

## Técnicas diagnósticas para la enfermedad de Newcastle en aves de producción

### Diagnostic techniques for Newcastle disease in poultry production

Felipe Velásquez R; Andrés Felipe Gil L

Universidad Tecnológica de Pereira; Facultad de ciencias de la salud;

Medicina Veterinaria y Zootecnia; Colombia

Felipevelasquez25@utp.edu.co

#### Resumen:

La producción avícola tiene una alta participación en el producto interno bruto de Colombia, además el consumo de carne de pollo y huevo ha aumentado de una manera acelerada los últimos años en el país. La producción avícola se ve amenazada por las enfermedades infecciosas como la enfermedad de Newcastle. Esta patología es causada por un virus altamente infeccioso que pone en riesgo toda producción destinada a aves de corral, debido a que afecta hasta más de 200 especies de aves domésticas y silvestres, lo que hace más fácil su diseminación. Newcastle puede llegar a causar una mortalidad hasta del 100% de las aves afectadas y puede llegar a generar grandes pérdidas económicas por el poco conocimiento que se tiene sobre las técnicas diagnósticas indicadas, en el tiempo apropiado. Newcastle es una enfermedad de reporte obligatorio, que se presenta en la mayoría de continentes, en el territorio colombiano y el eje cafetero, en la actualidad en el departamento de Risaralda se está realizando campañas para declarar la zona libre de la enfermedad con vacunación. El virus de Newcastle pertenece a la familia *paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, genero *Avulavirus*, pertenece al serotipo 1 de los *paramyxovirus* aviares, presenta 5 patotipos que se clasifican en, velogénico (alta virulencia), mesogénico (moderada virulencia) y

lentogénico (baja virulencia), codifica 6 proteínas de las cuales la proteína fusión (F) y la Hemaglutinina-neuraminidasa (HN) son de gran importancia para su diagnóstico. Para el diagnóstico de Newcastle es necesario la implementación de varias pruebas como, serológicas, histopatológicas, diagnóstico directo y moleculares.

**Palabras Clave:** avicultura, control, diagnóstico, Paramyxovirus, pruebas de laboratorio.

**Abstract:**

The poultry production has a high participation in the gross domestic product in Colombia, besides the consumption of chicken meat and egg has increased in an accelerate manner in the country for the last few years. The poultry production is been threatened by infectious diseases as the Newcastle disease. This pathology is caused by a highly infectious virus that threatens all the productions designated to poultry, because it affects more than 200 species of domestic and wild birds, which makes easier its dissemination. Newcastle can increase the mortality to a 100% of the affected birds and can generate big economic losses because of the poor knowledge about diagnosis techniques that are known, in the appropriate time. Newcastle is a mandatory reporting disease that is present in most of the continents, in Colombian territory and in the coffee area. Nowadays in the department of Risaralda campaigns are being conducted to declare the area free of the disease with vaccination. The Newcastle virus belongs to the *Paramyxoviridae* family, *Paramyxovirinae* subfamily, *Avulavirus* genre, serotype 1 of the avian *Paramyxovirus*, present 5 pathotypes classified in velogenic (high virulence), mesogenic (moderate virulence) and lentogenic (low virulence), encode 6 proteins of which the fusion protein (F) and the Haemagglutinin-neuraminidase (HN) are very important for its diagnosis. For the diagnosis of Newcastle is necessary the implementation of several tests as serology, histopathology, molecular and direct diagnosis.

