

Eficacia de una vacuna vectorizada para el control de la enfermedad de Newcastle aplicada en pollitos BB en planta de incubación

Efficacy of a vectorized vaccine for the control of Newcastle Disease applied in chicks in the hatchery

Mercedes Sialer G.^{1,3}, Eliana Icochea D'A.¹, Armando E. González Z.²

RESUMEN

El presente estudio evaluó la eficacia de una vacuna vectorizada contra el virus de la enfermedad de Newcastle (vENC) aplicada en planta de incubación. Dosecientos pollitos BB fueron distribuidos en cuatro grupos experimentales de vacunación contra vENC: T1: Vacuna viva atenuada + vacuna inactivada, T2: Vacuna viva atenuada, T3: Vacuna viva atenuada + vacuna vectorizada, T4: Grupo control no vacunado. Todas las aves fueron, además, vacunadas contra el virus de Bronquitis infecciosa, Marek y Gumboro el día 1. Las aves fueron desafiadas el día 26 con una cepa velogénica de campo altamente patógena. Se evaluó la mortalidad, signos clínicos pos-desafío, lesiones en la necropsia y respuesta de anticuerpos contra vENC. Las aves vacunadas con la vacuna vectorizada de vENC presentaron una menor mortalidad (2%) en comparación a las aves vacunadas con cepas vivas atenuadas (12.5% para T1 y 18.4% para T2, respectivamente; $p < 0.05$). Asimismo, menor porcentaje de manifestaciones clínicas pos-desafío ($p < 0.05$) y de lesiones en órganos a la necropsia. Los resultados indican un mejor efecto protector mediante el uso de la vacuna vectorizada y su uso potencial para el control de vENC en condiciones de campo.

Palabras clave: enfermedad de Newcastle, vacuna vectorizada, cepa velogénica

¹ Laboratorio de Patología Aviar, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Laboratorio de Epidemiología y Economía Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ Email: msialer20@gmail.com

Recibido: 24 de mayo de 2019

Aceptado para publicación: 22 de febrero de 2020

Publicado: 22 de junio de 2020

ABSTRACT

The present study evaluated the efficacy of a vectorized vaccine against Newcastle disease virus (vENC) applied in the hatchery. Two hundred one-day-old chicks were distributed in four experimental vaccination groups against vENC: T1: Live attenuated vaccine + inactivated vaccine, T2: Live attenuated vaccine, T3: Live attenuated vaccine + vectorized vaccine, T4: Unvaccinated control group. All chicks were also vaccinated against infectious bronchitis, Marek and Gumboro viruses at day 1. The birds were challenged on the day 26 with a highly pathogenic field pathogenic strain. Mortality, post-challenge clinical signs, necropsy lesions and antibody response against vENC were evaluated. Chicks vaccinated with the vENC vectorized vaccine had a lower mortality (2%) compared to birds vaccinated with live attenuated strains (12.5% for T1 and 18.4% for T2 respectively; $p < 0.05$). Likewise, a lower percentage of post-challenge clinical manifestations ($p < 0.05$) and of lesions in organs at necropsy. The results indicate a better protective effect using the vectorized vaccine and its potential use for the control of vENC under field conditions.

Key words: Newcastle disease, vectorized vaccine, velogenic strain

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle (ENC) es producida por un Paramyxovirus aviar tipo 1, perteneciente a la subfamilia Paramyxovirinae del género *Avulavirus* (Lamb *et al.*, 2000; Mayo, 2002). La ENC se encuentra globalmente presente (Nolen, 2002; Abolnik *et al.*, 2004; Pedersen *et al.*, 2004), y ocasiona pérdidas significativas por la mortalidad y sacrificio sanitario de aves (Bogoyavlensky *et al.*, 2009). El virus de ENC (vENC). Por ello, la ENC se encuentra incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria a la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) (Alexander, 2008).

El vENC afecta a la mayoría de las especies aviarias (Alexander, 2008). El vENC se replica en el tracto respiratorio, mucosas oculares y tracto digestivo, con un periodo de 2 a 15 días, dependiendo de la cepa viral (Miller *et al.*, 2010). Los signos clínicos pueden ser respiratorios, nerviosos o generales, dependiendo de la virulencia de la cepa, edad

del hospedador, estrés ambiental y estado inmunológico, entre otros (Alexander, 2008). Según su patogenicidad, las cepas de vENC pueden clasificarse en velogénicas, mesogénicas, lentogénicas y entéricas-asintomáticas, siendo los brotes más agresivos y de alta mortalidad aquellos relacionados a cepas velogénicas (viscerotrópicas o neurotrópicas) (Miller *et al.*, 2010).

