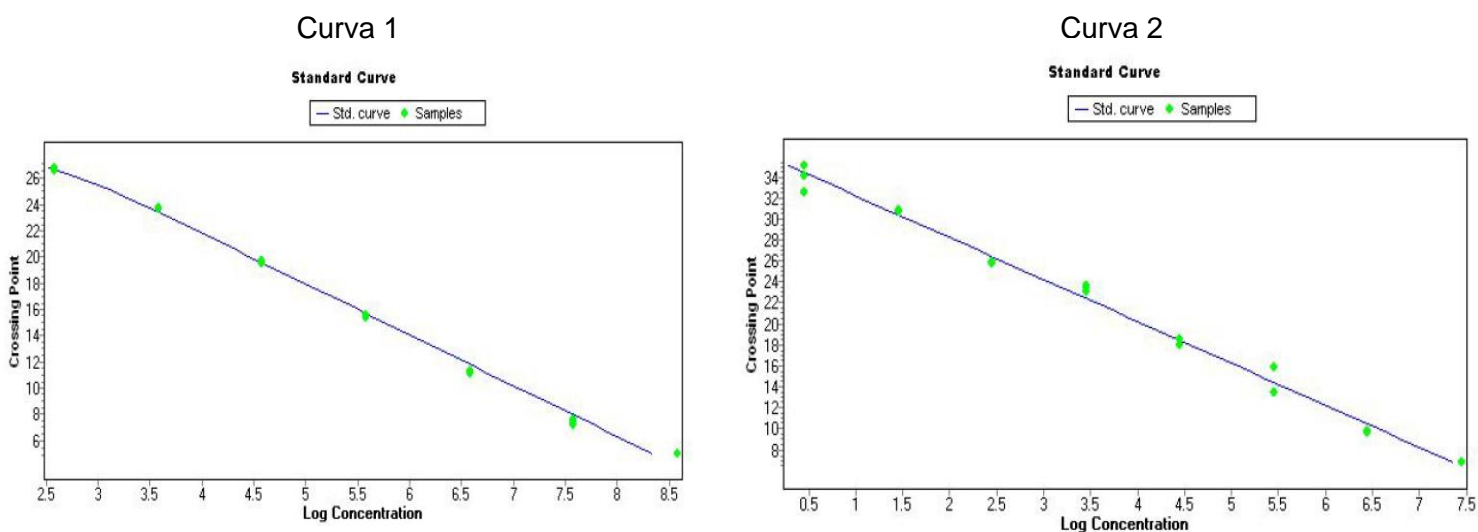


A: Gen M, carril 1: marcador de peso molecular (100pb), carril 2-5: banda correspondiente a la amplificación del gen M (232pb) donde cada carril corresponde a una réplica **B:** Gen F, carril 1: marcador de peso molecular (100pb), carril 2 y 3: control negativo, carril 4-6: banda correspondiente a la amplificación del gen F (254pb) donde cada carril corresponde a una réplica. pb: pares de bases.

2.3.4 Curva estándar

La curva estándar 1 derivada de las diluciones seriadas del RNA mostró las siguientes variables de regresión lineal: Error: 0.04, eficiencia: 1.811, pendiente: -3.879, intercepto de Y: 37.34 y R^2 de 0,99. Por su parte la curva 2 mostró los siguientes valores: Error: 0.193, eficiencia: 1.779, pendiente: -3.996, intercepto de Y: 36.20 y un R^2 de 0,98. La linealidad del sistema de las curvas de calibración para la cuantificación viral se observa en la figura 2.2.

Figura 2.2 Regresión lineal de las curvas de qPCR probadas en el estudio



Las curvas de amplificación de las diluciones tuvieron una tendencia exponencial sigmoidea con una distancia entre ellas de aproximadamente dos ciclos. El análisis de los picos de temperatura *melting* mostró que las diluciones del control de referencia se ubicaron en un rango entre 83.4°C y 83.6°C. La tabla 2.3 muestra los valores de las curvas probadas en el estudio. Se evidenció que las dos curvas mostraron un rendimiento similar, aunque la curva 1 mostró un R^2 levemente más cercano a 1 que la curva 2 por lo que fue

empleada para la cuantificación absoluta del número de copias de virus vacunal presentes en las muestras de maíz y arroz.

Tabla 2.3 Valores de las curvas estándar probadas para la cuantificación absoluta de la carga viral por qPCR

Curva 1			Curva 2		
Punto	Ct	Concentración	Punto	Ct	Concentración
10-2	5.00	2.18×10^8	10-2	5.00	2.84×10^8
10-3	7.40	5.28×10^7	10-3	6.82	2.25×10^7
10-4	11.21	5.48×10^6	10-4	9.71	4.26×10^6
10-5	15.48	4.33×10^5	10-5	14.59	3.19×10^5
10-6	19.68	3.59×10^4	10-6	18.3	3.37×10^4
10-7	23.61	3.28×10^3	10-7	23.40	1.61×10^3
10-8	26.70	3.70×10^2	10-8	25.86	2.88×10^2

2.3.5 Amplificación del gen F por RT-qPCR a diferentes dosis de vacuna

De acuerdo con los resultados obtenidos de la titulación viral la cepa LaSota fue descartada y se seleccionó la cepa VH para los análisis moleculares. Los resultados de RT-qPCR mostraron que se pudo detectar y amplificar el gen F de la cepa VH luego de ser cargada en maíz cocido a diferentes dosis. En la tabla 2.4 se observan los valores de Ct y temperatura *melting* obtenidos en cada una de las dosis y tiempos probados.

Tabla 2.4 Valores de Ct y temperatura *melting* (Tm) de diferentes dosis de vacuna cargadas en maíz cocido.

Dosis/tiempo	Ct	Tm (°C)
40 dosis	19.98	83.56
2 dosis tiempo 0	24.74	83.58
5 dosis tiempo 0	23.78	83.45
10 dosis tiempo 0	23.41	83.40
2 dosis tiempo 1	27.82	83.50
5 dosis tiempo 1	24.37	83.48
10 dosis tiempo 1	23.55	83.58

2.3.6 Cuantificación viral absoluta por RT-qPCR a partir de vehículos cargados con cepas VH y LaSota

La tabla 2.5 muestra la cantidad de copias detectadas en la prueba de qPCR inmediatamente después de la mezcla de las dos cepas vacunales con cada uno de vehículos de estudio y una hora después de ser mezclados. Para el análisis se tuvieron en cuenta los valores de Ct en los que amplificaron las muestras y se realizó la comparación de las copias obtenidas de acuerdo con el grano con el que fue mezclada cada cepa y al tiempo de permanencia de cada preparación a temperatura ambiente.

Tabla 2.5 Comparación del número de copias detectadas por qPCR de cada cepa entre las preparaciones evaluadas

Ingrediente	Tiempo	VH	LaSota
Vacuna pura	T0	2.08×10^6	7.95×10^3
	T1	4.25×10^4	3.47×10^2
Arroz crudo	T0	9.41×10^7	4.68×10^2
	T1	9.24×10^1	1.02×10^1
Arroz cocido	T0	7.16×10^7	4.19×10^2
	T1	1.31×10^2	4.62×10^2

Maíz cocido	T0	$6,16 \times 10^6$	5.66×10^1
	T1	$3,49 \times 10^7$	6.60×10^2

En la cepa VH pura y mezclada con los vehículos se logró detectar una mayor cantidad de copias de ácido nucleico de la cepa vacunal VH en el tiempo 0 en comparación con el tiempo 1. Solo en el maíz cocido tiempo 1 se detectó un número de copias similar al obtenido en el tiempo 0. Para el caso de LaSota el número de copias se mantuvo bajo en todas las preparaciones en todos los tiempos de evaluación.

2.3.7 Evaluación de la aceptabilidad de los vehículos de estudio en aves del Centro Agropecuario Marengo

Al momento de ofrecer la ración correspondiente se observó que las aves mostraron interés por cada una de las preparaciones evaluadas, ya que fue evidente el comportamiento de búsqueda activa y el consecuente consumo de cada una de ellas como se observa en la figura 2.3. El arroz y el maíz cocidos fueron consumidos en su totalidad a los 7 y 10 minutos en promedio respectivamente. Las aves a las que se les sirvió el arroz crudo embebido en aceite vegetal de soya tardaron 15 minutos en terminar la ración.

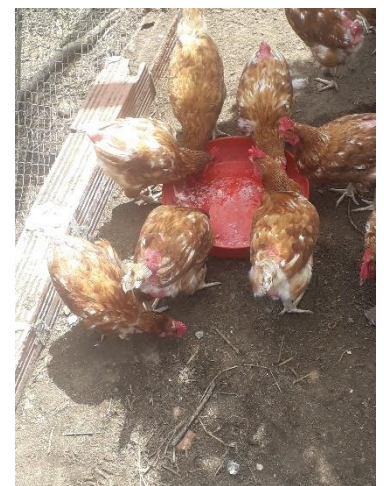
Figura 2.3 Consumo de arroz crudo aceitado y arroz y maíz cocidos por ponedoras comerciales



A



B

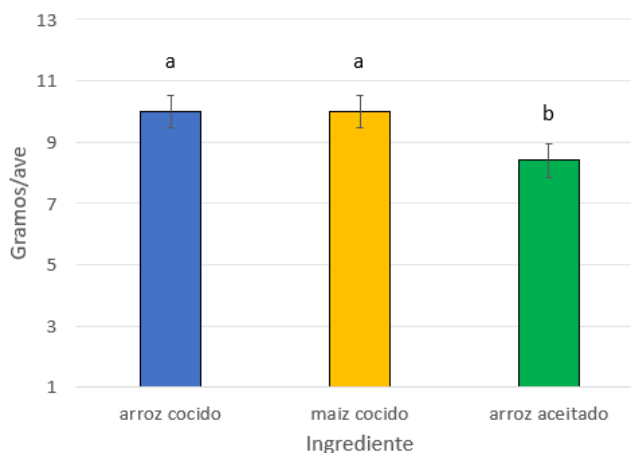


C

A. Arroz cocido, B. Maíz cocido, C. Arroz embebido en aceite vegetal de soya. Fuente: Autor

En cuanto al consumo/ave de cada ingrediente hubo diferencias estadísticas significativas entre el consumo de arroz crudo aceitado comparado con arroz cocido ($P=0.01$) y maíz cocido ($P=0.01$), pero no hubo diferencias significativas entre el consumo de arroz y maíz cocidos ($P=1.0$) (gráfica 2.1). De acuerdo con lo anterior, las aves prefirieron las preparaciones por cocción.

Gráfica 2.1 Consumo gramos/ave para cada ingrediente evaluado



Grupos con letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). Fuente: Autor

2.4 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En Colombia las limitaciones que tiene la aplicación de programas de vacunación contra la enfermedad de Newcastle en aves de traspatio permiten la presencia de animales susceptibles que facilitan la presentación de la enfermedad en regiones de alta densidad avícola. El uso del alimento como vehículo de vacunas requiere del diseño y evaluación de los métodos de preparación, así como de la determinación del mejor ingrediente. En este estudio después de evaluar diferentes protocolos para la preparación de granos se encontró que la mezcla de un ingrediente crudo como el arroz con aceite vegetal y la cocción son métodos de ejecución fácil y práctica; aspectos que, de acuerdo con Samuel et al. 1993 son importantes a la hora de implementar un método de vacunación a través del alimento bajo las condiciones de los predios de traspatio.

El arroz embebido en aceite fue la preparación más rápida y práctica de todas las que fueron incluidas en el estudio. La fácil adquisición de este grano y del aceite vegetal en cualquier almacén de cadena o tienda local puede garantizar el acceso a estos insumos y su preparación no requiere de un exhaustivo entrenamiento. La obtención de título viral a partir de este ingrediente al momento de la mezcla con VH y La Sota fue bajo comparado con el título obtenido con las vacunas puras; así mismo una hora después de la preparación el título volvió a caer en aproximadamente dos y un logaritmo respectivamente, lo cual concuerda con lo reportado por Samuel et al. 1993 quienes observaron resultados similares al usar arroz crudo. En el presente estudio la preparación del arroz incluyó la adición de aceite vegetal bajo la hipótesis de que funcionara como estabilizante o protector del virus; sin embargo, el título no se mantuvo estable. De manera similar, Wambura et al. 2011 utilizaron arroz crudo embebido en aceite vegetal como vehículo de vacunas de NDV en diferentes especies de aves evidenciando una adecuada respuesta de anticuerpos, por lo que es probable que la función protectora del aceite este más enfocada en aislar al virus vacunal de condiciones hostiles, como pH ácido o degradación enzimática durante el tránsito por el tracto digestivo, más que mantenerlo viable en condiciones medioambientales.

El uso de preparaciones por cocción no requiere de mucho tiempo para su ejecución y los elementos a emplear pueden encontrarse en la mayoría de los predios rurales donde se crían aves de forma artesanal debido a que son de uso común. Los resultados de la titulación de mezclas de arroz y maíz cocido con VH y La Sota en el tiempo 0 evidenciaron poca variación de los títulos virales con respecto a los valores obtenidos en las cepas puras pero luego de una hora a temperatura ambiente los títulos bajaron, por lo que tanto el tiempo como las condiciones del ambiente al momento de ejecutar el experimento pudieron haber afectado el título viral. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Samuel et al. 1993 quienes reportaron leve disminución de títulos al momento de la preparación de la mezcla y hasta 1 hora después usando arroz cocido. De acuerdo con lo anterior y a los resultados obtenidos, tanto el arroz como el maíz cocido serían vehículos ideales para ser usados en vacunación vía alimento en aves de traspatio. El éxito de su capacidad como vehículo podría atribuirse a la presencia de órganos de almacenamiento proteico en el endospermo del arroz (PB-I, PB-II) (Nochi et al., 2007; Hernández et al., 2015), que podrían ser adecuados para la acumulación del virus vacunal, no obstante, la interacción arroz-antígeno vacunal requiere investigación adicional.

Otro de los protocolos de preparación consistió en humedecer maíz durante tres días con recambio de agua diario como lo reportaron Olabode et al. 2010 Al evaluar este procedimiento se concluyó que, aunque su metodología es sencilla, es un proceso dispendioso en cuanto al tiempo que toma su ejecución, ya que se debe disponer de tres días para realizar un proceso de vacunación que normalmente tomaría menos de una hora. Por otro lado, su efectividad requiere de aspectos adicionales como la calidad del agua que se utilice y del cumplimiento de los tiempos de recambio de ésta, ya que lo anterior podría llevar a una eliminación incompleta de los inhibidores en el grano. Adicionalmente se evidenció que al tercer día de remojo el maíz ya había iniciado un proceso de fermentación que probablemente se generó por el exceso de humedad. De acuerdo con los resultados, este protocolo fue descartado para ensayos posteriores.

La absorción de la vacuna reconstituida por parte de las preparaciones evaluadas fue variable. Al probar adicionando diferentes volúmenes de vacuna se evidenció que la capacidad de absorción luego de agregar un volumen de 3 mL a 10 g de vehículo puede ser limitada, y es probable que la forma de preparación del grano influya sobre dicha absorción. Al evaluar las ganancias de peso en el caso del maíz crudo humedecido se encontró que estas aumentaban levemente al final de los tres remojos, lo cual indica que el grano absorbe líquido hasta un punto de saturación a partir del cual ya no hay ganancia de humedad. Por otro lado, visualmente las preparaciones mediante cocción mostraron ser más permeables que las preparaciones crudas; posiblemente debido a que los granos ricos en almidón como el maíz y el arroz pasan de un estado seco y duro a tomar una textura blanda cuando se someten a cocción, la cual promueve el inicio de un proceso químico llamado gelatinización gracias a la humedad y la elevada temperatura (Adhikari et al., 2014). Durante este proceso la alta temperatura hace que el almidón pierda la cristalinidad de sus gránulos de amilosa y amilopectina y consecuentemente estos absorban mucha agua. En el caso de los granos crudos el almidón existe en su forma natural como gránulos parcialmente cristalinos, por lo que la filtración de agua al interior toma más tiempo (Adhikari et al., 2014; Amagliani et al., 2016; Cornejo et al., 2018).