**Key words:** diagnosis, control, laboratory test, poultry, *Paramyxovirus*.

## **Introducción**

### *Epidemiología de Newcastle*

En Colombia la producción avícola además de generar unos 240.000 empleos (1), tiene una alta participación en el producto interno bruto (PIB), el año 2013 fue uno de los mejores años en cuanto a la participación del producto interno bruto agropecuario, debido a que cerró con un crecimiento sectorial de 5,2%, de los cuales los huevos con cascara aportaron el 5% y las aves de corral un 2,6% (2), en el año 2015, se obtuvo un crecimiento sectorial de 5.0%, de los cuales las aves de corral aportaron un 4.8% y los huevos con cascara aportaron un 5.3 %, estas cifras fueron mayores a las proyectadas (3). Según estadísticas de Fenavi el consumo per cápita de carne de pollo y huevo ha aumentado la última década de una manera acelerada, ya que el consumo de carne de pollo en el 2006 fue de 20,1 kg y en el 2015 se obtuvo un consumo de 30,4 kg, actualmente el transcurso del 2016 el consumo per cápita de carne de pollo va en 29,2 kg. El consumo de huevo pasó de estar de 202 unidades en el 2006 a 252 unidades en el 2015 y actualmente en lo que va del 2016 el consumo de huevo aumento a unas 266 unidades. Esto ha permitido duplicar la producción de carne y huevo de aves de producción, al pasar de 6,9 billones de pesos en el 2005 a 14,8 billones de pesos en el 2014 (4). Newcastle es una enfermedad viral altamente infecciosa (5–7) y es una de las principales enfermedades causantes de grandes pérdidas económicas en el sector avícola (8–11), ya que a pesar de los esfuerzos realizados mediante programas de control con vacunación y bioseguridad, el virus de Newcastle es muy persistente (7,12,13). Igualmente, se ve amenazada la economía de toda empresa destinada al comercio de productos y subproductos de aves de producción, debido al gran deterioro en el desempeño zootécnico de las aves causado por la sintomatología, una alta morbilidad y mortalidad (1,11) (Newcastle puede generar una mortalidad del 100% en pollos (14)) y a los elevados costos que representa su prevención, erradicación y los tratamientos de las enfermedades concomitantes que pueden presentarse a causa de este virus (1,15). Newcastle se ha convertido en una amenaza constante para los productores del sector

avícola. Debido a esto, es una enfermedad de reporte obligatorio y existen leyes regidas por la OIE y el ICA para su control y erradicación.

Es necesario estar libres de Newcastle para poder tener comercio hacia otras partes del mundo, donde la entrada de alimento es restringida a países que no se encuentren libres de enfermedades como Newcastle (15–19), ya que es una de las principales barreras de exportación del país, como lo es el caso de Estados Unidos que solo permite el ingreso de aves, sus productos y subproductos procedentes de países libres de la enfermedad (16). El virus de Newcastle también puede generar problemas de salud pública (18), debido a que es una zoonosis benigna, causada por la interacción del hombre con aves infectadas o por medio de vacunaciones de virus vivos, aunque se han reportado graves infecciones oportunistas en personas que presenten inmunosupresión (20), generando conjuntivitis, congestión, lagrimeo excesivo, cefalea y malestar (20,21), asemejándose a una gripa que al cabo de una semana la persona afectada logra la recuperación de su salud. Sin embargo es una patología que no afecta los consumidores de carne de pollo y/o huevo (20).

El virus de Newcastle se descubrió por primera vez en la Isla de Java, Indonesia en el año 1926 (5,22–25) y en Newcastle, Inglaterra en el año 1927 (26). Desde su primera aparición, el virus siguió presentándose en países como Filipinas, China, Corea, Japón, Australia, España y parte de África; su diseminación fue tan grande que en el lapso de 10 a 15 años el virus llegó a la costa norteamericana del Pacífico, al resto de América, Egipto y todos los países de Europa (22). Actualmente en países de América Latina como Costa Rica, Panamá, Chile y Argentina se encuentran libres de la cepa patógena de la enfermedad de Newcastle (18).

En el territorio colombiano el virus ingresó en junio de 1950 (1,17,24). Desde el 2006 hasta el 2009, el virus originó un total de 394 casos en todo el territorio colombiano (1), en el 2013 se presentaron 12 casos de alta virulencia en Colombia, atendidos oportunamente por el ICA (27), y actualmente en junio del 2016 se hicieron 133