En el Perú, el vENC es endémico, afectando no solo a la industria aviar tecnificada, sino además a crianzas informales, por lo que las estrategias para el control de vENC rebasan la capacidad de los productores comerciales. El control del vENC se basa principalmente en las buenas prácticas de bioseguridad en combinación con la vacunación preventiva y eliminación de lotes infectados (Bermudez y Stewart-Brown, 2003). Las vacunas a virus vivo con cepas atenuadas ocasionan una respuesta inmunológica similar a las cepas patógenas sin producir mayores alteraciones clínicas, en tanto que las vacunas inactivadas contienen cepas reactivas, pero inactivadas con agentes químicos, radiación o calor y únicamente produ-

cen una respuesta humoral (Gallili y Ben-Nathan, 1998). Estas vacunas reducen la sintomatología clínica pos-desafío, pero no son 100% protectoras, dado que no detienen la infección ni la excreción viral. Asimismo, la vacunación requiere de varias dosis, lo que puede generar estrés y problemas sanitarios en las aves (Kapczynsky *et al.*, 2013).

El desarrollo biotecnológico ha llevado al uso de vacunas vectorizadas, las cuales han sido incorporadas a la lista de vacunas contra vENC debido a las ventajas que poseen sobre las vacunas convencionales. La mayoría de las vacunas vectorizadas contra ENC se basan en la inserción de la secuencia génica de la proteína de fusión (F) del vENC en un vector viral como, por ejemplo, Herpesvirus de Pavo (HVT), en el cual se pueden mutar o borrar secuencias de su genoma viral sin debilitar o alterar las funciones necesarias del virus para su replicación (Post y Roizman, 1981; Shih *et al.*, 1984; Lowe *et al.*, 1987). Entre las ventajas de este tipo de vacunas se encuentra la inducción de una inmunidad duradera, debido a la latencia del vector en el hospedador de no interferir con la presencia de anticuerpos maternos y de producir una reducción en la cantidad de virus eliminado por las aves (Palya *et al.*, 2012, 2014), por lo que su aplicación reduciría considerablemente la transmisión horizontal entre las aves. Por todo ello, presente estudio evaluó la eficacia de una vacuna vectorizada contra vENC aplicada en planta de incubación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y Fecha de Estudio

La fase experimental del estudio se realizó en los módulos de crianza controlada y las necropsias y pruebas serológicas en el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM), ubicados en Lima, Perú. La fase

experimental se realizó en marzo y abril de 2012 y tuvo una duración de 42 días.

Diseño Experimental

Se conformaron cuatro grupos experimentales correspondientes a los siguientes programas de vacunación contra vENC: T1: Vacuna viva atenuada + vacuna inactivada, T2: Vacuna viva atenuada, T3: Vacuna viva atenuada + vacuna vectorizada, T4: Grupo control no vacunado.

Todas las vacunaciones contra vENC en las aves de los grupos T1, T2 y T3 se realizaron en la planta de incubación al primer día de edad. La vacuna vectorizada (Laboratorios CEVA) en las aves de T3 consistió en la secuencia génica de la proteína F (cepa lentogénica D26) insertada en el vector HVT (cepa FC 126 Witter-bajo pasaje), mientras que la vacuna viva atenuada en las aves de T1 y T2 consistió en una cepa enterotrópica (Villegas Glisson/University of Georgia en T1 y Phy LMV42 en T2). Ese mismo día las aves de los cuatro grupos fueron vacunadas contra los virus de Bronquitis Infecciosa (cepa H120), de Enfermedad de Marek (cepa HTV) y de Gumboro. Los grupos T1 y T2 recibieron adicionalmente una vacuna viva atenuada contra vENC a los 9 días.

Animales y Tamaño Muestral

Se utilizaron 200 pollitos BB de la línea Ross, procedentes de una granja tecnificada al sur de Lima. Las aves fueron aleatoriamente distribuidas en los cuatro grupos (n=50 aves por grupo). El tamaño muestral consideró una diferencia mínima esperada no menos de 30% de porcentaje de mortalidad de las aves que recibieron la vacuna vectorizada (T3) y de las aves que recibieron la vacuna viva atenuada (T1 y T2), con una potencia estadística de 90% y un nivel de significancia de 5% para una prueba de 2 colas.