Al observar los resultados del cálculo de Reed & Muench se observó que el título infectivo de la cepa VH presentó variación a través del tiempo en su forma pura, lo cual era de

esperarse debido a que es una cepa termosensible. Al analizar en conjunto los resultados de titulación y qPCR de esta cepa se obtuvo un buen título, así como una carga viral alta en el tiempo 0 de evaluación, pero la alta carga viral detectada por esta técnica no necesariamente implica que vaya a haber un proceso de infección, ya que no se puede determinar la viabilidad del virus detectado, pero si indicó que el grano se cargó con la vacuna. En el tiempo 1 la forma pura de la vacuna mostró una disminución del título (de $10^{7.2}$ a $10^{2.5}$), lo cual pudo deberse al debilitamiento de la cepa por exposición a temperatura ambiente; pero, por el contrario, en el mismo tiempo de evaluación esta cepa obtuvo un título de $10^{6.3}$ al estar mezclada con maíz cocido. Posiblemente ciertas proteínas encontradas en el maíz como las Zeinas podrían estar actuando como estabilizadores o preservantes. La estructura almidonada del endospermo del maíz es rica en éstas moléculas especializadas para la toma y reserva de proteínas mediante la formación de geles y matrices adhesivas que actúan como compartimientos (Aswathy et al., 2012; Sousa et al., 2013), por lo que estos sitios en el endospermo podrían estar participando en el mantenimiento de la integridad de los péptidos del virus; sin embargo, se requiere de investigación adicional acerca de las propiedades de ciertos componentes del alimento que podrían ayudar a la viabilidad viral. Un hallazgo similar fue observado en la qPCR en donde se obtuvo un mayor número de copias de la cepa VH a partir del maíz cocido tiempo 1 versus su forma pura en el mismo tiempo de evaluación, aunque como se mencionó en párrafos anteriores en este caso no es posible inferir que las amplificaciones obtenidas correspondan a virus con capacidad replicativa.

La cepa LaSota mostró estabilidad de su título infectivo en el tiempo 0 tanto pura como cargada en los vehículos estudiados, sin embargo, en el tiempo 1 las variaciones fueron mayores, por lo que fue descartada para ensayos posteriores. Solo la forma pura de la vacuna logró mantener su título viral al mismo nivel que el obtenido en el tiempo 0 lo cual evidenció que esta cepa pudo mantenerse viable por encima de los 4°C luego de una hora, aunque no se descarta que con el paso del tiempo podría debilitarse. Boumart et al. 2016 ha relacionado a algunas cepas vacunales convencionales del NDV con tolerancia a variaciones de temperatura en sus formas liofilizada y reconstituida luego de exponerlas a temperaturas por encima de los 4, 24, 37 y 45°C. La cepa LaSota ha mostrado estabilidad a 4°C con una vida media de 220 días, también a 24°C luego de 10 días en su forma reconstituida y a 37°C en su forma liofilizada (Boumart et al. 2016). Otras cepas como B1 y VG/GA han mostrado estabilidad intermedia luego de 21 días a 24°C, teniendo relación

con el hallazgo en este estudio (Orsi et al., 2009). La cepa La Sota también ha sido evaluada a 36°C mostrando estabilidad de su título original de HA (6 Log₂) durante tres horas y manteniéndose hasta las 24 horas siguientes (Nssien, 2002). Se requieren investigaciones adicionales para determinar el grado de tolerancia de las vacunas usadas en el presente trabajo a diferentes temperaturas.

Luego de mezclar la cepa LaSota con los diferentes granos la disminución del título viral fue mayor particularmente al ser mezclada con arroz crudo embebido en aceite vegetal de soya una hora post-preparación, cayendo de un título inicial de 10^{8.2} a uno de 10^{3.5}. Los resultados de qPCR de esta cepa mezclada con cada uno de los vehículos mostraron umbrales de ciclo que sobrepasaron los límites de detección establecidos, por lo tanto, no fue posible considerar que se haya podido amplificar suficiente cantidad de genoma del virus vacunal, lo que posiblemente indica que el vehículo no quedó cargado adecuadamente con la vacuna. Con base en los resultados de titulación, habría que evaluar si LaSota pueda emplearse en un proceso de vacunación donde vaya cargada en arroz o maíz cocido con títulos infectivos entre 10^{4.4} a 10^{4.5}. Se ha reconocido que el título mínimo aceptado para una vacuna de NDV fabricada en laboratorio es 10^{6.5} EID₅₀ para generar una adecuada respuesta inmune (Orsi et al., 2009), por lo que lo ideal sería cargar el alimento con títulos infectivos que oscilen en ese valor. No obstante se ha reportado que títulos vacunales a partir de 10^{4.0} pueden ser suficientes para generar una adecuada respuesta inmune (Cornax et al., 2012). Es necesario evaluar si títulos a partir de 10^{4.0} como los obtenidos en este estudio pueden generar el efecto inmune esperado en un lote de aves.

Los títulos infectivos derivados de la mezcla de ambas cepas vacunales con maíz cocido tanto al momento de la preparación como una hora después reflejaron que esta preparación es capaz de mantener títulos cercanos a los obtenidos con las vacunas puras. Así mismo, la detección y amplificación del gen F a partir de esta preparación cargada con 2, 5 y 10 dosis mostró que diferentes concentraciones del virus vacunal pueden unirse y/o adherirse al vehículo, lo cual según Echeonwu et al. 2008 es una condición importante para el éxito del alimento escogido como vehículo. La adherencia inicial del virus vacunal en el maíz cocido podría atribuirse a varios aspectos: la disponibilidad de residuos de carbohidratos y otras moléculas de carácter polar en la superficie del grano que pueden

interactuar y ser compatibles con sitios de unión en el virus; la ganancia de humedad por parte del vehículo permitiendo la absorción de partículas virales en el medio acuoso y por último a la eliminación de sustancias inhibitoras presentes en el maíz a través de la cocción, resaltando las recomendaciones de utilizar granos tratados como se ha reportado previamente (Abdi et al., 2016). Con base en lo encontrado, sería posible generar inmunidad en aves por la vía oral a través del alimento buscando un resultado lo más cercano a lo que se esperaría al emplear las vías de administración tradicionales.

En este estudio, los resultados obtenidos tanto por HA como por qPCR mostraron la utilidad del arroz y el maíz como vehículos de las cepas VH y LaSota, pero indicaron que la vacuna debería administrarse al momento de su preparación o máximo una hora después, ya sea utilizándolas reconstituidas (puras) o cargándolas en los granos preparados por cocción para ser administradas vía oral en la primera ración del día para garantizar el consumo total de la vacuna. Aunque no se tienen datos de como oscila la estabilidad del virus vacunal en diferentes puntos dentro de este intervalo de tiempo, es posible que al administrar la vacuna mezclada en estos ingredientes después de una hora no se logre generar una adecuada respuesta inmunológica. Posteriores estudios deberían considerar la necesidad de tener una plataforma versátil de estabilización térmica para las vacunas de NDV disponibles, con el fin de lograr mantener su viabilidad por tiempos más prolongados fuera de la cadena de frío.

Es importante incluir en estudios posteriores la identificación de los inhibidores que puedan estar presentes en el vehículo escogido para determinar su influencia sobre la estabilidad de las cepas. La baja recuperación de virus vacunal a partir de granos se ha asociado a la presencia de sustancias antivirales solubles en agua similares a los polifenoles producidos por algunas semillas leguminosas, lo cual podría ser causa de la inactivación del virus. Las lectinas son glicoproteínas naturalmente encontradas en las plantas con afinidad de unión por carbohidratos. Esta naturaleza química les permite unirse a receptores de células animales y posiblemente a receptores virales inhibiendo la liberación de los virus de las células (Rehmani & Spradbrow, 1995). Este hecho impacta de forma negativa a la efectividad del biológico ya que ésta depende significativamente del título infectivo, lo que resalta la importancia de escoger tanto el grano más adecuado como el tratamiento que debe recibir previo a su mezcla con la vacuna para lograr vehiculizar la dosis necesaria a las aves. Así mismo, hay que considerar un posible efecto negativo de las sustancias

presentes en la estructura de los vehículos sobre la eficiencia de las pruebas moleculares ya que se desconoce si pueden actuar como inhibidores de PCR. La característica de unión multivalente de las lectinas facilita su detección por precipitación o aglutinación. Se han empleado estas técnicas evaluando la actividad de estas sustancias en granos como el arroz, el trigo y la cebada encontrando que pueden aglutinar glóbulos rojos de pollo (Rehmani & Spradbrow, 1995).

La aceptabilidad del vehículo a utilizar es un punto importante ya que se debe garantizar el consumo total y en el menor tiempo posible de la ración con el fin de evitar la inactivación del biológico y la correcta activación de la respuesta inmune. Los resultados de la prueba de palatabilidad mostraron que las aves se consumieron las preparaciones de arroz y maíz cocido entre 7 y 10 minutos, mientras que un estudio realizado por Samuel et al. 1993 reportaron que el consumo de arroz cocido ocurrió entre 5 y 45 minutos. Estas diferencias pueden ser debidas a varios factores, por ejemplo, a que los estudios fueron realizados en regiones del mundo distintas y por tanto los tipos de arroz en cada lugar pueden ofrecer una gama de sabores diferentes según características del suelo o de las semillas, o a que en cada estudio se usaron aves de diferentes tipos y tamaños o con periodos de ayuno distintos. Adicionalmente, las gallinas a las que se les dio arroz cocido mostraron mayor dificultad para la aprehensión del grano debido a que luego de su preparación este tomaba una textura pegajosa y por ende podía quedarse pegado en el pico y las plumas de la cara de las aves. Por lo anterior, el grado de apelmazamiento del arroz luego de la cocción también podría influir en el tiempo que tarde el animal para tomar el vehículo antes de consumirlo.

En el caso del arroz crudo con aceite los resultados aquí presentados mostraron que fue ingerido en su totalidad en 15 minutos, lo cual concuerda con lo reportado por Wambura, 2009 quien empleó arroz aceitado para administrar la cepa vacunal I2 de NDV en pollos reportando el mismo tiempo de consumo. Con base en los resultados obtenidos, la preferencia hacia alguno de los vehículos mencionados no sería un problema a la hora de realizar un proceso de vacunación, ya que todos fueron consumidos en tiempos en donde la inactivación de la vacuna aún no tendría lugar.

En una prueba estándar para evaluar la termoestabilidad de un virus, este normalmente

es expuesto a diferentes temperaturas de forma escalonada hasta alcanzar una temperatura final de 56°C y al final se escogen solo aquellos virus que hayan logrado sobrevivir a la inactivación. Posteriormente se evalúa la infectividad del virus en donde será considerado termoestable si la disminución del título es menor de 1Log10 (Wen et al., 2016). En la presente investigación las cepas evaluadas no fueron expuestas a temperaturas por encima de los 22°C ni se emplearon tiempos de exposición más allá de una hora, pero se observó que bajo estas condiciones La Sota y VH mantuvieron su título de forma similar. Ensayos previos del grupo de investigación probaron aumentar el tiempo de exposición de la cepa VH a temperatura ambiente hasta las cuatro horas post-preparación, pero los títulos descendieron considerablemente a partir de las dos horas (datos no publicados). Con base en lo anterior, se determinó un tiempo máximo de una hora post-mezcla para los ensayos. Otro estudio ha indicado que diversas cepas del NDV pierden su infectividad al ser expuestas a temperaturas de 50-55°C durante 30 minutos (Lomniczi, 1975). Con base en esto sería posible seleccionar poblaciones de virus que resistan rangos de temperatura variados y producir vacunas que tengan una mínima dependencia de cadena de frío.

En cuanto a las técnicas empleadas en el estudio, se puede concluir que la titulación de virus en huevos embrionados provenientes de lotes de aves SPF y la determinación de la dosis infectiva embrión 50 son métodos comúnmente usados para cuantificar títulos virales en suspensiones. Estos procedimientos hicieron parte de la metodología utilizada en la evaluación de la estabilidad de las cepas de estudio a temperatura ambiente y corroboraron la viabilidad del virus. Por otra parte, las técnicas en biología molecular como el RT-PCR en tiempo real se han caracterizado por su alta sensibilidad, especificidad y precisión en la cuantificación de ácidos nucleicos, siendo la más ampliamente usada para su cuantificación en muestras de diverso origen, aunque se debe ser cuidadoso con la interpretación de la información obtenida de esta técnica bajo las circunstancias del presente estudio. La temperatura *melting* en el ensayo de amplificación a diferentes dosis de vacuna en el maíz cocido mostró un único pico a 83°C, lo cual corroboró la especificidad de los primers empleados y la amplificación de los productos correspondientes al gen de la proteína F según lo descrito por Jang et al. 2011.

En conclusión, este estudio ayudó a comprender el patrón de disminución de los títulos infectivos de dos vacunas vivas del NDV luego de ser mezcladas con diferentes granos

utilizados como vehículos. El tratamiento que mostró un desempeño favorable para los granos en las condiciones en que se desarrolló la investigación fue la cocción en agua embotellada y el vehículo que mostró resultados más prometedores fue el maíz. Estos hallazgos abren la posibilidad de que el maíz cocido sea el candidato para ser usado en un proceso de vacunación a través del alimento, aunque la caracterización de sustancias inhibitoras y su actividad antiviral debe ser considerada en posteriores estudios, ya que algunas como lectinas, taninos, alcaloides y ácidos son abundantes en la mayoría de las semillas leguminosas por lo que es importante ampliar la gama de posibilidades de uso de diferentes granos.

Es necesario plantear un ensayo *in-vivo* en el que se administre la vacuna mezclada en los granos por vía oral para confirmar la capacidad del virus de estimular una respuesta inmune en las aves.