notificaciones del virus en 25 departamentos incluidos Risaralda (28), y 9 departamentos fueron reportados con la cepa de alta virulencia presentando 16 casos de aves enfermas con la mayor presencia en los departamentos de Antioquia y Cundinamarca (29). En cuanto a el ingreso del virus a Colombia existen 2 versiones del ingreso del virus, una versión dice que el virus llego desde Venezuela a la Guajira en el mes de junio de 1950 cuando se detectaron las primeras aves de corral afectadas, debido a la importación de pollos vivos y huevos procedentes de Venezuela. La otra versión dice que el virus llego desde Panamá, en aves procesadas y congeladas remitidas a un campamento americano existente en Coveñas. En varias conferencias la doctora Sylvia Mc-Cowen investigadora inglesa dijo que el virus apareció primero en Coveñas, Tolú, Cerete, Montería, el resto de la costa Atlántica, y de allí se extendió a los departamentos de Santander, Valle, Antioquia, Caldas y resto del país (24). En el eje cafetero en el año 2009 se detectó la presencia del virus en aves de traspatio como en pollos de engorde, gallinas, patos, gallos y pavos, se presentó en mayor proporción en el municipio de Circasia, seguida de Quimbaya, La Tebaida, Calarcá, Armenia y Montenegro (30).

Su presencia en la mayoría de continentes se debe a su fácil diseminación, a través del viento puede esparcirse hasta unos 60 KM a la redonda, también a través de exudaciones respiratorias, por medio de las excreciones de aves infectadas, vectores mecánicos como botas, aerosol, camisas, pelo y vectores biológicos como un huevo contaminado, animales que contengan carne infectada, escarabajo de la cama, perros y roedores (24). También se ha demostrado que la *Musca domestica* al ser expuesta al virus de Newcastle cepa la Sota, puede ser un posible vector mecánico de la enfermedad facilitando su transmisión (31).

### *Virus de Newcastle*

Newcastle afecta más de 200 especies de aves (14,17,23,32) domésticas y silvestres (5), gallos de pelea (15), especies acuáticas (33) como patos domésticos (34) y salvajes, que actúan como reservorio natural del virus (11,35), también afecta el avestruz, codorniz, búho y gaviota (21). En los pavos genera signos similares como en los pollos pero con

menor gravedad, los gansos también son considerados susceptibles a la infección (11). Las palomas jóvenes pueden llegar a una mortalidad del 100% y las adultas del 10%, estas aves juegan un papel importante en la diseminación del virus ya que son portadoras del virus y lo eliminan constantemente facilitando su transmisión (14). Las aves de traspatio aumentan la diseminación del virus hacia las aves de producción (36,37), ya que la vacunación es una medida poco implementada en la producción de aves de traspatio y gallos de pelea, ya sea por razón económica, social o cultural (15). De igual forma en los sistemas de aves de traspatio no se maneja el tiempo adecuado de la cuarentena de los animales muertos o enfermos (38).

El virus de Newcastle está actualmente clasificado en la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, genero *Avulavirus* (18,22,25,26). Es un virus con envuelta aviar ARN monocetario (39,40). Se reconocen 10 serotipos de Paramixovirus aviares (21), el virus del Newcastle pertenece al serotipo 1 (APMV-1) (11,18,41), el cual se divide filogénicamente en dos clases (clase I y clase II), los virus que pertenecen a la clase I se presentan comúnmente en aves acuáticas silvestres, son menos diversos genéticamente y son de baja virulencia, los virus que pertenecen a la clase II son más diversos genéticamente y fenotípicamente, se presenta comúnmente en las aves de corral y presentan una gama más amplia frente a su virulencia (25).

*En la siguiente tabla se darán a conocer las características del virus de Newcastle:*

*Tabla 1: Características del virus de Newcastle*

Temperatura:	Inactivado a 56 °c /3 horas, 60°c/30 min
pH:	Inactivado a pH ácido ≤ 2
Productos químicos:	Sensible al éter
Desinfectantes:	Inactivado por formalina, fenol, clorhexidina e hipoclorito de sodio (6%)
Supervivencia:	Sobrevive durante largos períodos a temperatura ambiente, especialmente en las heces

Fuente:(21,24)

Hasta ahora se reconocen cinco patotipos de la enfermedad de Newcastle los cuales se clasifican en: velogénico (alta virulencia), mesogénico (moderada virulencia) y lentogénico (baja virulencia (17,18,42). Los patotipos son los siguientes:

*Velogénico Viscerotrópico*: puede generar la mortalidad del 100% de las aves afectadas en solo 4 días (11), es de alta virulencia, forma aguda, letal y con la presencia de hemorragias en el intestino (17,18).