Crianza Experimental

Las aves fueron instaladas en los módulos de crianza controlada por un periodo de 42 días bajo alimentación con una formulación comercial para pollos de engorde y agua *ad libitum*. Los grupos experimentales estuvieron conformados por cinco repeticiones de 10 aves cada uno, los cuales estuvieron en corrales contiguos separados por mallas metálicas.

El día 26 del estudio se realizó el desafío viral en todas las aves mediante la aplicación ocular de 60 μ l de un inóculo conteniendo un virus patógeno de vENC con un título de $10^{7.8}$ DIE 50 correspondiente a una cepa velogénica Genotipo XII, clase II, IPIC 1.82, aislada de un pavo real.

Parámetros de Evaluación

- Se registró la presencia de estornudos y ronqueras posterior a la vacunación en las aves de forma diaria hasta el día 21 del estudio.
- Se registró la presencia de signos clínicos en los días 4, 6 y 12 pos-desafío viral y se tomó en cuenta los cuadros de depresión, diarrea, signos respiratorios (ronqueras) y signos nerviosos, según las recomendaciones del OIE (Alexander, 2008).
- Se realizó la necropsia a las aves muertas y se describieron las principales lesiones halladas en el proventrículo, molleja, intestinos, tonsilas cecales y bazo.
- Se tomaron muestras de sangre de 15 aves de cada grupo experimental el día 42 del estudio para determinar los títulos de anticuerpos contra vENC mediante un kit de ELISA comercial (Laboratorios IDEXX).
- Se registró la mortalidad de las aves desde el pos-desafío (día 26) hasta el día 42 del estudio.

Análisis Estadístico

Las frecuencias de las reacciones pos-vacunales de cada grupo experimental fueron evaluadas mediante la prueba no

paramétrica de Kruskal Wallis. Se determinó el número total de aves muertas pos-desafío y los porcentajes de mortalidad acumulada (número de aves muertas/total de aves al inicio del desafío) entre grupos vacunales (T1, T2 y T3) fueron comparados mediante una ecuación de regresión logística para el cálculo de Odds Ratio (OR) y los intervalos de confianza al 95%.

La presencia de signos clínicos durante los días 4, 6 y 12 pos-desafío fue presentada utilizando frecuencias absolutas y relativas y comparadas entre los grupos vacunales mediante la prueba de Fisher Exacta. Los títulos de anticuerpos medidos en ELISA fueron reportados utilizando media aritmética, media geométrica, coeficiente de variación y valores mínimo y máximo para cada grupo experimental. Todos los análisis fueron realizados con el programa estadístico RStudio v. 1.0.143. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Consideraciones Éticas

Todos los procedimientos descritos en el presente estudio fueron previamente aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la FMV-UNMSM.

RESULTADOS

Reacciones Pos-vacunales

Las reacciones pos-vacunales se presentaron a partir del día 5, siendo más altas entre los días 9 y 12 (entre 55 y 65% de aves afectadas) y dejaron de aparecer a partir del día 18, sin diferencias significativas entre los grupos vacunados ($p=0.438$). No se observó reacción alguna en el grupo control no vacunado.

Mortalidad Pos-desafío

Dos aves de T1 y un ave de T2 murieron previo al desafío. Las aves de los grupos que recibieron vacunas vivas atenuadas (T1 y T2) presentaron los porcentajes de mortali-

dad más altos (12.5 y 18.4%, respectivamente) en comparación con las aves que recibieron la vacuna vectorizada de vENC (2%). Todas las aves del grupo control (T4) murieron luego del desafío (Cuadro 1).

El análisis de regresión logística demostró un efecto protector sobre la mortalidad en las aves con la vacuna vectorizada (T3) en comparación a las aves de T1 (OR: 0.14, IC 95%: 0.02-1.23, $p=0.077$) y las aves de T2 (OR: 0.09, IC 95%: 0.01-0.75, $p=0.030$). Las mortalidades acumuladas entre las aves de T2 y T1 no fueron estadísticamente diferentes ($p=0.427$).