Bibliografía

- Abdi, R. D., Amsalu, K., Merera, O., Asfaw, Y., Gelaye, E., Yami, M., y Sori, T. (2016). Serological response and protection level evaluation in chickens exposed to grains coated with I2 Newcastle disease virus for effective oral vaccination of village chickens. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0785-6>
- Adhikari, B. ; Oli, P. ; Torley, P.J. y Ward, R. (2014). Parboiled Rice: Understanding from a Materials Science Approach. *Journal of Food Engineering*, 124, 173–183. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.09.010>
- Amagliani, L. ; O'Regan, J. ; Kelly, A.L. y O'Mahony, J.A. (2016). Chemistry, structure, functionality and applications of rice starch. *Journal of Cereal Science*, 70, 291-300. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2016.06.014>.
- Alders, R. G. (2014). Making Newcastle disease vaccines available at village level. *Veterinary Record*, 174(20), 502–503. <https://doi.org/10.1136/vr.g3209>
- Aswathy, R., Sivakumar, B., Brahatheeswaran, D., Fukuda, T., Yoshida, Y., Maekawa, T. y Kumar, D (2012). Biocompatible fluorescent zein nanoparticles for simultaneous bioimaging and drug delivery application. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 3, 025006, 1-7. <https://doi:10.1088/2043->

- 6262/3/2/025006
- Bensink, Z., y Spradbrow, P. (1999). Newcastle disease virus strain I2 - A prospective thermostable vaccine for use in developing countries. *Veterinary Microbiology*, 68(1–2), 131–139. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00069-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00069-3)
- Boumart, Z., Hamdi, J., Daouam, S., Elarkam, A., Tadlaoui, K. O., y El Harrak, M. (2016). Thermal Stability Study of Five Newcastle Disease Attenuated Vaccine Strains. *Avian Diseases*, 60(4), 779–783. <https://doi.org/10.1637/11426-042116-Reg.1>
- Chakraborty, D., Guha, C., Biswas, U., Chatterjee, A., Jana, P. S., Biswas, S., Sharma, L., Pradhan, N., Bhagat, S., y Naha, B. C. (2014). Studies on thermo stability of Newcastle disease virus (local isolate) for preparation of vaccine. *Journal of Veterinary Science and Technology*, 5(2). <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000161>
- Chan, R. M. (1994). La Enfermedad De Newcastle Y Algunos Avances Recientes De Diagnostico. *Ciencia Veterinaria*, 6, 49–72. <http://www.fmz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol6/CVv6c3.pdf>
- Cornejo, Y. I., Martínez, O., Del Toro, C.L., Wong, F.J., Borboa, J. y Cinco, F.J (2018). The structural characteristics of starches and their functional properties. *Journal of Food*, 16(1), 1003-1017. <https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1518343>
- Dimitrov, K. M., Ferreira, H. L., Pantin-Jackwood, M. J., Taylor, T. L., Goraichuk, I. V., Crossley, B. M., Killian, M. L., Bergeson, N. H., Torchetti, M. K., Afonso, C. L., y Suarez, D. L. (2019). Pathogenicity and transmission of virulent Newcastle disease virus from the 2018–2019 California outbreak and related viruses in young and adult chickens. *Virology*, 531(March), 203–218. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.03.010>
- Echeonwu, G., Iroegbu, C., Ngene, A., Junaid, S., Ndako, J., Echeonwu, E. y Okoye, J (2008). Survival of Newcastle disease virus (NDV) strain V4-UPM coated on three grains offal and exposed to room temperature. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (15), 2688-2692. <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Gilad E. Gallili, D. B.-N. (1998). Newcastle Disease Vaccines. *Biotechnology Advances* 16(2), 343-66. [https://10.1016/s0734-9750\(97\)00081-5](https://10.1016/s0734-9750(97)00081-5).
- Hernández, N., Reyes, M., González, F., Núñez, L. y Cooper, B. (2015). Importancia de las proteínas de almacenamiento en cereales (Prolaminas). *Revista especializada en ciencias de la salud*. 18(1), 3-7. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=60701>

- Jang, J., Hong, S. H., y Kim, I. H. (2011). Validation of a real-time RT-PCR method to quantify newcastle disease virus (NDV) titer and comparison with other quantifiable methods. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(1), 100–108. <https://doi.org/10.4014/jmb.1006.06006>
- Jeong, S. H., Lee, D. H., Kim, B. Y., Choi, S. W., Lee, J. B., Park, S. Y., Choi, I. S., y Song, C. S. (2013). Immunization with a thermostable Newcastle disease virus K148/08 strain originated from wild mallard duck confers protection against lethal viscerotropic velogenic Newcastle disease virus infection in chickens. *PLoS ONE*, 8(12), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083161>
- King, D. J. (2001). Note- Selection of Thermostable Newcastle Disease Virus Progeny from Reference and Vaccine Strains. *Avian Diseases*, 45(2), 512–516.
- Lomniczi, B. (1975). Thermostability of Newcastle disease virus strains of different virulence. *Archives of Virology*, 47(3), 249–255. <https://doi.org/10.1007/BF01317812>
- Nochi, T., Takagi, H., Yuki, Y., Yang, L., Masumura, T., Mejima, M., Nakanishi, U., Matsumura, A., Uozumi, A., Hiroi, T., Morita, S., Tanaka, K., Takaiwa, F. y Kiyono, H. (2007). Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(26), 10986-10991. <https://doi:10.1073/pnas.0703766104>
- Nssien, M. A. (2002). Thermostability of reconstituted Newcastle disease virus strains at 36 0 c temperature. *African Journal of Biomedical. Research*, 5, 87–89.
- Olabode, A. O., Ndako, J. A., Echeonwu, G. O., Nwankiti, O. O., y Chukwuedo, A. A. (2010). Use of cracked maize as a carrier for NDV4vaccine in experimental vaccination of chickens. *Virology Journal*, 7, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-67>
- Orsi, M. A., Zaroni, M. M. H., Doretto Júnior, L., Camillo, S. C. A., Ribeiro, S. A. M., Rosado Spilki, F., Buzinaro, M. da G., y Arns, C. W. (2009). Long-term stability studies on protection against Newcastle disease by commercial live vaccine used in Brazil. *Biologicals*, 37(4), 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.04.001>
- Reed L.J., Muench. H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent end points. *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493–497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>

- Rehmani, S. F., y Spradbrow, P. B. (1995). The contribution of lectins to the interaction between oral Newcastle disease vaccine and grains. *Veterinary Microbiology*, 46(1–3), 55–62. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00071-H](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00071-H)
- Roohani, K., Tan, S. W., Yeap, S. K., Ideris, A., Bejo, M. H., y Omar, A. R. (2015). Characterisation of genotype VII Newcastle disease virus (NDV) isolated from NDV vaccinated chickens, and the efficacy of LaSota and recombinant genotype VII vaccines against challenge with velogenic NDV. *Journal of Veterinary Science*, 16(4), 447–457. <https://doi.org/10.4142/jvs.2015.16.4.447>
- Samuel, J. L., Bensink, Z., y Spradbrow, P. B. (1993). Oral vaccination of chickens with the V4 strain of Newcastle disease virus. Cooked and raw white rice as a vehicle. *Tropical Animal Health and Production*, 25, 2–10.
- Seal, B. S., King, D. J., y Bennett, J. D. (1995). Characterization of Newcastle Disease Virus Isolates by Reverse Transcription PCR Coupled to Direct Nucleotide Sequencing and Development of Sequence Database for Pathotype Prediction and Molecular Epidemiological Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 33(10), 2624–2630. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.33.10.2624-2630.1995>.
- Sousa, F., Luzardo, A., Blanco, J., Otero, Martín, M. y Sández, I (2013). FUse of¹H NMR STD, WaterLOGSY, and Langmuir monolayer techniques for characterization of drug–zein protein complexes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 85, 790–79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.07.008>
- Wambura, P. N. (2009). Oral vaccination of chickens against Newcastle disease with I-2 vaccine coated on oiled rice. *Tropical Animal Health and Production*, 41(2), 205–208. <https://doi.org/10.1007/s11250-008-9176-8>
- Wambura, P. N., y Wilson, C. (2009). Protective antibody response following oral vaccination of feral pigeons (*Columba livia*) with Newcastle disease vaccine (strain I-2) coated on oiled rice. *Veterinary Research Communications*, 33(8), 921–926. <https://doi.org/10.1007/s11259-009-9309-1>
- Wambura, Philemon N., y Kataga, S. (2011). Putative protective antibody response following oral vaccination of multi-age free ranging helmeted guinea fowls (*Numida meleagris*) with Newcastle disease virus strain I-2 coated on oiled rice. *Tropical Animal Health and Production*, 43(1), 99–102. <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9659-2>
- Wen, G., Hu, X., Zhao, K., Wang, H., Zhang, Z., y Zhang, T. (2016). Molecular basis for

the thermostability of Newcastle disease virus. *Nature Publishing Group, February*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep22492>

3.COMPARACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE UN VIRUS DE BAJA VIRULENCIA DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE SOBRE LA RESPUESTA INMUNE EN POLLOS

3.1 INTRODUCCIÓN

La aplicación en masa de vacunas vivas en el agua de bebida o por aerosol reduce el costo y mano de obra si se compara con vacunas que deben administrarse individualmente, pero es complicado generar anticuerpos protectores en un alto porcentaje de la población (Van Boven et al., 2008). Esta situación es debida en parte a las características propias del sistema productivo, como las altas densidades, las variaciones en las tasas de consumo de agua entre las aves o el mantenimiento de los animales en condiciones no tecnificadas (Degefa et al., 2004). En este último caso la vía de administración a emplear debe generar adecuados niveles de inmunidad en la totalidad de los individuos y adaptarse a las condiciones de manejo del predio para que su aplicación sea práctica.

La aplicación de virus vivos a través del alimento se ha postulado como un método efectivo para el control del NDV, razón por la cual en países asiáticos y africanos es considerada como la estrategia más adecuada para reducir la presentación de signos clínicos y la mortalidad en aves de traspatio (Jayawardane y Bandara, 1990; Tantaswasdi et al., 1992; Abdi et al., 2016). Varios aspectos resaltan las ventajas de emplear esta vía de administración, dentro de los más relevantes está la reducción del estrés generado en las aves asociado a las prácticas convencionales para la aplicación de vacunas como el manejo individual de los animales o la privación del consumo de agua, elimina la necesidad de tener vacunadores entrenados y permite la vacunación en masa (Abdi et al., 2016). De

otra parte, el hecho de reunir animales que no están confinados atrayéndolos con el alimento hace que no sea necesaria la manipulación individual de las aves para aplicar vacunas.

Con base en lo anterior, es necesaria la implementación de un sistema de inmunización que permita ampliar la cobertura vacunal también a las aves de avicultura familiar por lo que se requieren estudios que evalúen la vía de administración más adecuada y la calidad de la respuesta inmune que se genere. Para tal fin el presente estudio comparó tres métodos de administración de una vacuna viva de NDV: oral a través de maíz cocido, agua de bebida y vía ocular mediante la respuesta humoral por la prueba de IH, expresión génica de IFN- γ e IL-6, índices histológicos de tejidos blanco e índices de peso de órganos linfoides. Paralelamente, se evaluó el nivel de excreción del virus vacunal a través de RT-qPCR.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Diseño experimental del ensayo de vacunación *in-vivo*

- **Población objeto y distribución de los grupos experimentales**

Ciento sesenta pollitos macho de la línea liviana Babcock de un día de edad sin vacunación previa contra la enfermedad de Newcastle fueron obtenidos de una incubadora comercial y alojados en cuartos separados en el bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional de Colombia. Las aves incluidas en el experimento fueron aquellas que tuvieron pesos por encima de 36 g y fueron distribuidos al azar en cada tratamiento asegurando uniformidad de pesos en cada uno. Se manejaron los siguientes tratamientos:

- Grupo control negativo (que no se vacunó contra el NDV)
- Grupo vacunado vía ocular
- Grupo vacunado vía agua de bebida
- Grupo vacunado vía maíz

Cada uno de los grupos estuvo conformado por cinco réplicas con ocho aves en cada una. Las condiciones de manejo como alimentación, temperatura e iluminación se rigieron bajo las recomendaciones de la casa comercial de la estirpe, así como bajo estándares establecidos en el protocolo de bioseguridad para animales en experimentación del Bioterio de la Universidad Nacional de Colombia. Los procedimientos que se realizaron en los animales fueron previamente aprobados por el Comité de Bioética de la FMVZ de la Universidad Nacional de Colombia mediante oficio [CB-FMVZ-UN-021-2020] del 20 de agosto de 2020.

El esquema de vacunación contra el NDV consistió en la inmunización al día 28 de edad con la cepa VH y un refuerzo 15 días después con la misma cepa (día 43 de edad). Durante los seis días posteriores al proceso de vacunación se realizó la evaluación de reacciones post-vacunales tales como estornudos, ruido respiratorio, cambios en la frecuencia y consistencia de las deposiciones, congestión de mucosa ocular y depresión. Así mismo se tomaron datos de parámetros zootécnicos como: peso corporal semanal, consumo de alimento semanal, consumo acumulado, conversión semanal y conversión acumulada.

3.2.2 Cepa vacunal y vías de administración empleadas

La cepa vacunal VH del NDV es un virus de baja virulencia que viene en presentación comercial de blíster de 10 pastillas efervescentes (2000 dosis por pastilla). Una pastilla fue reconstituida en 1 L de agua pura embotellada obteniendo 2 dosis por mL. Luego a partir de esta solución madre se prepararon las dosis correspondientes para cada vía de administración como se describe a continuación. La refrigeración de la vacuna solo se mantuvo desde su adquisición hasta el día de inicio del experimento, en adelante la cepa se manejó a temperatura ambiente.

- **Maíz peto cocido**

Para la preparación del maíz peto, 1 L de agua fue colocado en una olla a fuego máximo hasta que alcanzara una temperatura de 100°C, momento en el cual se bajó la intensidad

del fuego a su mínimo nivel. Posteriormente, 400 g de maíz fueron adicionados al agua y se dejaron en cocción durante 20 minutos a fuego lento. Culminado este tiempo el maíz se dejó enfriar durante toda la noche. Al día siguiente cinco porciones de 80 g de maíz (10 g/ave en cada grupo conformado por 8 aves) fueron colocadas en bolsas plásticas con cierre hermético y fueron cargadas con 1 mL de vacuna que contenía 2 dosis para cada 10 g de maíz, mediante la adición del biológico con una jeringa. Las bolsas fueron agitadas manualmente para homogenizar la mezcla durante 3 minutos.

Se retiró el alimento al finalizar la tarde del día previo a la vacunación y en las primeras horas de la mañana cada corral recibió el maíz cocido cargado con la cepa VH, como se describió en el párrafo anterior. El agua de bebida que se administró a los animales antes, durante y el día después de la vacunación fue preparada con un protector de vacuna comercial e inactivación de cloro.

- **Agua de bebida**

Al finalizar la tarde del día anterior el agua fue retirada y se suministró la vacuna en la primera hora de la mañana siguiente. El biológico se preparó en cada bebedero con 40 mL de agua pura embotellada en la que cada ave recibió dos dosis que fueron consumidas en un tiempo máximo de una hora. El agua de bebida que se dio a los animales el día antes, durante y hasta un día después de la vacunación fue preparada con un protector de vacuna comercial (Cevamune®) e inactivación de cloro.

- **Vía ocular**

Una pastilla de 2000 dosis fue reconstituida en diluyente comercial de 2000 dosis dentro de un tubo cónico de 50 mL, posteriormente la preparación fue trasvasada a un gotero de dosificación previamente esterilizado y cada ave fue vacunada a través de la administración de una gota de la vacuna en el ojo derecho correspondiente a una dosis en un volumen de gota de 0,03 mL.

3.2.3 Evaluación de títulos de anticuerpos por la prueba de Inhibición de la hemaglutinación

Se tomaron muestras de sangre de 15 aves de cada uno de los grupos experimentales al día 2 de edad para la determinación del nivel de anticuerpos maternos y posteriormente a los 15 y 25 días de edad para la evaluación de su catabolismo. Luego se volvieron a tomar muestras de sangre a los 7, 14 y 21 días post-vacunación para determinar los títulos obtenidos.

Las muestras fueron centrifugadas a 5000 xg por 10 minutos, el suero fue colectado en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y posteriormente procesado por Inhibición de la hemaglutinación (IH) para la cuantificación de anticuerpos contra el NDV. La técnica fue realizada en placas fondo “V” de 96 pozos empleando 8 unidades hemaglutinantes (UHA) del antígeno de referencia del NDV que fue titulado realizando diluciones seriadas en base 2 con 25 µl de PBS al 1X y 25 µl del antígeno y se confirmaron las 8 UHA requeridas para la prueba según el protocolo de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2018). Para la prueba de IH se realizaron diluciones seriadas en base 2 con 25 µl del suero y 25 µl de las 8 UHA en cada pozo y se dejó incubar durante 30 minutos. Luego de este tiempo, 25 µl de glóbulos rojos de pollo preparados al 1% fueron añadidos en cada pozo y se dejó en incubación por 45 minutos para determinar el punto final de hemaglutinación. Los datos del nivel de anticuerpos de cada suero se tomaron a partir del punto máximo de dilución del suero en el cual los anticuerpos presentes aún producían la inhibición de la hemaglutinación. Se registraron los títulos máximos, mínimos, el promedio aritmético, el promedio geométrico y se graficó la distribución de los sueros según el título obtenido en histogramas para su análisis.