*Velogénico Neurotrópico*: puede llegar a generar una morbilidad del 100% y una mortalidad del 50% de las aves (en las aves jóvenes puede llegar al 100% de la mortalidad) (11), presenta una alta virulencia, forma aguda y letal, de igual forma puede presentar signos respiratorios, pero en este patotipo predominan los signos nerviosos (18).

*Mesogénico*: signos clínicos leves, principalmente respiratorios y con baja presencia de signos nerviosos (11), baja mortalidad (17) (menor a 10% (21)), es menos patógeno, causa mortalidad en aves jóvenes principalmente (18).

*Lentogénico o respiratorio*: en general no causa lesiones en pollos adultos (11), presenta baja virulencia, con signos respiratorios similares a los causados por las vacunas a virus vivo como (cepas B1, La Sota) (18), aunque varios libros se dirigen a La Sota como una de los causantes de la enfermedad respiratoria grave en animales muy jóvenes (11). También hay que tener en cuenta que, una infección con el virus de campo cepa lentogénica se puede confundir fácilmente con una infección bacteriana cruzada (11).

*Asintomático*: algunas cepas que tienen predilección por el tracto intestinal sobre el respiratorio (18), causando una infección entérica subclínica (17,24).

En general los signos son muy variables, la mayoría de las aves están letárgicas, inapetentes y las plumas pueden estar erizadas. El enrojecimiento y el edema de la conjuntiva puede ser un signo temprano. Algunas aves desarrollan diarrea acuosa, verde o blanca (43), las cepas de alta virulencia se caracterizan por su color de heces verdes (9,24). En los signos respiratorios presenta, descarga ocular o nasal, ruidos respiratorios anormales, cianosis y/o la inflamación de la cabeza y cuello (43); en los signos nerviosos

presenta tremor muscular, parálisis de las alas y/o patas, torticollis y marcha en círculos (9,24). Los signos clínicos se presentan cuando la enfermedad ya está avanzada (43). Generalmente en las lesiones provocadas por el virus de Newcastle se pueden observar: toncillas cecales hemorrágicas, tejido linfoide hemorrágico, lesiones hemorrágicas en proventriculo, hemorragia extensiva en proventriculo, úlceras botonosas en mucosa intestinal, lesiones hemorrágicas en el tracto respiratorio, congestión en la tráquea, aerosaculítis; las aves muertas presentan una deshidratación marcada (9) y el contenido intestinal puede ser de color verde grisáceo (22). Cada cepa presenta distintos signos y lesiones como se describirán algunas características clínicas y patológicas ocasionadas por el virus de Newcastle, en la tabla número 2:

*Tabla 2:* características clínicas y patológicas ocasionadas por el virus de Newcastle

Presentación	Características clínicas y patológicas
Vicerotrópico velogénico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemorragia dentro del parche linfoide, en forma de media luna en el parpado inferior.</li> <li>• Hemorragia focal y necrosis de las amígdalas.</li> <li>• Focos hemorrágicos en el proventrículo.</li> <li>• Bazo moteado de necrosis multifocal.</li> </ul>
Neurotrópico velogénico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aves alertas, con hemiparesia, amplia gliosis y afección cerebral.</li> <li>• Temblor, contracción de la cabeza y parálisis.</li> <li>• Si tiene movilidad se alimentara.</li> <li>• Lesiones macroscópicas están ausentes.</li> </ul>
Mesogénico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caída en la producción de huevo y producción de huevos con malformaciones.</li> <li>• Ligera depresión.</li> <li>• La lesión característica del patotipo es esplenomegalia.</li> </ul>



---

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cepas virulentas producen encefalitis no supurativa y gliosis.</li> <li>• Se puede observar necrosis en el páncreas y el bazo.</li> </ul>
Lentogénico o respiratorio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Produce enrojecimiento de la tráquea y traqueítis no supurativa crónica.</li> <li>• Síntomas como estertor, ruidos respiratorios anormales, anorexia y depresión.</li> <li>• No hay grandes lesiones macroscópicas.</li> </ul>

---

Fuente (11)

El virus de Newcastle codifica 6 proteínas estructurales por sus genes estas son: Nucleoproteína (N) o (NP), Fosfoproteína (P), Matriz (M), Fusión (F), Hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y ARN polimerasa (L) (7,17,18,34,44) y dos proteínas no estructurales como la W y V las cuales son generadas por la modificación trascricional de RNAm que codifica para una proteína estructural (1). A continuación se describirán las proteínas estructurales.