Signos Clínicos Pos-desafío

La depresión se manifestó principalmente en las aves del grupo T2 al día 4 y 6 pos-desafío (16.3 y 14.9%, respectivamente). No se observaron signos de depresión al día 12 del desafío. La presencia de diarrea se observó igualmente durante los días 4 y 6 pos-desafío, siendo más alta en las aves de T2 (14.3 y 44.7%, respectivamente) y menor en las aves que recibieron la vacuna vectorizada (2.0 y 8.0%, respectivamente), habiendo diferencias significativas entre grupos en el día 6 ($p=0.001$; Cuadro 2).

Las ronqueras se presentaron a partir del día 4 pos-desafío en los tres grupos vacunales, siendo más alta en el día 6 del desafío en las aves de T1 y T2 (61.7 y 57.5%, respectivamente) que en el grupo con la vacuna vectorizada (28.0%) ($p=0.001$). Secuelas neurológicas solo se observaron en el día 12 pos-desafío y en baja frecuencia (Cuadro 2), sin diferencias significativas entre grupos.

Lesiones Pos-desafío

En las aves del grupo control no vacunado se observaron zonas de hemorragia difusa o severa en proventrículo, molleja, intestino y tonsilas, así como congestión del bazo y esplenomegalia (Figura 1). En las aves de T1 y T2 (vacunas vivas atenuadas) se presentaron focos de hemorragia leve a severa

en el proventrículo, agregados linfoides en intestino, tonsilas y esplenomegalia, mientras que en las aves T3 (vacuna vectorizadas) se observaron focos hemorrágicos en tonsilas cecales, pero no se observaron hemorragias en proventrículo o intestino (Figura 2).

Títulos de Anticuerpos

Los títulos de anticuerpos contra el vENC en el día 42 (16 pos-desafío) fueron más altos en las aves con las vacunas vivas atenuadas (T2: 9037 y T: 7811) en comparación a las aves que recibieron la vacuna vectorizada (T3: 4280), habiendo diferencias significativas entre T1 y T3 ($p=0.018$) y entre T2 y T3 ($p=0.001$ (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

Las cepas velogénicas del vENC constituyen una amenaza importante para la industria avícola, ocasionando hasta 100% de mortalidad en aves sin inmunidad (Alexander, 1995; Miller y Koch, 2013). La vacunación y bioseguridad constituyen las principales herramientas para el control de vENC, aunque la aparición de brotes recurrentes de enfermedad puede indicar fallas en los programas de vacunación (Alexander, 2008). Diversos factores y condiciones inmunosupresoras, así como la virulencia de las cepas actuales circulantes pueden afectar la calidad de la vacunación en campo (Perozo *et al.*, 2008; Rauw *et al.*, 2010). Por ello, la avicultura moderna busca que los sistemas de vacunación se realicen en planta de incubación, donde el proceso es controlado y exento de condiciones medioambientales desfavorables (Palya *et al.*, 2012). Los resultados del estudio sugieren que el uso combinado de una vacuna vectorizada y una vacuna viva atenuada contra vENC aplicada en pollos de un día de edad proporciona altos niveles de protección contra mortalidad y signos clínicos luego del desafío viral, por lo que puede proporcionar una alternativa para el control de la ENC en campo.

Cuadro 1. Porcentajes de mortalidad acumulada en aves y el Odds ratio de la comparación de la mortalidad acumulada en aves según los programas de vacunación contra la enfermedad de Newcastle

Grupos ¹	Muertos/ Total (n)	Mortalidad acumulada (%)	Odds ratio	Intervalo de confianza 95%	<i>p</i> valor
T1	6/48	12.5	Ref.		
T2	9/49	18.4	1.58	0.51-4.83	0.427
T3	1/50	2.0	0.14	0.02-1.23	0.077
T4	50/50	100.0	-	-	-

¹ T1: vacuna viva atenuada + vacuna inactivada; T2: vacuna viva atenuada; T3: vacuna viva atenuada + vacuna vectorizada; T4: control no vacunado

Cuadro 2. Signos clínicos (%) pos-desafío viral en aves según el programa de vacunación contra la enfermedad de Newcastle