3.2.4 Cuantificación absoluta de la excreción de virus vacunal por RT-qPCR

Para la evaluación de excreción viral post-vacunación se tomaron 5 hisopos cloacales de las aves (1 hisopo por ave) en cada grupo experimental a los 2 y a los 4 días post-vacunación para realizar cuantificación absoluta de RNA viral (Cárdenas, 2015). Los hisopos se preservaron en PBS al 1X con antibiótico (200 µg/mL de Gentamicina sulfato y

1000 U/mL de Penicilina G y 4 microgramos/mL de Anfotericina B) y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

- **Extracción del RNA viral y síntesis de cDNA**

Se realizó la extracción de ácido nucleico a partir de los hisopos siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el capítulo 2 numeral 2.2.6

- **Detección y cuantificación de la carga viral por PCR en tiempo real**

Se emplearon los mismos *primers* de gen F reportados por Seal et al., 1995 utilizados en la fase de evaluación de los vehículos del presente estudio.

Para determinar el nivel de excreción del virus vacunal en cada uno de los grupos experimentales se realizó la técnica de RT-qPCR. La mezcla de PCR se preparó para un volumen final de reacción de 10 µl de la siguiente manera: 3.1 µl de agua ultrapura, 5 µl de LightCycler® 480 SYBR Green I Máster (1X), 0.15 µl de *primer* Forward (10mM), 0.15 µl de *primer* Reverse (10mM), 0.5 µl de DMSO (0.5X) y 1.1 µl de cDNA. El proceso de amplificación se realizó en el equipo LightCycler 480 II bajo las siguientes condiciones térmicas: 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 segundos, anillamiento a 59°C por 10 segundos y extensión a 72°C por 10 segundos. La especificidad de las amplificaciones se determinó por análisis de las curvas de *melting* donde estos valores y los de Ct se calcularon usando el software LightCycler 480®. Se tomaron las diluciones 10⁻⁷ y 10⁻⁵ de la curva 1 como concentraciones estándar y la comparación de la carga de NDV se realizó con base en los Ct obtenidos y la concentración absoluta.

3.2.5 Determinación de la expresión de genes de inmunidad innata por RT-qPCR

A los 2 y 4 días post-vacunación se sacrificaron 5 aves de cada grupo experimental y se les tomó el bazo para extracción de RNA total. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta el momento de la extracción.

- **Extracción del RNA total y síntesis de cDNA**

Para la extracción de RNA total se empleó el kit comercial InviTrap Spin Tissue RNA Mini kit Universal RNA (Invitex Molecular GmbH D-13125, Berlin) siguiendo las instrucciones del fabricante, luego fue eluido en un volumen de 50µl y solo 5µl fueron usados inmediatamente para la reacción de RT. El RNA fue tratado posteriormente con enzimas (DNasas) usando el kit DNase I (RNase - free) ® (NEW ENGLAND BIOLABS) previo al proceso de retrotranscripción. La calidad y cantidad del RNA extraído se midió usando un espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 (Thermo Scientific). El DNA complementario se sintetizó para un volumen final de 10 µl con el kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Cheshire, UK. Cat No. 4374966).. Los componentes de la mezcla maestra fueron: 1.6 µl de agua ultrapura, 1 µl de Buffer RT (10X), 1 µl de Random *primers* (10X), 0.4 µl de Mix dNTPs (100mM), 0.5 µl de RNase inhibitor (20U/µl) y 0.5 µl de enzima Multiscribe (50U/µl). La RT se corrió en el termociclador Bio-Rad Laboratories® bajo las siguientes condiciones: incubación a 25°C por 6 minutos, 37°C por 72 minutos, 85°C por 3 minutos y 4°C por 6 minutos.

- **Cuantificación de la expresión génica relativa de IFN-γ e IL-6 por RT-qPCR**

La expresión de IFN-γ e IL-6 se determinó por RT-qPCR usando el kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master y *primers* específicos de los genes mencionados (Cornax et al., 2012) (tabla 3.1). Los tamaños de los productos se corroboraron previamente por PCR convencional.

Tabla 3.1 *Primers* dirigidos a la amplificación de genes de inmunidad innata

Primer	Secuencia	Tamaño bp
IFN-γ	Forward: CAAAGCCGCACATCAAACA Reverse: TTTCACCTTCTTCACGCCATC	80
IL-6	Forward: GCTCGCCGGCTTCGA Reverse: GGTAGGTCTGAAAGGCGAACAG	71
β- actina	Forward: TCACCAACTGGGATGATATGGA	118

	Reverse: TTGGCTTTGGGGTTCAGG	
--	-----------------------------	--

Para el análisis de expresión, el gen de la β -actina se usó como gen normalizador o *housekeeping*. Los componentes de la mezcla de PCR fueron 2.2 μ l de agua ultrapura, 5 μ l de LightCycler® 480 SYBR Green I (1X), 0.3 μ l de *primer* Forward (10mM), 0.3 μ l de *primer* Reverse (10mM), 1 μ l de DMSO (0.5X) y 1.2 μ l de cDNA para un volumen final de 10 μ l. La qPCR se llevó a cabo usando las siguientes condiciones térmicas: 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos, anillamiento a 58°C por 15 segundos y extensión a 72°C por 15 segundos. El cálculo del nivel de expresión génica se determinó por el método del doble Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct) reportado previamente (Livak y Schmittgen, 2001).

3.2.6 Evaluación de los índices de peso de órganos linfoides en respuesta a la vacunación

Con el objetivo de evaluar el efecto de la vía de administración de la vacuna sobre los índices de peso de la bursa de Fabricio, timo y bazo, se sacrificaron 5 aves al azar de cada grupo experimental a los días 2, 4 y 21 postvacunación para tomar de cada una de ellas los órganos linfoides mencionados. Se registraron los pesos de cada órgano y el peso corporal de cada ave para obtener los índices usando la fórmula de Lucio y Hitchner, 1979 (Igwe et al., 2019):

$$\frac{\text{peso del órgano}}{\text{peso corporal del ave}} \times 100$$

3.2.7 Valoración microscópica y macroscópica de lesiones en tejidos

Se realizaron necropsias de las 5 aves sacrificadas por grupo los días 2 y 4 postvacunación para evaluación de lesiones macro. Para complementar el análisis se tomaron muestras de tejidos para histopatología de bazo, conjuntiva, cornete nasal, laringe, pulmón, timo, bursa, proventrículo, tonsila cecal y todos los segmentos del intestino para

valorar el grado de lesión generada por la replicación del virus vacunal en los tejidos por medio de una puntuación previamente reportada (Hussein et al., 2018) en el que se evaluaron los siguientes criterios de lesión: hiperemia, infiltración inflamatoria, edema y lesiones de degeneración/necrosis epitelial en sistema respiratorio superior en un rango que va de 0 a 5 y en sistema digestivo en una rango de 0 a 3 . En el caso de órganos linfoides los criterios de lesión fueron grado de depleción, activación/proliferación linfoide y necrosis en un rango de 0 a 5. Los tejidos fueron tomados en formol buferado al 10%, se realizó proceso de imbibición en parafina, corte y tinción con hematoxilina-eosina.

3.2.8 Análisis estadístico

Los datos generados de este estudio fueron sujetos a análisis estadístico usando el software R- project 4.1.0. y Microsoft Excel. Los efectos comparativos según vía de administración y día post-vacunación sobre los índices de órganos linfoides, los títulos de anticuerpos, la excreción viral y los scores de lesiones micro se analizaron usando la prueba de Kruskall Wallis y la prueba de comparación de Wilcoxon. La evaluación de parámetros zootécnicos fue sometida a inferencia estadística por análisis de varianza (ANOVA). En todos los análisis se aceptó la significancia con un $P < 0.05$.

Los niveles de expresión génica por grupo experimental se analizaron por medio del método del $\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen, 2001) indicando en que grupos hubo mayor expresión de los genes de interés. La validación del gen de la β -actina se realizó por ANOVA de los valores de Ct obtenidos entre los grupos.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Anticuerpos maternos y respuesta serológica post-vacunación

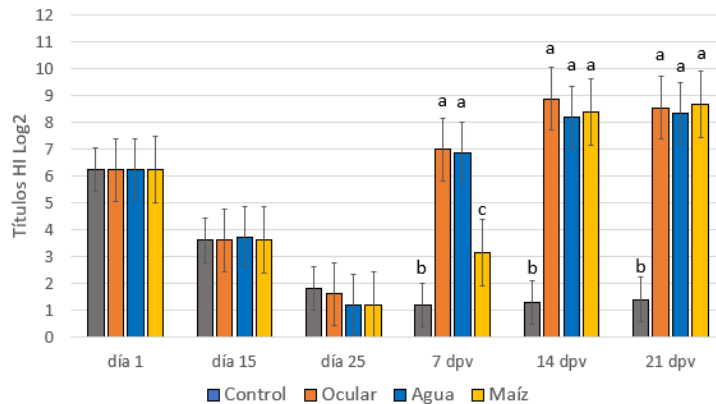
La evaluación de los anticuerpos maternos mostró que la mayoría de los sueros se agruparon en títulos entre 64 y 128 con un título medio geométrico de 128 (\log_2^7), lo cual

fue un indicador de la transferencia de anticuerpos específicos del NDV a la progenie producto de la vacunación de los lotes maternos.

El título de anticuerpos obtenidos por IH al día 7 post-vacunación incrementó en los grupos vacunados vía ocular y agua de bebida sin diferencias significativas entre estos grupos, mientras que el título de los pollos vacunados a través de maíz cocido se mantuvo bajo (\log_2^3) (gráfica 3.1). Hubo diferencias entre los títulos de las aves vacunadas por agua de bebida y vía maíz ($P=0.001$), así como entre este último y la vía ocular ($P=0.001$). Los títulos del grupo inmunizado por medio del maíz empezaron a incrementar a partir del día 14 y se mantuvieron a un nivel similar hacia el día 21. Durante todo el experimento los títulos del grupo no vacunado permanecieron negativos.

La vía ocular generó promedios de títulos más elevados al día 14 seguido por el maíz y el agua de bebida, mientras que al día 21 el maíz mostró un ligero incremento con respecto a los otros grupos. A pesar de esto, tanto al día 14 como al día 21 post-vacunación no hubo diferencias estadísticas significativas luego de vacunar por las vías agua de bebida, maíz y ocular.

Gráfica 3.1 Títulos de anticuerpos en la prueba de IH de pollos pre y post- vacunación



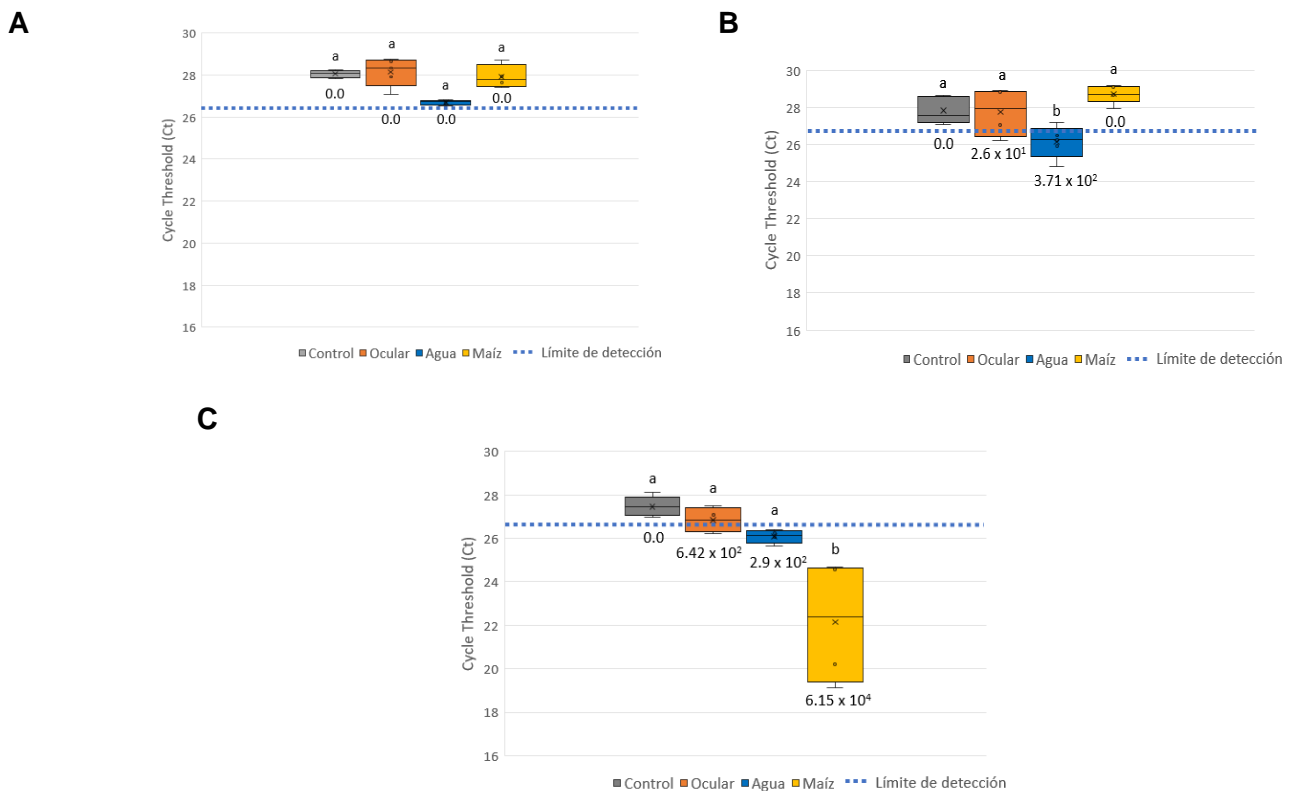
Grupos con letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). Dpv: días post-vacunación. Fuente: Autor

3.3.2 Excreción del virus vacunal

El nivel de excreción viral se evaluó con los valores de los Ct obtenidos en cada una de las muestras y al límite de detección determinado a través de la curva de qPCR. Ninguno de los grupos (vacunados y no vacunados) excretó virus al ambiente a través de la cloaca al día 0. En el caso de los grupos vacunados, la excreción empezó a ser evidente al día 2 post-vacunación en el grupo que recibió la dosis vía agua de bebida, el cual mostró diferencias significativas con el grupo maíz ($P= 0.04$). Los Ct del grupo ocular y el maíz no difirieron significativamente del Ct del control, sin embargo, el grupo ocular presentó excreción (Gráfica 3.2).

Al día 4 post-vacunación las tres vías de vacunación evaluadas difirieron significativamente ($P=0.0005$). Las aves vacunadas vía oral mostraron excreción del virus vacunal a través de la cloaca con diferencias entre el maíz y el agua de bebida ($P=0.009$) mientras que la excreción en el grupo que recibió la vacuna vía ocular fue baja (Gráfica 3.2).

Gráfica 3.2 Excreción del virus vacunal a través de la cloaca



Grupos con letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). Límite de detección de la curva: 26.7. **A:** valores de Ct obtenidos por RT-qPCR a partir de hisopos cloacales día 0, **B:** valores de Ct obtenidos por RT-qPCR a partir de hisopos cloacales al 2dpv. **C:** valores de Ct obtenidos por RT-qPCR a partir de hisopos cloacales al 4dpv. Los números de bajo de las cajas representan la cantidad de copias de ARN viral. dpv: días post-vacunación. Fuente: Autor

La tabla 3.2 muestra la cantidad y el porcentaje de aves de cada grupo que evidenciaron excreción del virus vacunal a través de la cloaca.