*Nucleoproteína (N) o (NP)*: esta proteína es esencial para la replicación del virus (22,26).

*Fosfoproteína (P)*: tiene un papel importante en la replicación, transcripción (22) y modulación de la replicación viral. Esta proteína es la única que puede formar dos proteínas adicionales que son la W y V, formadas por edición de ARN genómico (11,41). También se ha sugerido que la proteína P se podría implementar para detectar anticuerpos contra Newcastle (45).

*Matriz (M)*: es la proteína más abundante (17) y pequeña en el virión (39), regula la síntesis de ARN viral, ayuda al anclaje del vibrión a la célula huésped (1,26) y le da estabilidad a la estructura del virus (9).

*Fusión (F)*: determina el grado de virulencia de las cepas de (1,11,18), es responsable de la propagación sistémica del virus (17,26), se encarga de permitir la entrada del virus a la célula mediante fusión (18,22,42) y es la encargada de la interacción virus-célula y célula-célula (9).

*Hemaglutinina-neuraminidasa (HN)*: cumple funciones como el reconocimiento y eliminación del receptor en la célula huésped, e interactúa con la proteína F para promover la fusión (26). Los anticuerpos formados para esta proteína son la base para la serología en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI) (9,17).

*ARN polimerasa (L)*: es la proteína más grande del genoma y modula la virulencia del virus, de allí es su importante papel en la virulencia del virus (26).

La proteína HN y F, son proteínas de membrana, por este motivo son de gran importancia para iniciar la infección viral (22,46). La proteína V tiene funciones importantes en cuanto a la replicación del virus (11,47) y sirve como un regulador negativo de la síntesis de ARN viral por medio de la proteína N, además tiene una función independiente de regular la respuesta inmune innata, induciendo la producción de citoquinas inflamatorias e interferón de señalización (48).

Es de gran dificultad llegar un diagnóstico confirmativo de la enfermedad de Newcastle solo por necropsia u observación de síntomas; esto es debido a la falta de signos clínicos de las aves, a la similitud de los signos clínicos presentes en el ave con otras enfermedades, a la variabilidad genética del virus que interviene para su rápida identificación o detección (11) y además el virus de Newcastle no se puede distinguir de otros *paramyxovirus* solo por titulación serológica (19). Además Newcastle es una más de las diversas enfermedades que afecta el sistema respiratorio y para su correcto diagnóstico es de gran importancia diferenciarla de las siguientes enfermedades: influenza aviar, Cólera Aviar, Laringotraqueitis, Viruela Aviar, Bronquitis infecciosa, Clamidiosis (18,24) y por errores en el manejo de agua, alimento y ventilación (17,21). El virus de la influenza Aviar también produce hemoaglutinación de los glóbulos rojos y

las lesiones macroscópicas de la forma velogénica son similares a la de Newcastle, por este motivo es vital una prueba de laboratorio para su diferenciación (18).

Newcastle tiene un periodo de incubación entre 3 y 8 días (18), la OIE dice que el periodo de incubación es de 21 días (19), la patogenicidad varía dependiendo del hospedero y la cepa del virus (23), en pollos de engorde la mortalidad varía de acuerdo a la cepa, ya que el virus puede generar una mortalidad del 100% o pasar asintomática (11,22). La susceptibilidad por especie es tan marcada, que cepas que generan enfermedad severa en pollos y pavos, pueden causar signos leves en patos y gansos (22). También en las aves mascota como los pericos, pueden distribuir el virus por más de un año sin presentar signos clínicos de la enfermedad (11,20). Los animales más jóvenes sufren la enfermedad más aguda; las aves infectadas por vía natural como nasal, oral u ocular desarrollan signos respiratorios y las aves infectadas por vía intravenosa, intramuscular e intracerebral pueden desarrollar signos nerviosos (22).