	Días pos- desafío	Vacuna viva atenuada + vacuna inactivada (T1)		Vacunas vivas atenuadas (T2)		Vacuna viva atenuada + vacuna vectorizada (T3)	
		n	%	n	%	n	%
Depresión	Día 4	0/48	0.0 ^A	8/49	16.3 ^B	2/50	4.0 ^A
	Día 6	3/47	3.4 ^{AB}	7/47	14.9 ^A	1/50	2.0 ^B
	Día 12	0/42	0.0 ^A	0/40	0.0 ^A	0/49	0.0 ^A
Diarrea	Día 4	3/48	6.3 ^{AB}	7/49	14.3 ^A	1/50	2.0 ^B
	Día 6	5/47	10.6 ^A	21/47	44.7 ^B	4/50	8.0 ^A
	Día 12	0/42	0.0 ^A	0/40	0.0 ^A	0/49	0.0 ^A
Ronquera	Día 4	3/48	6.3 ^A	4/49	8.2 ^A	15/50	30.0 ^B
	Día 6	29/47	61.7 ^A	27/47	57.5 ^A	14/50	28.0 ^B
	Día 12	0/42	0.0 ^A	0/40	0.0 ^A	0/49	0.0 ^A
Secuelas neurológicas	Día 4	0/48	0.0 ^A	0/49	0.0 ^A	0/50	0.0 ^A
	Día 6	0/47	0.0 ^A	0/47	0.0 ^A	0/50	0.0 ^A
	Día 12	3/42	7.1	2/40	5.0	3/49	6.1

^{A,B} Superíndices diferentes indican diferencias estadísticas entre grupos vacunales ($p < 0.05$)

Las reacciones pos-vacunales se presentaron en todas las aves de los grupos vacunados a partir del día 5; posiblemente a las vacunas vivas atenuadas, debido a que producen cierto grado de replicación en el tracto

respiratorio y/o intestinal (Perozo *et al.*, 2008). El uso de cepas lentogénicas de baja virulencia como B1 y La Sota induce buena protección si son administradas correctamente, aunque tienden a producir reacciones pos-



Figura 1. Severa hemorragia difusa en proventrículo (A) y tonsila cecal (B) en aves del grupo control no vacunado (T4) al día 5 pos-desafío viral

vacunales, especialmente bajo condiciones medioambientales adversas (Alexander, 2001). No obstante, las reacciones observadas podrían deberse, además, al efecto de las otras vacunas que fueron administradas. Por otro lado, si bien es posible que ciertas reacciones pos-vacunales pueden afectar los parámetros productivos (no evaluado en este

estudio), el alto nivel de protección producido por la adición de la vacuna vectorizada en el esquema de vacunación contra vENC (cerca a 98%) proporciona un beneficio de mayor impacto para la crianza.

Los niveles de protección de la vacuna vectorizada de vENC fueron altos y similares a los reportados en otros estudios. Así, Esaki *et al.* (2013), utilizaron la vacuna vectorizada HTV/ND (genotipo I) y desafiando a las aves con la cepa Texas GB (genotipo II) tuvieron porcentajes de protección de 90%. La mortalidad en las aves que recibieron la vacuna vectorizada fue de 2% y, además, la más tardía en iniciarse (día 12 pos-desafío), aun cuando la cepa de desafío era de un genotipo diferente al de la cepa vacunal. Esto demuestra que pese a la distancia filogenética entre el gen F del vENC insertado en el vector HTV y el virus de desafío (genotipos I y V, respectivamente), la vacuna vectorizada de vENC proporcionó una buena protección clínica. Todas las cepas del vENC pertenecen a un solo serotipo, por lo que cualquier cepa se puede utilizar como vacuna y todas deberían prevenir los signos clínicos y la mortalidad por vENC. No obs-

Cuadro 3. Títulos de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle (vENC) en aves al día 42 de edad (16 pos-desafío) según el programa de vacunación

	T1 (vacuna viva atenuada + vacuna inactivada)	T2 (vacunas vivas atenuadas)	T3 (vacuna viva atenuada + vacuna vectorizada)
Media aritmética	7811 ^A	9037 ^A	4280 ^B
Media geométrica	6345	8402	2921
Coefficiente de variación (CV %)	55.1	30.7	77.5
Mínimo	1380	1089	399
Máximo	15193	14262	12617

^{A,B} Superíndices diferentes entre grupos experimentales indican diferencias estadísticas significativas (p<0.05)