Tabla 3.2 Proporción de aves con evidencia de excreción viral a través de la cloaca

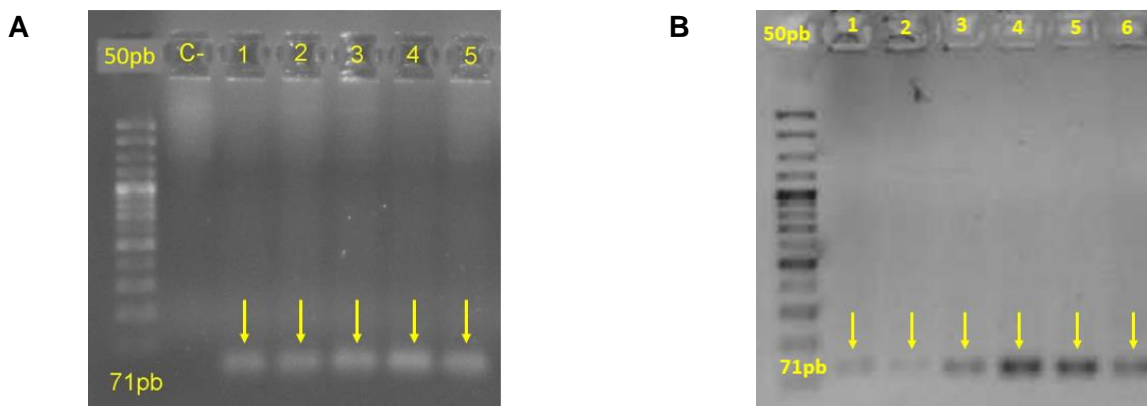
Grupo	0dpv		2dpv		4dpv	
	Número de aves	Porcentaje	Número de aves	Porcentaje	Número de aves	Porcentaje
Control	0/4	0%	0/5	0%	0/5	0%
Ocular	0/5	0%	2/4	50%	2/5	40%
Agua	0/4	0%	4/5	80%	4/4	100%
Maíz	0/4	0%	0/5	0%	4/4	100%

Fuente: autor

3.3.3 Expresión relativa de genes de INF- γ e IL-6

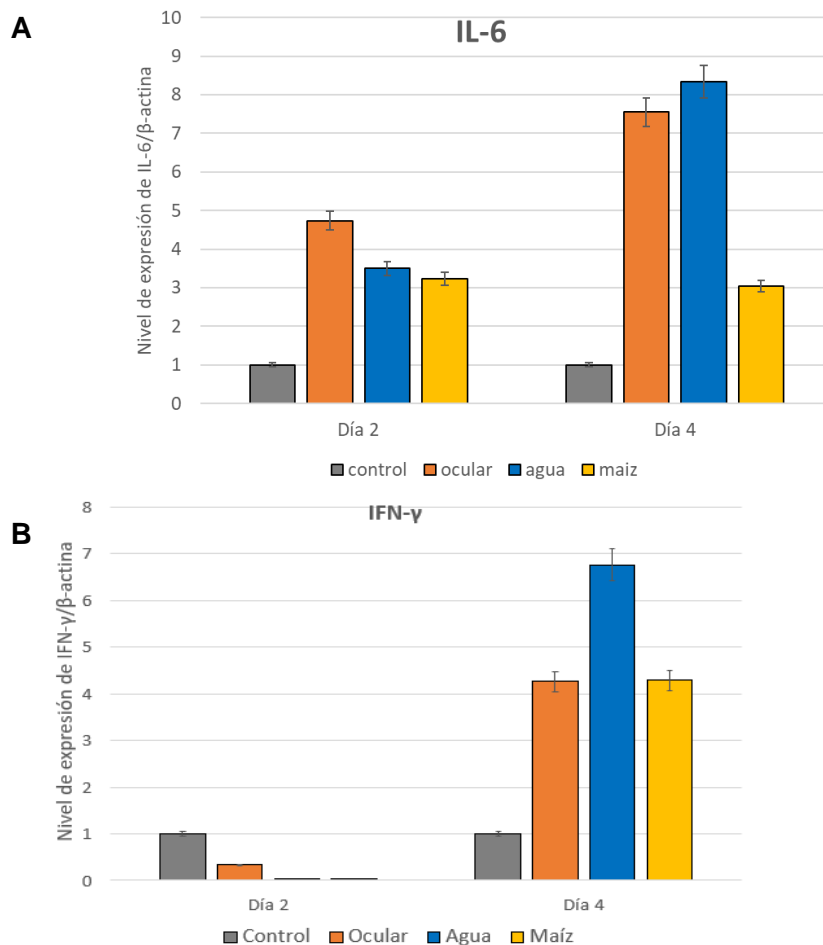
El tamaño de los genes de interés amplificados por PCR convencional se muestra en la figura 3.1. La expresión génica de IFN- γ de los animales vacunados se mantuvo por debajo del grupo control al día 2 post-vacunación. La expresión de IFN- γ fue baja al día 2 post-vacunación y solo incrementó hasta el día 4 en todos los grupos (gráfica 3.3B); interesantemente, la expresión génica al día 4 fue similar entre las aves del grupo ocular y las del grupo maíz. La vacunación vía agua de bebida estimuló la expresión del gen por encima de las demás vías de administración al cuarto día. En cuanto a la IL-6, al día 2 post-vacunación la expresión fue similar entre los grupos vacunados e incrementó hacia el día cuarto particularmente en los grupos agua y ocular. El nivel de expresión en las aves del grupo maíz disminuyó ligeramente (gráfica 3.3A).

Figura 3.1 Amplificación de los genes de INF- γ e IL-6 por PCR convencional



A: Gen de INF- γ , carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo, líneas 1-5: banda correspondiente a la amplificación del INF- γ (71pb) a partir de una muestra de bazo tomada de un ave el día de la recepción, cada carril corresponde a una réplica. Las fechas señalan la banda de la amplificación **B:** Gen de IL-6, carril 1: marcador de peso molecular, líneas 1-6: banda correspondiente a la amplificación de IL-6 (71pb) a partir de una muestra de bazo tomada de un ave el día de la recepción, cada carril corresponde a una réplica. Las fechas señalan la banda obtenida pb: pares de bases. Fuente: Autor

Gráfica 3.3 Niveles de expresión génica de IFN- γ e IL-6 a los 2 y 4 días post-vacunación



A: Expresión relativa de IL-6 en macerados de bazo, **B:** Expresión relativa de IFN- γ en macerados de bazo.

Fuente: Autor

3.3.4 Evaluación de índices de peso de órganos linfoides

No hubo diferencias estadísticas entre los grupos en los índices de peso de bursa, timo y bazo obtenidos al día 2 post-vacunación. Al día 4 el grupo ocular mostró diferencias significativas comparado con el control negativo en los índices de peso del timo ($P = 0.04$). Después de la segunda dosis de vacuna los valores obtenidos fueron similares entre los grupos (tabla 3.3).

Tabla 3.3. Índices de peso de bursa, timo y bazo a los 2, 4 y 21 días post-vacunación

Día	Grupo	Índice de peso		
		Bursa	Timo	Bazo
2dpv	Control	0.51±0.04	0.52±0.08	0.16±0.02
	Ocular	0.59±0.12	0.60±0.12	0.16±0.01
	Agua	0.49±0.09	0.57±0.09	0.12±0.03
	Maíz	0.56±0.05	0.54±0.06	0.13±0.02
	<i>P-value</i>	0.8	0.9	0.5
4dpv	Control	0.56±0.03	0.61±0.07 ^a	0.14±0.03
	Ocular	0.57±0.03	0.27±0.02 ^b	0.16±0.08
	Agua	0.50±0.04	0.41±0.05 ^b	0.17±0.01
	Maíz	0.54±0.02	0.34±0.06 ^b	0.12±0.01
	<i>P-value</i>	0.3	0.04	0.09
21dpv	Control	0.3±0.03	0.4±0.03	0.1±0.008
	Ocular	0.4±0.02	0.4±0.02	0.1±0.006
	Agua	0.4±0.02	0.5±0.04	0.1±0.007
	Maíz	0.4±0.03	0.3±0.04	0.1±0.01
	<i>P-value</i>	0.3	0.09	0.5

Promedio de los índices \pm error estándar de la media. Letras diferentes en superíndice representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). dpv: días post-vacunación Fuente: Autor

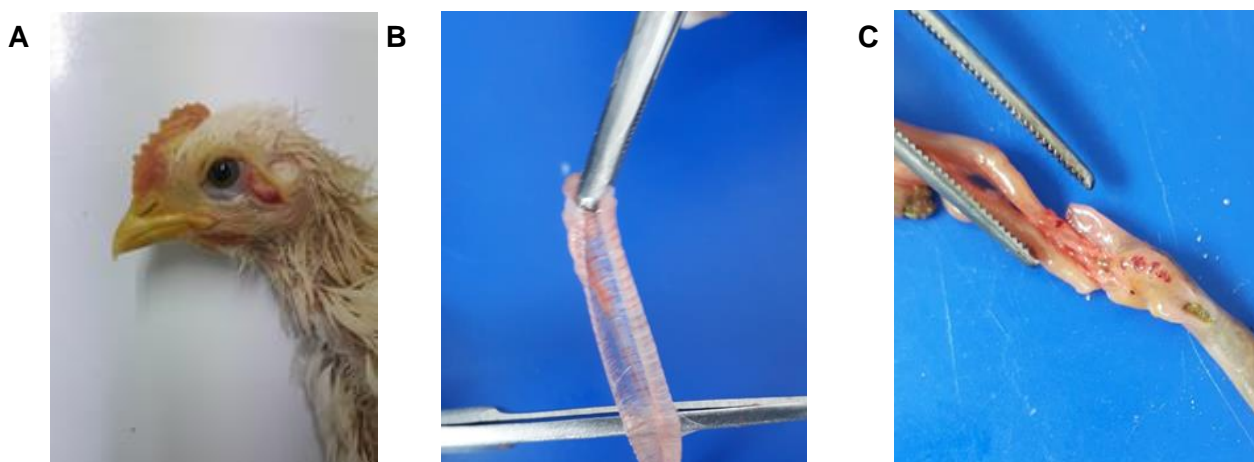
3.3.5 Examen macro y micro de lesiones en tejidos

La localización e intensidad de las lesiones macroscópicas fueron similares entre el día 2 y 4 post-vacunación. Las lesiones encontradas en el grupo vacunado vía ocular estuvieron

principalmente localizadas a nivel de la cabeza, en donde se encontró congestión de conjuntiva y tracto respiratorio superior (figura 3.2).

Se observaron hemorragias en tonsilas cecales en los grupos que recibieron vacuna vía oral en el 60% de las aves evaluadas (figura 3.2). Adicionalmente, se pudo observar congestión en la mucosa del duodeno, yeyuno e íleon y congestión en la conjuntiva.

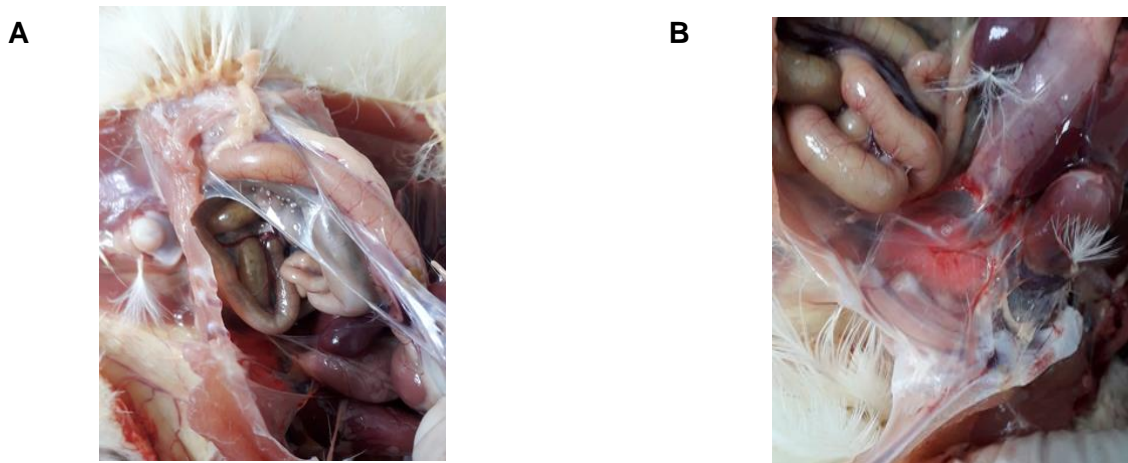
Figura 3.2 Lesiones en conjuntiva y tráquea del grupo ocular y tonsilas cecales del grupo agua de bebida



A: Congestión en conjuntiva en ave del grupo vacunado vía ocular. **B:** leve congestión en tráquea en ave del grupo vacunado vía ocular. **C:** hemorragias en tonsilas cecales en ave del grupo vacunado por vía agua de bebida. Fuente: Autor

La presencia de espuma y opacidad en sacos aéreos torácicos y abdominales fue un hallazgo en algunas de las aves de los grupos agua y maíz (figura 3.3). Por otra parte, se observó retención del saco vitelino en algunos individuos en todos los grupos evaluados.

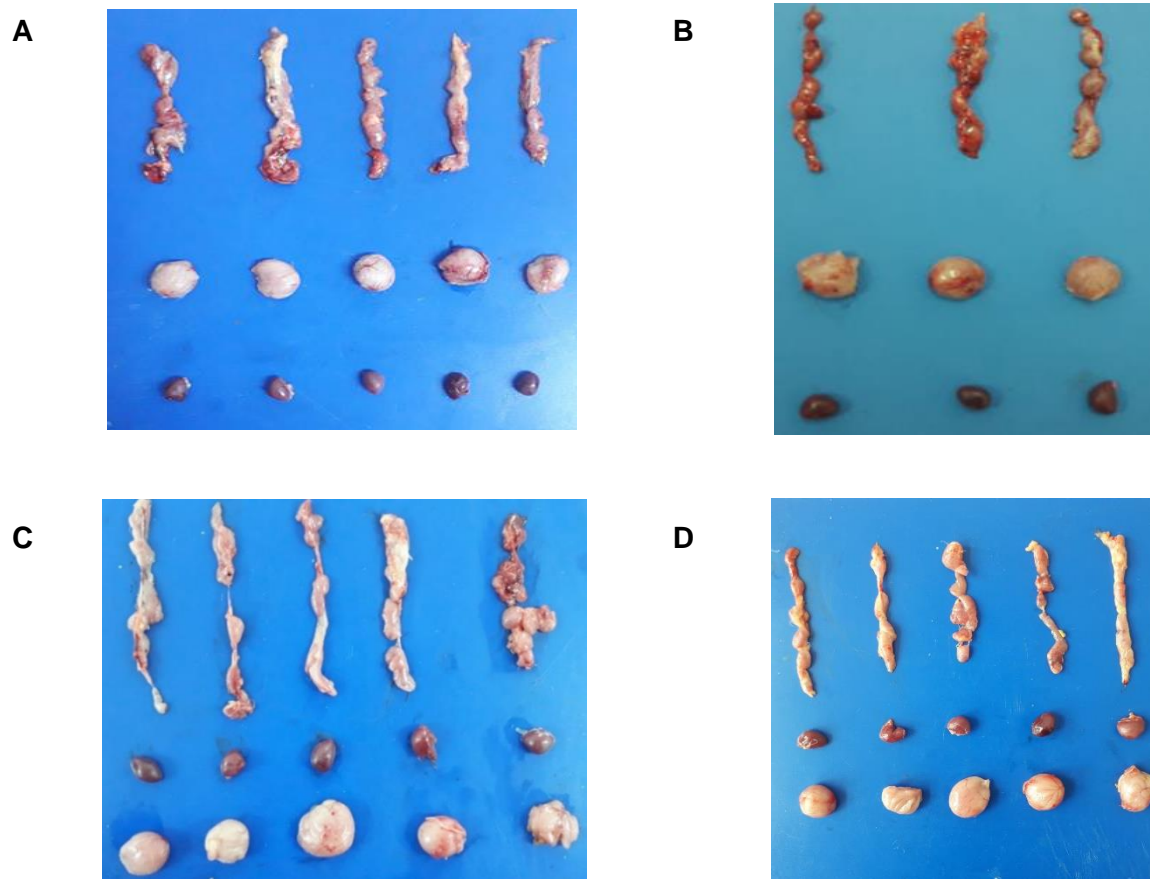
Figura 3.3 Lesiones en sacos aéreos en grupos vacunados vía oral



A: Leve contenido espumoso en saco aéreo abdominal en ave vacunada vía maíz. **B:** leve contenido espumoso en saco aéreo torácico en ave vacunada vía agua de bebida. Fuente: Autor

El tamaño y aspecto de la bursa de Fabricio, timo y bazo se mantuvieron sin variaciones evidentes entre los grupos de estudio.