#### *Pruebas diagnósticas para Newcastle*

La implementación de técnicas para el diagnóstico de Newcastle permite identificar el virus, tener un control sobre él y contribuye a evitar su diseminación (22). Las técnicas que permiten una detección y diferenciación rápida son de gran importancia para reducir la diseminación del virus (49). Para el diagnóstico de Newcastle existen diversas técnicas diagnósticas como las siguientes:

#### *Pruebas serológicas:*

Las pruebas serológicas son una herramienta útil para detectar la presencia de Newcastle en una población, sobre todo cuando no estén facilitadas técnicas moleculares como RT-PCR (50). Esta técnica tiene como finalidad detectar anticuerpos en sangre, producidos por el virus de campo o virus vacunal. Se realizan a partir del suero del ave y la muestra se debe tomar mínimo a 15 animales, la muestra de sangre debe tener mínimo 2 centímetros por ave, con aguja individual de calibre 20 del ala. La serología es muy implementada en el control de Newcastle (24), ya que el diagnóstico serológico

postvacunal es utilizado como monitoreo serológico para confirmar la aplicación exitosa de la vacuna y confirmar una adecuada respuesta inmune por el ave (9,22,23). Para que esta prueba sea confiable los sueros se deben remitir libres de impureza, hemolisis y lipemas. Se debe evitar la toma de muestra en aves deshidratadas ya que pueden alterar el resultado. Las pruebas serológicas implementadas para el diagnóstico de Newcastle son Elisa e Inhibición de la Hemaglutinación. Un suero tomado en caso sospechoso y su resultado es negativo a las pruebas serológicas, se puede deber a que las muestras son de animales que aún no han sido afectados o que han sido recientemente afectados por el virus de campo y no presentan reactividad serológica, en este caso se requiere volver a muestrear la graja al menos 5 días después, tomando las muestras de los lotes más antiguos en presentar los signos (51). Los resultados de estas pruebas serológicas por lo general están listos en dos días, a diferencia de los cultivos que pueden tardar entre tres y cinco días, incluso hasta varias semanas (52).

*Elisa:* en esta prueba se mide la concentración relativa de Ac contra el virus de Newcastle en el suero del pollo. El procedimiento se realiza de la siguiente manera. A una placa de 96 pozos recubierta de un Ag de Newcastle se le adiciona el suero problema del ave al cual se le quiere medir el nivel de anticuerpos, los Ac del suero se unen al Ag de la placa y forman un complejo que es reconocido por el antisuero marcado al adicionar un sustrato enzimático, la reacción del antisuero marcado produce un cambio de color, la intensidad del color está directamente relacionada con la cantidad de Ac para el virus presente. Para interpretar los resultados del suero se realiza con un espectrofotómetro que hace la lectura del suero y se lee en densidad óptica (24).

En Colombia, se consideran como sospechosos títulos superiores a 4.000 en pollo de engorde y 8.000 en aves de postura, de igual forma se deben considerar sueros sospechosos en pollo de engorde si presentan títulos superiores a 128 en aves que solo han recibido una vacuna viva en todo su ciclo productivo y superior a 256 en aves que han recibido una vacuna inactivada oleosa. Sin embargo se debe tener en cuenta las indicaciones del kit implementado en la prueba (24,51). También se debe sospechar si se obtiene un coeficiente de variación superior al 30% con títulos similares a los anteriores

(51). La proteína P recombinante basado en Elisa, también puede ser una alternativa para el diagnóstico de Newcastle, además su implementación ayudaría a superar distintas limitaciones técnicas, económicas y permitiría a una detección rápida del virus (41).