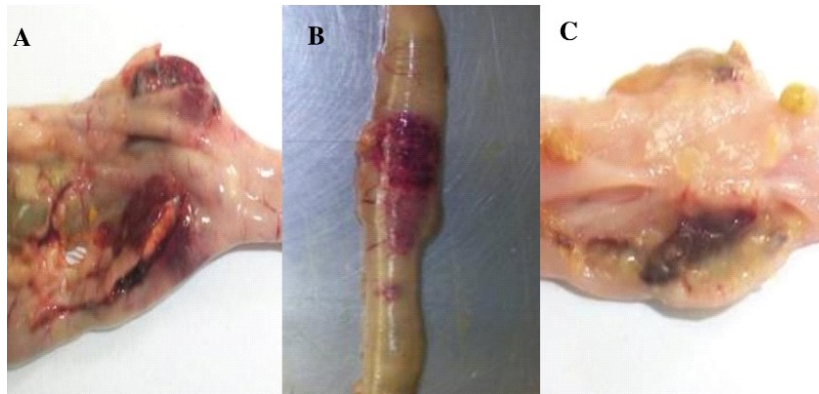


Figura 2. Hemorragias en tonsilas cecales (A) y agregados linfoides (B) de aves del grupo T1 (vacuna viva atenuada + vacuna inactivada contra vENC) y en tonsilas cecales (C) de aves del grupo T2 (vacuna viva atenuada contra vENC)

tante, se conoce que las vacunas homólogas al virus de desafío protegen mejor que las vacunas con genotipos heterólogos (Miller *et al.*, 2009; Miller y Koch, 2013).

Las lesiones observadas en las aves muertas fueron características de las ocasionadas por cepas velogénicas viscerotrópicas de vENC (Alexander, 2008, Miller y Koch, 2013). Estas lesiones fueron de menor magnitud en las aves que recibieron vacunas vivas atenuadas debido a la replicación viral local por esas cepas. Por otro lado, las aves que recibieron la vacuna vectorizada de vENC no presentaron lesiones hemorrágicas en el tracto gastrointestinal, posiblemente debido a la fuerte protección producida descrita en estudios previos (Miller y Koch, 2013). Asimismo, los menores títulos de anticuerpos contra vENC en las aves que recibieron la vacuna vectorizada se debió a la fuerte estimulación de la respuesta inmune celular producida por estas vacunas, la cual parece ser el principal determinante de protección contra el desafío viral (Palya *et al.*, 2012).

Uno de los problemas para el uso de las vacunas vectorizadas en la industria aviar es el tiempo requerido para se desarrolle una buena inmunidad protectora. Estudios previos

demuestran porcentajes de protección de 57 a 81% cuando el desafío se realiza al día 20, en comparación a 98% cuando el desafío se realiza a partir del día 27 (Palya *et al.*, 2012), similar a resultados del presente estudio.

CONCLUSIONES

- Se obtuvo una buena protección de la vacuna vectorizada de vENC, consiguiendo menor mortalidad y frecuencia de signos clínicos pos-desafío.
- Los resultados sugieren que el uso de vacunas vivas entéricas en zonas de alto riesgo no es suficiente para inducir una buena inmunidad frente al desafío con cepas patógenas.

LITERATURA CITADA

1. **Abolnik C, Horner RF, Bisschop SP, Parker ME, Romito M, Viljoen GJ. 2004.** A phylogenetic study of South African Newcastle disease virus strains isolated between 1990 and 2002 suggest epidemiological origins in the far East. *Arch Virol* 149: 603-619. doi: 10.1007/s00705-003-0218-2