Figura 3.4 Evaluación comparativa del tamaño y apariencia de órganos linfoides entre las aves de cada grupo



A: timo, bazo y bursa de Fabricio de 5 pollos del grupo control negativo. **B:** timo, bazo y bursa de Fabricio de 3 pollos del grupo vacunado vía ocular. **C:** grupo vacunado vía agua de bebida. **D:** grupo vacunado vía maíz. No se aprecian diferencias en el tamaño ni la apariencia entre los órganos. Fuente: Autor

En general los animales de cada vía de aplicación mostraron grados de lesión bajos para los órganos evaluados y no hubo diferencias significativas entre los grupos (tablas 3.5, 3.6, 3.7). El órgano que presentó un grado de lesión más elevado fue la tonsila cecal en la que se observó proliferación masiva y activación de folículos linfoides.

Hubo diferencias significativas en los grados de lesión en cornetes al día 4 post-vacunación entre el grupo ocular y el control negativo ($P=0.04$) y entre el grupo control y agua ($P=0.04$). También en laringe entre el control y el grupo agua ($P=0.02$), maíz *versus* control ($P=0.04$) y entre ocular y control ($P=0.03$). En todos los casos se observó una rápida recuperación del tejido hacia el día 21.

Tabla 3.4 Grados de lesiones microscópicas en aparato digestivo

Día	Digestivo	Rangos escala de lesión	Control	Ocular	Agua	Maíz	P-value
2	Proventrículo	0-4	0.0	0.3±0.3	0.0	0.0	0.2
	Intestino	0-3	1.2±0.2	1.4±0.2	1.2±0.2	1.0±0.3	0.7
	Total		1.2	1.7	1.2	1.0	0.6
4	Proventrículo	0-4	0.0	0.0	0.0	0.0	1
	Intestino	0-3	1.4±0.2	1.4±0.2	1.2±0.2	1.0	0.4
	Total		1.4	1.4	1.2	1.0	0.4
21	Proventrículo	0-4	0.0	0.0	0.0	0.0	1
	Intestino	0-3	1.4±0.2	1.2±0.2	1.0	1.6±0.2	0.2
	Total		1.4	1.2	1	1.6	0.2

Promedio de los grados de lesiones ± error estándar de la media. No se observó diferencia estadística. Fuente: Autor

Tabla 3.5 Grados de lesiones microscópicas en aparato respiratorio

Día	Respiratorio	Rangos escala de lesión	Control	Ocular	Agua	Maíz	P-value
2	Cornetes	0-5	0.4±0.2	0.4±0.2	0.6±0.2	0.6±0.2	0.8
	Laringe	0-5	0.2±0.2 ^a	1.2±0.2 ^b	1.0±0.0 ^b	0.4±0.3 ^a	0.01
	Tráquea	0-5	0.0	0.0	0.0	0.2±0.2	0.3
	Pulmón	0-3	0.2±0.2	0.0	0.0	0.0	0.3
	Total respiratorio		0.8	1.6	1.6	1.2	0.6

	Total activación linfoide		0.0	0.2	0.4	0.6	0.06
4	Cornetes	0-5	0.4±0.2 ^a	1.8±0.6 ^b	1.4±0.2 ^{ab}	0.6±0.2 ^a	0.03
	Laringe	0-5	0.8±0.4 ^a	2.8±0.5 ^b	2.6±0.4 ^b	2.4±0.4 ^b	0.03
	Tráquea	0-5	0.6±0.2	1.3±0.3	0.8±0.2	0.6±0.2	0.2
	Pulmón	0-3	0.0	0.2±0.2	0.0	0.0	0.4
	Total respiratorio	0-13	1.8 ^a	6.1 ^b	4.8 ^b	3.6 ^b	0.01
	Total activación linfoide	0-3	0.0	0.4	0.8	0.4	0.1
21	Cornetes	0-5	0.7±0.3	0.8±0.2	0.8±0.2	0.4±0.2	0.5
	Laringe	0-5	0.8±0.2	0.6±0.2	0.8±0.4	1.5±0.3	0.2
	Tráquea	0-5	0.0	0.0	0.0	0.3±0.3	0.4
	Pulmón	0-3	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0
	Total respiratorio	0-13	1.9	1.8	1.6	2.2	0.9
	Total activación linfoide	0-3	0.8	0.8	1.2	1.6	0.5

Promedio de los grados de lesiones ± error estándar de la media. Letras diferentes en superíndice representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). pv: post-vacunación. Fuente: Autor

Tabla 3.6 Grados de lesiones microscópicas en sistema linfoide

Día	Linfoides	Rangos escala de lesión	Negativo	Ocular	Agua	Maíz	P-value
2	Bursa de Fabricio	0-5	1.2±0.4	1.2±0.4	1.0±0.3	1.2±0.2	0.9
	Timo	0-4	0.0	0.0	0.0	0.0	1
	Bazo	0-5	1.4±0.2	1.2±0.4	1.0±0.3	1.4±0.2	0.6
	Tonsila cecal	0-3	1.6±0.2	1.8±0.2	2	1.8±0.3	0.4
	Total linfoide	0-17	4.2	4.2	4	4.4	0.9

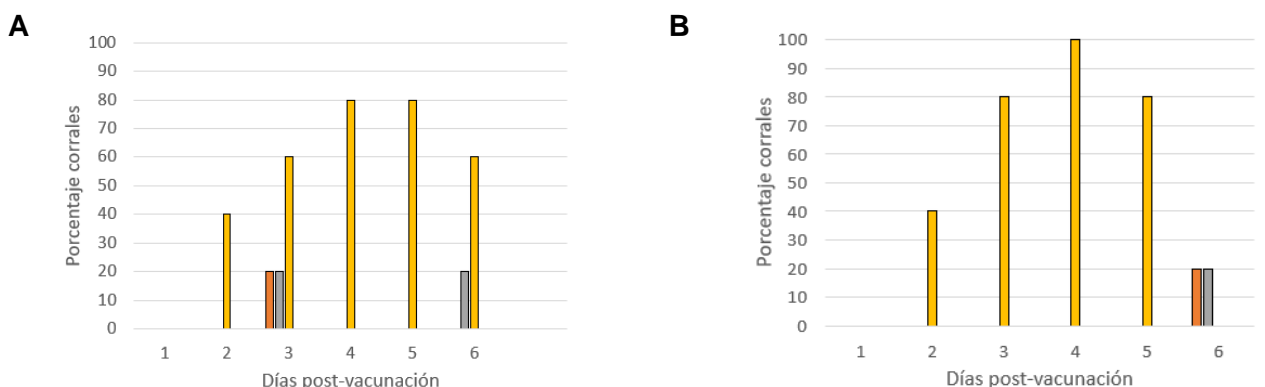
	Linfoides	Rangos escala de lesión	Negativo	Ocular	Agua	Maíz	P-value
4	Bursa de Fabricio	0-5	0.8	0.6	0.4	0.4	0.7
	Timo	0-4	0.0	0.0	0.0	0.0	1
	Bazo	0-5	1.0±0.3	1.0±0.3	1.0	1.0	1
	Tonsila cecal	0-3	1.6±0.2	2±0.3	2	2.3±0.3	0.3
	Total linfoide	0-17	3.4	3.6	3.4	3.65	0.9
21	Bursa de Fabricio	0-5	0.8±0.2	0.2±0.2	0.0	0.6±0.4	0.08
	Timo	0-4	0.0	0.0	0.0	0.0	1
	Bazo	0-5	1.0	1.2±0.2	1.0	1.4±0.4	0.2
	Tonsila cecal	0-3	2.4±0.2	2	2.4±0.2	2.2±0.3	0.4
	Total linfoide	0-17	4.2	3.4	3.4	4.25	0.2

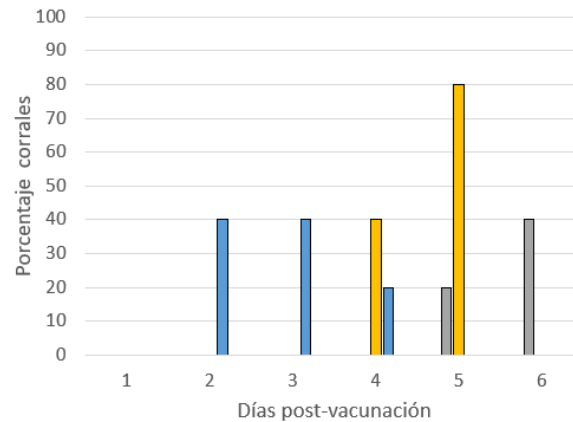
Promedio de los grados de lesiones ± error estándar de la media. Fuente: Autor

3.3.6 Monitoreo de reacciones post-vacunales

La sinología más evidente entre todos los grupos experimentales fue el incremento en la frecuencia de deposiciones líquidas. En los grupos vacunados a través de maíz cocido y agua de bebida esta reacción se evidenció a partir del segundo día post-vacunación en el 40% de los corrales y gradualmente alcanzó el 80% y 100% respectivamente hacia el día 4 y 5, momento en el cual su presentación empezó a disminuir. Otras reacciones post-vacunales como estornudos y ruidos respiratorios se manifestaron en menor proporción en todos los grupos, particularmente al día 3 y 6 en las aves que recibieron vacunación vía oral.

Gráfica 3.4 Monitoreo de reacciones post-vacunales en las unidades experimentales según vía de aplicación



C

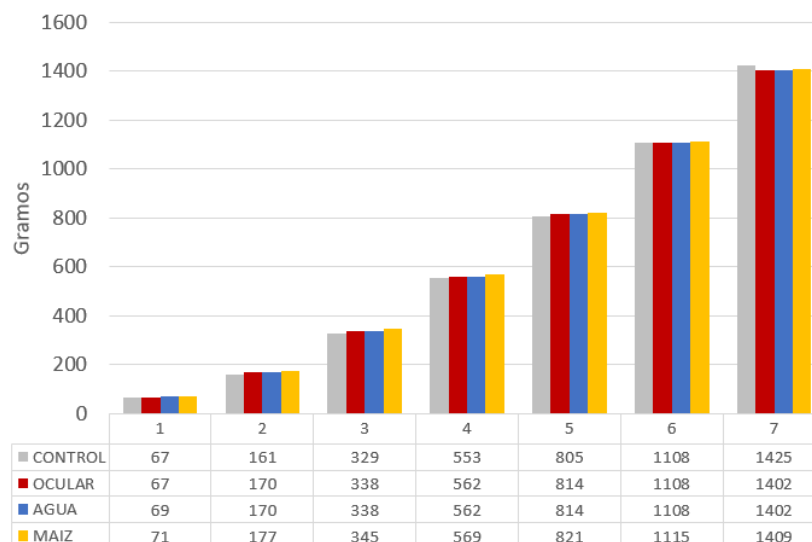
Estornudos Ruido respiratorio Heces líquidas Congestión mucosa ocular Depresión

A: reacciones post-vacunales observadas en el grupo vacunado a través de maíz cocido, **B:** grupo vacunado a través de agua de bebida, **C:** grupo vacunado vía ocular. Fuente: Autor

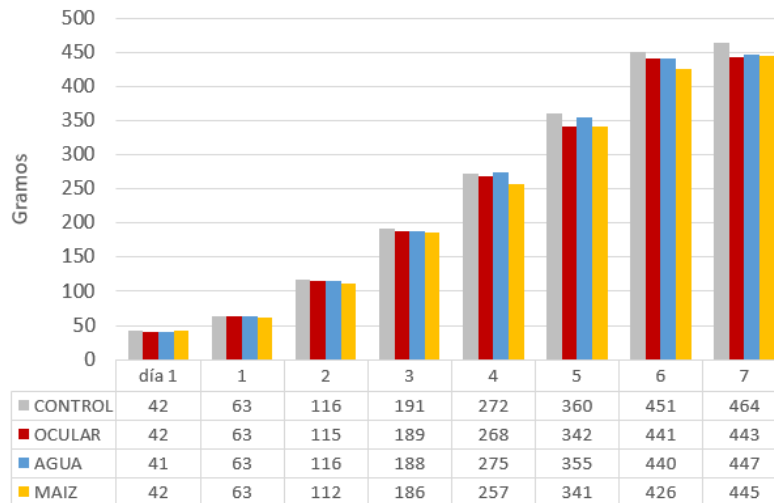
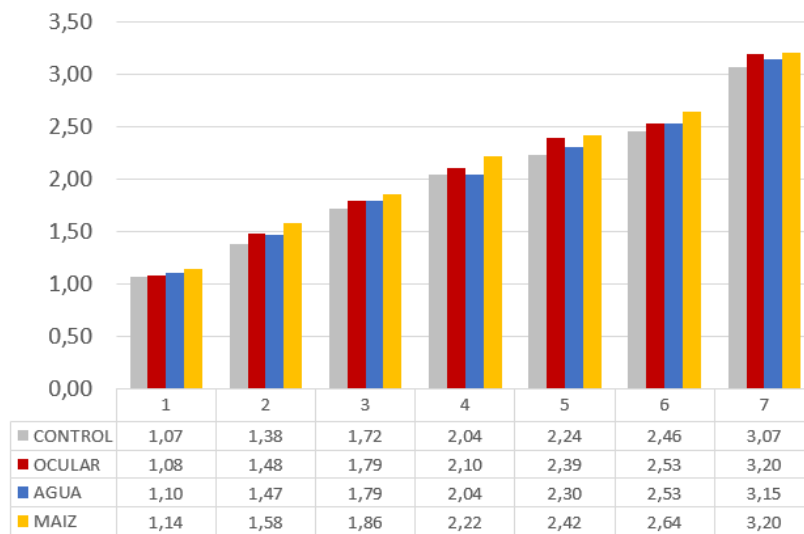
3.3.7 Evaluación de parámetros zootécnicos

Se observó que el peso, el consumo semanal/acumulado y la conversión semanal/acumulada no presentaron diferencias estadísticas significativas entre los grupos durante las 7 semanas del experimento (gráfica 3.4). De acuerdo con lo anterior, la vacunación por las vías evaluadas no alteró el rendimiento zootécnico de las aves.

Gráfica 3.5 Parámetros zootécnicos evaluados durante 7 semanas de experimentación

A

B



A: consumo acumulado. **B:** conversión acumulada. **C:** peso. Fuente: Autor

Los pesos de las aves del grupo control se mantuvieron ligeramente más altos a partir de la tercera semana de vida comparado con los de los grupos vacunados hasta el final del experimento. De manera similar, el consumo semanal fue ligeramente más alto en los controles negativos a partir de la semana 6.

3.4 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La adopción de la vía oral usando alimento como vehículo ha sido una estrategia para generar inmunidad contra el NDV en sistemas de traspatio con el fin de disminuir el impacto de la enfermedad en zonas endémicas. En este estudio se examinó el efecto de la vacunación por vía oral, ocular y agua de bebida sobre la respuesta serológica, la expresión génica de IL-6 e IFN- γ , los grados de lesión microscópica en tejidos y la excreción viral. La inmunidad humoral por rutas ocular y agua apareció más rápido, la inmunidad por maíz tardó más. El incremento inicial de los títulos por IH observado en los grupos al día 7 post-vacunación concuerda con el momento de detección temprana de anticuerpos reportado por Vrdoljak, 2017 al emplear vacunas vivas y en otro trabajo realizado por Okechukwu et al. 2020. De acuerdo con esto la aplicación de la vacuna logró establecer el estado de infección leve esperado en los individuos.