*Inhibición de la Hemaglutinación (HI):* esta prueba se basa en detectar inmunoglobulinas G y M, es decir permite una detección temprana de la respuesta inmune. Para su ejecución requiere de glóbulos rojos de aves y Ag inactivado del virus. El virus de Newcastle se caracteriza por tener proteínas de membrana o hemaglutininas las cuales reaccionan con los glóbulos rojos del pollo hemaglutinandolos, esta característica es usada en esta prueba como un método indicador de la reacción Ag-Ac. (24). Para la ejecución de esta prueba se debe adicionar 0,025ml de PBS en cada pocillo, luego se adiciona 0,025ml de suero en cada pocillo de una placa de micro titulación de plástico en fondo en V, luego se adiciona 0,025 ml de suero en el primer pocillo de la placa y a lo largo de la placa se realizan diluciones de suero a la mitad en volúmenes de 0,025ml. Se deben adicionar 4 HAU (Unidades Hemaglutinantes) de virus/antígeno en 0,025 ml y se deja la placa mínimo 30 minutos a temperatura ambiente como 20 °C o 60 minutos a 4°C si la temperatura es alta. Luego se añade 0,025 ml de eritrocitos de pollo al 1% (v/v) a cada pocillo, se mezcla suavemente y se dejan reposar unos 40 minutos a temperatura ambiente como 20°C o 60 minutos a 4°C si la temperatura ambiente es alta. En este momento los eritrocitos deben formar un botón claramente diferenciado (23). En los resultados positivos se pueden observar los eritrocitos como se sedimentan en forma de una malla o de masa y en los resultados negativos se observan eritrocitos sedimentados de forma poco cohesionada (53). Esta prueba puede tener cierto nivel de contaminación cruzada entre los distintos serotipos de los paramixovirus aviares principalmente entre PMVA-1, PMVA-3 y PMVA-7 (23). En Colombia se considera sueros sospechosos títulos mayores a 128 en aves que solo recibieron una vacuna en todo su ciclo productivo y superiores a 256 en aves que han recibido solo una vacuna oleosa. En aves de postura y reproducción se pueden presentar normales hasta 1024 y 2048 respectivamente.

También se considera adecuado coeficientes de variaciones inferiores al 20% (24). Los resultados se pueden observar en la figura 1:

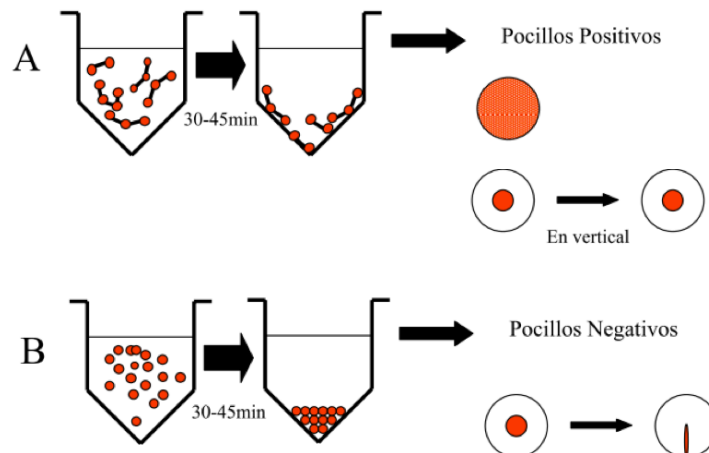


Figura 1: resultados de la prueba inhibición de la hemaglutinación

Fuente: (53)

*Histopatología:* es un método de confianza para el diagnóstico de Newcastle, siempre y cuando la muestra sea tomada en el tiempo adecuado, a los animales que cursen la enfermedad aguda y animales que presenten lesiones características de Newcastle. Es una técnica que se basa en la identificación de las lesiones microscópicas ocasionada por el virus en el tejido. La muestra debe ser pequeña no superar 1 o 2cm<sup>2</sup>, la muestra se toma a 10 aves con mayor morbilidad y mortalidad, se toma la muestra en aves que presenten signos patognomónicos de la enfermedad y se debe tomar de la manera más aséptica posible. (24) Para este estudio se debe de enviar varios cortes de encéfalo, tráquea y pulmón en formol buferado al 10% de aves que presentes signos clínicos u órganos que presenten lesiones (51). Las muestras de tráquea y pulmón se pueden enviar en una bolsa estéril como un pool; las tonsilas cecales se deben enviar sin abrir el intestino en una bolsa estéril, conservarla en refrigeración y enviar la muestra identificada indicando el tipo de tejido, nombre de granja, número de registro, departamento, municipio, módulo, lote y galpón. Por ningún motivo se debe enviar o transportar aves vivas o muertas al laboratorio (24).