2. **Alexander D. 2008.** Newcastle Disease. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris: OIE. P. 576-589.
3. **Alexander DJ. 2001.** Gordon memorial lecture. Newcastle disease. *Brit Poultry Sci* 42: 5-22. doi: 10.1080/713655022
4. **Alexander DJ. 1995.** The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. *J Comp Pathol* 112: 105-126. doi: 10.1016/S0021-9975(05)-80054-4
5. **Bermudez A, Stewart-Brown B. 2003.** Disease prevention and diagnostic. In: Saif Y (eds). *Disease of poultry*. USA: Iowa State University Press. p. 17-55.
6. **Bogoyavlenskiy A, Berezin V, Prilipov A, Usachev E, Lyapina O, Korotetsky I, Zaitceva I, et al. 2009.** Newcastle disease outbreaks in Kazakhstan and Kyrgyzstan during 1998, 2000, 2001, 2003, 2004, and 2005 were caused by viruses of the genotypes VIIb and VIIc. *Virus Genes* 39: 94-101. doi: 10.1007/s11262-009-0370-1
7. **Esaki M, Godoy A, Rosenberger JK, Rosenberger SC, Gardin Y, Yasuda A, Dorsey KM. 2013.** Protection and antibody response caused by turkey herpesvirus vector Newcastle disease vaccine. *Avian Dis* 57: 750-755. doi: 10.1637/10540-032613-Reg.1
8. **Gallili GE, Ben-Nathan D. 1998.** Newcastle disease vaccines. *Biotechnol Adv* 16: 343-366. doi: 10.1016/S0734-9750(97)00081-5
9. **Kapczynski DR, Afonso CL, Miller PJ. 2013.** Immune responses of poultry to Newcastle disease viruses. *Dev Comp Immunol* 41: 447-453. doi: 10.1016/j.dci.2013.04.012
10. **Lamb R, Collins D, Kolakofsky J, Melero J, Nagai Y, Olstore M, Pringle C, Rima B. 2000.** Family Paramyxoviridae. In: van Regenmortel M (ed). *Virus taxonomy*. Seventh report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. USA: Academic Press. p. 549-561.
11. **Lowe RS, Keller PM, Keech BJ, Davison AJ, Whang Y, Morgan AJ, Kieff E, et al. 1987.** Varicella-zoster virus as a live vector for the expression of foreign genes. *P Natl Acad Sci USA* 84: 3896-3900. doi: 10.1073/pnas.-84.11.3896
12. **Mayo M. 2002.** A summary of the changes recently by ICTV. *Arch Virol* 147: 1655-1656. doi: 10.1007/s007050-200039
13. **Miller P, Koch G. 2013.** Newcastle disease, other avian Paramyxovirus and Metapneumovirus infections. In: *Diseases of poultry*. 13th ed. Swayne D. (ed). Iowa, USA: Willey-Blackwell Publishing. p 87-138.
14. **Miller PJ, Decanini EL, Afonso CL. 2010.** Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infect Genet Evol* 10: 26-35. doi: 10.1016/j.meegid.2009.09.012
15. **Miller PJ, Estevez C, Yu Q, Suarez D, King D. 2009.** Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle diseases vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. *Avian Dis* 53: 39-49. doi: 10.1637/8407-071208-Reg.1
16. **Nolen RS. 2002.** Exotic Newcastle disease strikes game birds in California. *J Am Vet Med Assoc* 221: 1369-1370.
17. **Palya V, Kiss I, Tatar-Kis T, Mato T, Feldoldi B, Gardin Y. 2012.** Advancement in vaccination against Newcastle disease: recombinant HTV/NDV provides high clinical protection and reduces challenge virus shedding with the absence of vaccine reaction. *Avian Dis* 56: 282-287. doi: 10.1637/9935-091511-Reg.1
18. **Palya V, Tatar-Kis, Mato T, Feldoldi B, Kovacs E, Gardin Y. 2014.** Onset and long-term duration of immunity provided by a single vaccination with a turkey Herpesvirus vector ND vaccine in commercial layers. *Vet Immunol Immunop* 158: 105-115. doi: 10.1016/j.vetimm.2013.11.008

19. **Pedersen JC, Senne DA, Woolcock PR, Kinde H, King DJ, Wise MG, Panigrahy B, et al. 2004.** Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. *J Clin Microbiol* 42: 2329-2334. doi: 10.1128/JCM.42.5.2329-2334.2004
20. **Perozo F, Villegas P, Dolz R, Afonso C, and Purvis L. 2008.** The VG/GA strain of Newcastle disease virus: mucosal immunity, protection against lethal challenge and molecular analysis. *Avian Pathol* 37: 235-245. doi: 10.1080/03079450802043734
21. **Post LE, Roizman B. 1981.** A generalized technique for detection of specific genes in large genomes: alpha gene 22 herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell* 25: 227-232. doi: 10.1016/0092-8674(81)90247-6
22. **Rauw F, Gardin Y, Palya V, Anbari S, Lemaire S, Boschmans M, Van Der Bert T, et al. 2010.** Improved vaccination against Newcastle disease by an *in ovo* recombinant HTV-ND combined with and adjuvanted live vaccine at day-old. *Vaccine* 28: 823-833. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.10.049
23. **Shih MF, Arsenakis M, Tiollais P, Roizman B. 1984.** Expression of Hepatitis B virus S gene by Herpes simplex virus type 1 vectors carrying alpha and beta-regulated gene chimeras. *P Natl Acad Sci USA* 81: 5867-5870. doi: 10.1073/pnas.81.18.5867