Después de los primeros 7 días post-vacunación el perfil serológico de las aves vacunadas vía maíz se mantuvo a niveles basales (\log_2^3) y solo pocos individuos tuvieron títulos por encima de esta media. Sólo hasta el día 14 y 21 post-vacunación los títulos alcanzaron niveles comparables a los de los demás grupos, lo cual implica que al parecer algunas aves no lograron consumir la dosis debido a la dominancia ejercida por otros individuos del grupo. El posterior desarrollo de títulos probablemente se dió por transmisión horizontal debida al contacto con aves que excretaron el virus vacunal.

Todas las vías probadas en el presente estudio superaron al maíz en términos de rapidez en la generación del efecto serológico esperado, pero el vehículo logró estimular la inmunidad humoral. También se ha reportado que la vacunación vía maíz funciona adecuadamente ante el desafío con NDV de alta virulencia, aunque en menor grado si se compara con los métodos de vacunación tradicionales (Tadesse et al., 2014). Al comparar los títulos obtenidos empleando maíz *versus* agua de bebida al día 7 post-vacunación esta última produjo una respuesta humoral más alta, pero a los 14 y 21 días post-vacunación pese a que hubo un incremento en el nivel de anticuerpos en la vía maíz este no fue estadísticamente significativo, por lo que la respuesta obtenida por ambos métodos fue la misma. Esto puede estar relacionado con el vehículo usado, ya que según Muir et al. 2000

es indispensable que el antígeno pueda ser tomado fácilmente por las células intestinales especializadas e iniciar la presentación antigénica. A la luz del proceso digestivo, la absorción del agua se produce más rápido comparada con la del maíz, lo cual puede ser la causa de la respuesta inicial rápida observada en los resultados de serología del grupo vacunado a través del agua de bebida ya que en este caso el antígeno se podría estar moviendo de forma directa a través de los enterocitos (Mayer y Shlien, 1987). Por su parte, la respuesta de anticuerpos dada por la aplicación de vacuna en maíz fue 7 días más tardía. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, probablemente la carga antigénica en el maíz no fue la suficiente para estimular el tejido linfoide asociado a intestino (GALT) producto de dilución de la vacuna en el maíz, o por la acción de inhibidores virales como lo ha reportado Samuel et al. 1993.

Se evidenció que la vía ocular generó títulos más altos comparado con el agua, pero no hubo diferencias significativas en los títulos de anticuerpos a los 14 y 21 días post-vacunación al vacunar por medio del agua o por vía ocular. Esta observación está de acuerdo con lo reportado por Vrdoljak, 2017, Mebrahtu et al. 2018 y Thekiso et al. 2004 quienes obtuvieron títulos sin diferencias estadísticas al usar estas dos vías de administración en aves con ausencia de anticuerpos maternos.

Los niveles de anticuerpos generados por la aplicación de la gota en el ojo se mantuvieron por encima de los títulos obtenidos con las otras rutas de administración, aunque no mostraron diferencias estadísticas significativas durante los tres días de evaluación. Este hallazgo también fue reportado por Wedgan et al. 2015 quienes encontraron que la aplicación de una vacuna de NDV a través de gota en el ojo produce elevados títulos de anticuerpos, con lo cual se infiere que la vía ocular es ideal para generar una adecuada protección ya que la inoculación del virus vacunal se hace por la ruta natural de ingreso del virus de campo.

Aunque se determinó la dinámica inicial de la respuesta serológica, no se pudo determinar con exactitud la duración del pico de los anticuerpos antes de aplicar el refuerzo ya que la revacunación tuvo lugar antes de observar la caída natural de los títulos luego de la primera dosis. Es probable que al manejar un esquema como el del presente estudio los títulos obtenidos puedan durar de 3 a 4 semanas en promedio. Fentie et al. 2014 evidenciaron que luego de vacunar con cepas del NDV, los títulos de anticuerpos incrementan

exponencialmente y alcanzan un umbral a la tercera semana con posterior descenso hacia la cuarta semana; así mismo, Owolodun y Ajiboye, 1975 reportaron que la aplicación de vacunas en agua de bebida estimula la producción de anticuerpos que duran en pico al menos 4 semanas, aunque se requieren futuros experimentos que determinen la duración estimada de la inmunidad humoral cuando se usa la vía alimento antes de optar por la revacunación de las aves. Así mismo, es necesario que futuros estudios incluyan un desafío de las aves vacunadas con virus de campo para determinar si los niveles de anticuerpos aquí obtenidos son protectivos.

Los títulos más altos obtenidos por la vía oral a través del maíz se consiguieron a los 14 días de haber aplicado la primera dosis. Wambura y Wilson, 2009 reportaron resultados similares luego de vacunar palomas contra el NDV a través del alimento en donde el inicio de la respuesta serológica demoró hasta el día 14 post-vacunación y a partir de allí incrementó. Puede que al mezclar la vacuna con el vehículo no todo el volumen de alimento usado quede totalmente cubierto con el biológico, por lo que algunos animales podrían consumir raciones de maíz puro y en consecuencia no generen la respuesta esperada, por lo que la cantidad de vacuna adicionada por gramo de alimento y la correcta homogenización de la mezcla podrían tenerse en cuenta como puntos críticos del proceso, aunque también es importante mencionar que no todas las aves ingieren la dosis exacta como se presume debido a la dominancia dentro del grupo. La excreción del virus vacunal al ambiente evidenciada en el presente estudio pudo haber influido en este incremento, donde las aves que no consumieron la dosis directamente pudieron haber adquirido por contacto con los individuos vacunados, permitiendo de esta forma la generación de títulos en más individuos dentro de la población (Fentie et al, 2014; Shrestha et al., 2017).

La excreción de virus de campo en aves vacunadas y no vacunadas ha sido reportada en estudios que han evaluado la efectividad de nuevas vacunas o nuevos protocolos de inmunización (Cárdenas et al., 2015; Córnaux et al., 2012; Tatár-kis., et al 2021); sin embargo, son pocos los estudios que han revisado la excreción exclusiva del virus vacunal. Al día 0 la excreción fue negativa tanto en individuos vacunados como no vacunados, lo cual corroboró que las aves no habían tenido contacto previo con virus vacunal o de campo. Durante los días 2 y 4 post-vacunación la excreción cloacal fue evidente en los grupos que recibieron el biológico vía ocular y oral.

Debido a que en el presente estudio se empleó un virus apatógeno en la vacunación, se esperaba que éste se replicara en los tejidos y posteriormente fuera excretado al culminar el proceso de infección tal como lo haría un virus de campo. La excreción viral en aves vacunadas a través de hisopos cloacales ha sido revisada por Cárdenas et al. 2012 encontrando que al día 2 y 4 la salida del virus tiene lugar; lo cual también fue observado en el presente estudio. Sedeik et al. 2019 mencionan que esta excreción sucede por periodos de tiempo más prolongados al compararlos con los evaluados en el presente estudio. De igual manera, Fentie et al. 2014 reportaron que la excreción viral puede detectarse entre 3 a 21 días post-desafío y puede transmitirse a otras aves. Estas diferencias entre los días en que ocurre la excreción pueden ser consecuencia de la virulencia del NDV, ya que cepas más agresivas (de campo) tienden a replicarse más rápido que un virus de baja patogenicidad (cepas vacunales), razón por la cual su excreción podría iniciar temprano en el curso de la infección y durar más tiempo.

El rol del IFN- γ en la respuesta contra el NDV ha sido exaltada por su efecto inmunomodulador de la respuesta celular y la depuración del virus (Susta, 2013). El presente estudio mostró que la vacunación con la cepa VH por diferentes vías de administración activa la expresión génica de esta molécula. La expresión en los grupos vacunados tanto por vía oral como por vía ocular fue inicialmente baja y posteriormente incrementó con el paso del tiempo. Un patrón de expresión similar de este tipo de interferón ha sido previamente reportado en respuesta a la infección con cepas lentogénicas donde los transcritos de IFN- γ se mantienen en niveles bajos durante los primeros 3 días (Liu et al., 2011). De acuerdo con Liu et al. 2011 una carga viral elevada de NDV lentogénico se logra aproximadamente a los 10 días post-infección en la sangre y el pico de producción del IFN- γ se obtiene a los 7 días, es decir tres días antes del pico de viremia; de acuerdo con esto, es posible que la baja producción del interferón a los 2 días post-vacunación obtenida en el presente estudio haya sido debida a que la cepa VH aún no había replicado lo suficiente en el bazo para estimular una alta producción local de la molécula.

La expresión del interferón comenzó a elevarse al día 4 post-vacunación en todos los grupos vacunados. Este hallazgo es similar con lo reportado por Rohollahzadeh et al. 2018 quienes observaron un incremento de IFN- γ 3 días después de utilizar vacunas vivas contra NDV, resaltando su efecto antiviral temprano en el curso de la invasión del virus; sin

embargo, difiere con respecto a lo reportado por Rue et al. 2011 y por Zhang et al. 2019 en cuyos estudios se menciona que una fuerte respuesta transcripcional de genes de interferón ocurre en las primeras horas de la infección por NDV. Una posible explicación para estas diferencias recae en el tipo de cepa implicada. Los virus de alta virulencia provocan la estimulación de la respuesta inmune innata de forma más abrupta comparado con las cepas lentogénicas, ya que se replican mucho más rápido alcanzando cargas virales elevadas en los órganos blanco durante estadíos tempranos de infección (Rue et al., 2011). Con base en lo anterior, teniendo en cuenta que la cepa VH es un virus lentogénico, es posible que su replicación tome un poco más de tiempo en generar el estímulo para activar la producción de moléculas de la inmunidad innata, tal como se observó en el presente estudio.

Shilpa et al. 2014 reportaron que la expresión de IFN- γ puede incrementar hacia el día 14 post-vacunación hasta 12 veces cuando se aplican vacunas contra NDV por vía oral, por lo que se podría pensar que la expresión observada al cuarto día en el experimento podría elevarse aún más en días posteriores. Lo anterior abre la posibilidad a futuros estudios que determinen la dinámica del interferón en el tiempo tras la vacunación.

Las aves vacunadas a través del agua de bebida expresaron seis veces más IFN- γ versus el control, siendo de hecho el grupo con la mayor expresión del gen comparado con los otros grupos. Este hallazgo presenta relación con lo reportado por Shilpa et al. 2014 quienes reportaron que la aplicación de una vacuna viva de NDV vía oral mostró la más alta expresión de este gen en comparación con otras vías de administración. Así mismo, obtuvo una expresión de hasta cuatro veces por encima del control al instilar la vacuna en el ojo, resultado que fue similar al obtenido en el presente estudio en el grupo vacunado por la misma vía. La expresión del interferón fue similar entre los grupos inmunizados vía maíz y vía ocular, hecho que soporta el uso de la vía oral como alternativa para la vacunación contra el NDV.

Zhang et al. 2019 señalaron que las citoquinas tienen un rol clave en la regulación de la respuesta inmune, por tanto, la expresión de estas moléculas es un buen indicador de la respuesta inmune contra virus. En el presente estudio se evaluó la expresión relativa de IL-6 tanto al día 2 como al día 4 post-vacunación. Esta citoquina se expresó en todos los

grupos vacunados de manera temprana, lo cual también ha sido reportado por Naggar et al. 2017 quienes usaron qPCR para caracterizar la respuesta inmune innata luego de vacunar con NDV. La regulación temprana de esta IL en los grupos experimentales del presente estudio fue un hallazgo positivo debido a que su producción temprana tras la vacunación es importante para configurar una respuesta inmune de tipo celular.

Se observó que los índices de peso de bursa y bazo no se afectaron por la vacunación con cepa VH en este experimento, lo cual era de esperarse ya que se utilizó un virus lentogénico que por naturaleza es poco patógeno (Aldous y Alexander, 2001; Alexander, 2000). Los análisis de morfometría de los órganos mencionados mostraron poca variación en el tiempo sin diferencias significativas entre los tratamientos aun después de la segunda dosis de vacuna. Estos resultados concuerdan con Igwe et al. 2019 quienes también midieron estos mismos índices en pollos y pollonas al cuarto día post-vacunación y no reportaron diferencias estadísticas entre animales vacunados y no vacunados. Los valores de los índices morfométricos obtenidos en el presente estudio fueron similares a los reportados por Martínez et al. 2018, luego de emplear un protocolo de dos dosis de cepa lentogénica de NDV con intervalo entre dosis similar al del presente estudio sin diferencias durante los primeros días post-vacunación.

La presencia de heces líquidas color verde en un alto porcentaje de corrales fue característica de los grupos vacunados vía oral, mientras que la congestión de mucosa ocular fue típica en aves vacunadas por instilación de gota en el ojo. Estos hallazgos son consistentes con la replicación del virus vacunal en el tejido según la vía de administración y por tanto fueron indicadores de que la aplicación de la vacuna se hizo de manera adecuada. Kapczynski y King, 2005 mencionan que las técnicas de vacunación deben caracterizarse por producir una inmunidad protectora con mínimas reacciones adversas en las aves. Aunque hubo reacciones post-vacunales los primeros seis días después del proceso de vacunación, es de destacar que no se observaron efectos adversos en las aves utilizadas en el presente estudio.

Al examen histopatológico de sistema respiratorio hubo diferencias en las lesiones encontradas en laringe y cornetes nasales en comparación con el grupo control negativo, pero el grado de lesión fue bajo. No se observaron cambios mayores en sistema digestivo y linfóide. Estos hallazgos estuvieron dentro de lo esperado ya que la cepa VH empleada

en el estudio es un NDV lentogénico. Particularmente, los resultados en bursa, timo y bazo están acorde con los hallazgos microscópicos realizados por Igwe et al. 2019 quienes reportaron que la estructura de estos tres órganos mantuvo una arquitectura normal luego de vacunar con virus de lentogénico de NDV. El hallazgo más representativo en tracto respiratorio y digestivo fue hiperemia e infiltración de células inflamatorias. Estos hallazgos indican que posiblemente los procesos de fagocitosis y presentación de antígeno se dieron de manera local activando la inmunidad adaptativa para inducir una respuesta específica, la cual se corroboró por la producción de anticuerpos en los grupos.

No se observaron diferencias entre los pesos de las aves vacunadas y no vacunadas durante todo el experimento, aunque luego del proceso de vacunación los pesos del grupo control negativo se mantuvieron numéricamente por encima de los grupos que recibieron vacuna, lo cual indica que el grupo control solo empleó la energía obtenida del alimento para su crecimiento y desarrollo de órganos, más no para la producción de inmunidad. Tampoco hubo diferencias en la conversión ni en el consumo de alimento, lo cual indicó que la vacunación por vía oral (maíz/agua) y ocular no afecta negativamente los parámetros zootécnicos. Estos hallazgos concuerdan con el seguimiento productivo realizado por Martínez et al. 2018 luego de la vacunación contra NDV en donde no se observó afectación del rendimiento de las aves.

Los indicadores de inmunidad que se midieron en este estudio evidenciaron que el uso de la cepa VH vía ocular y oral (agua y maíz) en machos de ponedora comercial es viable y genera una respuesta inmune innata inicial junto con la posterior producción de anticuerpos en condiciones experimentales. Es importante continuar con una siguiente etapa que confirme si esta inmunidad es protectora con el objetivo de que pueda ser aplicada en el futuro en condiciones de campo. El uso de esta cepa vacunal vía oral a través de maíz cocido superaría la dificultad de sujetar cada ave para la vacunación individual. El tiempo que toman las aves en consumir el alimento cargado con la vacuna fue similar a los resultados obtenidos en la evaluación de aceptabilidad de vehículos discutida en el capítulo anterior de este trabajo por lo que la vacuna no permaneció más allá de tiempo establecido en la fase *in-vitro* de este estudio a temperatura ambiente (1 hora) que pudiera influir sobre su viabilidad. El proceso de vacunación a través de la aplicación de gota en el ojo tomo menos tiempo que la vacunación oral, sin embargo, esto pudo deberse a la reducida

cantidad de animales usados por replica y a que permanecían confinados en jaulas, lo cual facilitó la captura de estos para vacunarlos de forma ágil. Los resultados de este estudio constituyen un aporte a las estrategias de vacunación masiva contra NDV en el país.

3.5 Bibliografía

- Abdi, R. D., Amsalu, K., Merera, O., Asfaw, Y., Gelaye, E., Yami, M., y Sori, T. (2016). Serological response and protection level evaluation in chickens exposed to grains coated with I2 Newcastle disease virus for effective oral vaccination of village chickens. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0785-6>
- Aldous, E. W., & Alexander, D. J. (2001). Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathology*, 30(2), 117–128. <https://doi.org/10.1080/03079450120044515>
- Alexander, D. J. (2000). Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 19(2), 443–462. <https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1231>
- Befus, A. D., Johnston, N., Leslie, G.A., Bienenstock, J. (1980). Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches. *The Journal of Immunology*, 125(6), 2626–2632. <https://www.jimmunol.org/content/125/6/2626.long>
- Cárdenas, S., Diel, D., Susta, L., Decanini, E., Yu, Q., Brown, C., Miller, P., Afonso. (2014). Development of an improved vaccine evaluation protocol to compare the efficacy of Newcastle disease vaccines. *Biologicals*, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2014.11.003>
- 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 Digest*, 7(3), e7–e8. <https://doi.org/10.1637/10222-1004312-digest.1>
- Dimitrov, K. M., Afonso, C. L., Yu, Q., y Miller, P. J. (2017). Newcastle disease vaccines—A solved problem or a continuous challenge? *Veterinary Microbiology*, 206, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.019>

- Fentie, T., Dadi, K., Kassa, T., Sahle, M., & Cattoli, G. (2014). Effect of vaccination on transmission characteristics of highly virulent Newcastle disease virus in experimentally infected chickens. *Avian Pathology*, 43(5), 420–426. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.951832>
- Hussein, E., Bejo, M.H, Adamu, L., Omar, A.R, Arshad, S.S, Awad, E.A y Aini, I. (2018). Scoring system for lesions induced by different strains of Newcastle disease virus in chicken *Veterinary Medicine International*. 18(1), 2-9 <https://doi.org/10.1155/2018/9296520>
- Igwe, A. O., Ihedioha, J. I., Eze, D. C., & Okoye, J. O. A. (2019). Pullets had higher bursal and thymic weight indices and more antibody response to La Sota vaccination than broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Veterinary Medicine and Science*, 1–8. <https://doi.org/10.1002/vms3.226>
- Jayawardane, G., y De Alwis, M., Bandara, D. (1990). Oral vaccination of chickens against Newcastle disease with V4 vaccine delivered on processed rice grains. *Australian Veterinary Journal*, 67(10), 2-10. <https://doi:10.1111/j.1751-0813.1990.tb07405.x>
- Kapczynski, D.R., Wise, M.G., and King, D.J. (2006). Susceptibility and protection of naïve and vaccinate racing pigeons (*Columba livia*) against exotic Newcastle Disease Virus from the California 2002–2003 outbreak. *Avian Diseases*, 50, 336–341 <https://10.1637/7479-112905R.1>.
- Martinez, J. C. S., Chou, W. K., Berghman, L. R., & Carey, J. B. (2018). Evaluation of the effect of live LaSota Newcastle disease virus vaccine as primary immunization on immune development in broilers. *Poultry Science*, 97(2), 455–462. <https://doi.org/10.3382/ps/pex339>
- Mayer, LL. y Shlien, R. (1987). Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *Journal of Experimental Medicine*, 166(5), 1471–1483. <https://doi.org/10.1084/jem.166.5.1471>
- Mebrahtu, K., Teshale, S., Esatu, W., Habte, T., & Gelaye, E. (2018). Evaluation of spray and oral delivery of Newcastle disease I2 vaccine in chicken reared by smallholder farmers in central Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1355-x>

- Muir, W.I., Bryden, W.L., Husband, A.J. (2000). Immunity, vaccination and avian intestinal tract. *Developmental and Comparative Immunology*, 24(2-3), 325–342. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(99\)00081-6](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(99)00081-6).
- Liu, W., Tian, M., Wang, Y., Zhao, Y., Zou, N., Zhao, F., Cao, S., Wen, X., Liu, P., Huang, Y. (2012). The different expression of immune related cytokine genes in response to velogenic and lentogenic Newcastle disease viruses infection in chicken peripheral blood. *Molecular Biology Reports*, 39(1), 3611–3618. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1135-1>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1135-1>
- Naggar H.M., Madkour M.S., Hussein H.A (2017). Preparation of mucosal nanoparticles and polymer-based inactivated vaccine for Newcastle disease and H9N2 AI viruses, *Veterinary World*, 10(2): 187-193. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.187-193>
- OIE. (2018). Enfermedad de Newcastle. In Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (Ed.), *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* (Octava). <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/enfermedad-de-newcastle/#E>
- Okechukwu, H., Chukwuedo, A., Eze, D., Igwe, A., Ihedioha, J., & Okoye, J. (2020). Triple La Sota re-vaccinations can protect laying chickens for 3 months against drop in egg production caused by velogenic viscerotropic Newcastle disease virus infection. *Veterinary Medicine and Science*, 6(3), 470-476. <https://doi.org/10.1002/vms3.241>
- Rohollahzadeh, H., Nili, H., Asasi, K., Mokhayeri, S., & Najjari, A. H. A. (2018). Respiratory and GIT tract immune responses of broiler chickens following experimental infection with Newcastle disease's virus. *Comparative Clinical Pathology*, 27(5), 1241–1255. <https://doi.org/10.1007/s00580-018-2728-z>
- Sedeik, M. E., Elbestawy, A. R., El-Shall, N. A., Abd El-Hack, M. E., Saadeldin, I. M., & Swelum, A. A. (2019). Comparative efficacy of commercial inactivated Newcastle disease virus vaccines against Newcastle disease virus genotype VII in broiler chickens. *Poultry Science*, 98(5), 2000–2007. <https://doi.org/10.3382/ps/pey559>
- Shilpa, P., Kirubaharan, J., Chandran, N., Gnanapriya, N. (2014). Assessment of cellular and mucosal immune responses in chicks to Newcastle disease oral pellet vaccine

(D58 strain) using. *VirusDisease*, 25(4), 467-473. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0230-z>

- Shrestha, S., Dhawan, M., Donadeu, M., & Dingu, B. (2017). Efficacy of vaccination with La Sota strain vaccine to control Newcastle disease in village chickens in Nepal. *Tropical Animal Health and Production*, 49(2)
- Susta, L., Cornax, I., Diel, D., Cardenas, S., Miller, P., Liu, X., Hu, S., Brown, C., Afonso, C. (2013). Expression of interferon gamma by a highly virulent strain of Newcastle disease virus decreases its pathogenicity in chickens. *Microbial Pathogenesis*, 61, 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2013.05.009>
- Tadesse, K., Woldie, B., Asfaw, Y., Tarekegn, T., Jorga, E., Leykun, E. (2014). Evaluation of oral vaccination of villagen chickens againts Newcastle disease with I-2 vaccine coated parboiled cracked maize in Ederta District, Tigray, Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*, 13(43), 4183-4187. **¡Error! Referencia de hipervínculo no válida.**
- Tantaswasdi, U., Danvivatanaporn, J., Siriwan, P., Chaisingh, A., Spradbrow, P. (1992). Evaluation of an oral Newcastle disease vaccine in Thailand. *Preventive Veterinary Medicine*, 12,(1) 87-94. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(92\)90071-M](https://doi.org/10.1016/0167-5877(92)90071-M)
- Tatár-kis, T., Fischer, A.J., Cazaban, C., Walkó-Kovács, E., Homonnay, Z.G., Velkers, F., Palya, V., Stegeman, J.A. (2021). A Herpesvirus of Turkey-Based vector Vaccine ReducesTransmissionof Newcastle Disease Virus in Commercial Broiler Chickens with Maternally Derived Antibodies. *Vaccines*, 8, 614. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040614>
- Thekiso, M., Mbat, P., Bisschop, S (2004). Different approaches to the vaccination of free ranging village chickens against Newcastle disease in Qwa-Qwa, South Africa. *Veterinary Microbiology*, 101 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.03.011>
- Vrdoljak, A., Halas, M., & Süli, T. (2017). Vaccination of broilers against Newcastle disease in the presence of maternally derived antibodies. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere - Nutztiere*, 45(3), 151–158. <https://doi.org/10.15653/TPG-160661>
- Wambura, P y Wilson, C. (2009). Protective antibody response following oral vaccination of feral pigeons (*Columba livia*) with Newcastle disease vaccine (strain I-2) coated on oiled rice. *Veterinary Research Communications*, 33(8), 921–926. <https://doi.org/10.1007/s11259-009-9309-1>

Wegdan, H., Mahasin, E., & Khalafalla, A. I. (2015). The Effect of Route of Administration and Dose on the Immunogenicity and Protective Efficacy of Newcastle Disease Thermostable Vaccine I 2 Strain. *International Journal of Preventive Medicine Research* 1(5), 276–281

Zhang, T., Ren, M., Liu, C., Xu, L., Wang, F., Han, Z., Shao, Y., & Ma, D. (2019). Comparative analysis of early immune responses induced by two strains of Newcastle disease virus in chickens. *MicrobiologyOpen*, 8(4), 1–10.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.701>

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

La revisión del estado del arte mostró que la información disponible sobre la aplicación de vacunas de NDV a través del alimento es escasa y antigua. La mayoría de las investigaciones ha probado la eficacia de esta vía de aplicación principalmente por evaluación de la respuesta serológica en aves experimentales sin complementar la información con otros indicadores de inmunidad.

La presente investigación corroboró que virus lentogénicos de NDV termosensibles como VH y La Sota solo pueden ser empleados por un tiempo máximo de una hora a temperatura ambiente para la vacunación en aves de traspatio. Las diferentes variaciones encontradas luego de la mezcla de estas vacunas con los granos evaluados en condiciones *in-vitro* genera la necesidad de hacer nuevos estudios que tengan en cuenta aspectos como la termo-estabilidad e inmunogenicidad de la cepa a emplear y su compatibilidad con el alimento que se escoja como vehículo.

La vía maíz estimuló la respuesta humoral y no mostró diferencias estadísticas significativas en los títulos con respecto a las otras vías de administración. Así mismo, la seroconversión obtenida tuvo lugar a los 15 días post-vacunación en todas las vías de estudio. De acuerdo con lo anterior, la aplicación de un virus vivo apatógeno del NDV a través del alimento mostró resultados serológicos comparables con las vías de aplicación convencionales bajo condiciones experimentales y requiere a futuro una valoración en campo para evaluar su eficiencia como un método de vacunación masiva bajo las particularidades de sistemas productivos a pequeña escala.

Independiente de la vía de administración se evidenció excreción viral a través de la cloaca a los 2 y 4 días post-vacunación. Aparentemente la excreción en animales vacunados vía maíz ocurre de manera tardía (solo hasta el día 4), pero coincidió con el inicio tardío de la respuesta de anticuerpos en este grupo.

Todas las vías de administración evaluadas generaron incremento de la expresión de genes de IL-6 e IFN- γ , aunque la expresión de este último fue más tardía. Estos resultados permitieron corroborar que la vacuna generó el proceso inflamatorio inicial esperado, el cual es importante para el posterior desarrollo de inmunidad adquirida.

Los bajos grados de lesión microscópica observados, la evaluación de la relación peso del animal *versus* peso de órganos linfoides junto con el grado y duración de las reacciones post-vacunales reflejan que la administración de vacuna por las vías de aplicación evaluadas es segura y no genera reacciones adversas que pongan en riesgo la salud de las aves.

Los resultados obtenidos de la vacunación con cepa VH vehiculizada en maíz cocido en este estudio constituyen un aporte a las estrategias de vacunación masiva de aves de traspatio contra el NDV en países donde la enfermedad es endémica.

4.2 Recomendaciones

La generación de anticuerpos por medio de las diferentes vías estudiadas se comprobó en esta investigación, no obstante, se recomienda realizar una segunda etapa que incluya el desafío de las aves con una cepa patógena para determinar el nivel de protección de la inmunidad obtenida en este estudio.

Se recomienda ampliar los intervalos de muestreo para la evaluación de expresión relativa e incluir otros genes de inmunidad innata adicionales a los utilizados en el presente estudio, lo que podría enriquecer la información sobre la configuración de la respuesta inmune inicial a la vacunación. En el caso de la excreción viral, debería incluirse un muestreo con una mayor frecuencia de toma de hisopos cloacales para tener un panorama más amplio sobre la dinámica de la excreción del virus vacunal en el tiempo.

Es necesario determinar la duración de los títulos de anticuerpos obtenidos luego de la primera dosis por vía maíz, con el fin de definir con claridad la necesidad de dosis de refuerzo y para establecer intervalos de tiempo adecuados entre la primera y segunda dosis.

Aunque la inmunidad mediada por anticuerpos es esencial ante la infección con el NDV, no se debe descartar la posible contribución de la inmunidad mediada por células en respuesta a la vacunación, por lo que la inclusión de técnicas como citometría de flujo o la inmunohistoquímica en futuras investigaciones podrían aportar información complementaria sobre las poblaciones celulares involucradas en la respuesta contra el virus vacunal.

Estudios posteriores deberían contemplar la evaluación de la resistencia a elevadas temperaturas de diferentes cepas vacunales y reevaluar las características termoestables de algunos virus vacunales comúnmente empleados para el control del NDV, así como la postulación de nuevas cepas candidatas a ser usadas para vacunación. Para cepas termosensibles, es necesario el desarrollo de una plataforma versátil de estabilización térmica para mejorar su resistencia fuera de la cadena de frío.

La evaluación e inclusión de nuevos ingredientes como vehículos de la vacuna podría ampliar la gama de posibilidades para no depender de un solo alimento en particular. Los ingredientes deberán cumplir con criterios como la fácil adquisición y preparación.

Todas las vías de administración evaluadas en el presente estudio estimularon la respuesta inmune en las aves. Es recomendable que, en caso de replicar este trabajo bajo condiciones de campo, la aplicación de la vacuna en predios muy numerosos sin confinar (por encima de 50 animales) se haga a través de métodos de vacunación masiva como el agua de bebida o el alimento. En caso de que el número de aves sea reducido en el predio, la administración de la vacuna por vía ocular puede ser utilizada.

A. Anexo: Aval del comité de bioética

Comité de Bioética
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Sede Bogotá



Bogotá D.C, agosto 20 de 2020

[CB-FMVZ-UN-021-2020]

Doctora
DIANA MARCELA ALVAREZ MIRA
Investigadora principal

Apreciada doctora:

Amablemente les comunico que el Comité de Bioética en sesión extraordinaria, Acta 07 de 2020, luego de la revisión de la documentación al siguiente proyecto, acordó emitir el respectivo concepto, así:

Proyecto	EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE GENERADA POR UNA VACUNA ADMINISTRADA A TRAVÉS DEL ALIMENTO PARA EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE
Responsables del proyecto	Investigadora Principal: Diana Marcela Álvarez Mira Estudiante: Nicolás Upegui Porras/Maestría en Salud Animal
Concepto	AVALADO

Es importante tener en cuenta que **este concepto sólo aplica para los procedimientos en las condiciones y con las características indicadas en el formato final y documentos presentados**. El investigador deberá informar sobre cualquier cambio que se proponga incluir y que esté relacionado con la ubicación, el cuidado y bienestar de los animales, estas modificaciones no podrán ejecutarse sin el aval previo del Comité; así mismo, se debe dar aviso sobre cualquier situación imprevista que se considere implique algún riesgo para los animales o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.

Cordialmente,

LUCÍA BOTERO ESPINOSA
Coordinadora Comité de Bioética