El hallazgo de encefalitis viral y cambios vasculares en los endotelios o paredes de los capilares sanguíneos junto con gliosis y vasculitis, son considerados características de las lesiones encefálicas producidas por Newcastle. Cuando el diagnóstico solo se hace en muestras de tráquea, resulta muy difícil caracterizar la lesión ya que no es específica. Cuando la lesión ocurre a temprana edad, hay mayor forma de asociarla con Newcastle. Resultados histopatológicos negativos con la presencia de signos clínicos o morbimortales no pueden ser descartados como negativos y deberá ser notificado el caso al ICA o ente oficial correspondiente. El examen histopatológico demora varios días y puede tener inconvenientes por lo siguiente: al enviar un número reducido de tráquea, encéfalo y pulmón, la muestra se debe tomar mínimo a 10 aves, al enviar muestras inadecuadas como con inadecuado volumen de formol o formol no buferado, al haber cruzamiento por infecciones secundarias, por enviar aves en descomposición (51).

*Diagnostico directo:* son las técnicas diagnósticas que tienen como finalidad la identificación del virus o parte de sus componentes. Entre estas técnicas se encuentran las pruebas de aislamiento viral, pruebas moleculares como PCR y RT-PCR y pruebas biológicas que identifican la patogenicidad del virus. Para pruebas moleculares y aislamiento viral se deben seleccionar 30 aves enfermas, se toma un hisopado por dos aves, cada hisopo se debe guardar en una vénula que contenga 3 ml de medio de transporte, se debe hacer un pool con 5 hisopos procedente de 10 aves y deben quedar en total 3 pools, se guardan los hisopados en una bolsa plástica, estéril y sellable, de manera que queden 5 hisopos por bolsa; muy importante no mezclar hisopos traqueales con cloacales, se marca la muestra y se refrigera para posteriormente enviarla al laboratorio correspondiente (24).

*Aislamiento viral:* es una técnica prescrita para el comercio internacional y sigue siendo el método de elección de muchos profesionales para confirmar el diagnóstico (11), esta prueba permite aislar el virus y se deben tomar muestras procedente de aves sacrificadas o moribundas. Las muestras de aves muertas pueden ser de hisopos oronasales, tejido de pulmón, riñón, intestino con contenido, amígdalas cecales, bazo, encéfalo, hígado y corazón; se debe procurar enviar las muestras intestinales y de encéfalo de forma

separada. Para las muestras de aves vivas se debe tomar hisopado cloacal con material fecal, igualmente un hisopado traqueal u orofaríngeo. Las muestras para hisopados traqueales y de tejidos, se deben conservar en solución salina isotónica taponada con fosfato (PBS), con un pH de 7,0-7,4, que contenga antibióticos como penicilina (2.000 unidades/ml); estreptomycin (2 mg/ml); gentamicina (50 µg/ml); y micostatina (1.000 unidades/ml). En hisopados cloacales y heces se deben conservar a concentraciones cinco veces superior a las anteriormente descritas (23). Todo aislamiento del virus deberá ser notificado al ICA (51) y siempre deben estar respaldados con pruebas biológicas o por pruebas moleculares (24).

La prueba prescrita para el comercio internacional consiste en la inoculación de 0,2 ml de líquido sobrenadante de las heces o sobre las suspensiones de tejido e hisopos, obtenidos por medio de una centrifugación a 1.000 g durante 10 minutos a 25°C, en la cavidad alantoidea de 5 embriones de huevos de aves SPF (pollos libres de patógenos específicos) de 9-11 días de incubación. Luego de la inoculación, se incuban a 35-37°C durante 4-7 días. Los huevos que contengan embriones muertos o moribundos al eclosionar y todos los huevos que al final del periodo de incubación no han eclosionado, se deben enfriar primero a 4°C durante 4 horas o toda la noche y se comprueba por medio de los líquidos alantoideos si hay actividad hemaglutinante (23), tomando el líquido alantoideo de los huevos muertos o que sobrevivieron a la inoculación y enfrentandolos a glóbulos rojos libres de patógenos no específicos. Son preparados en una dilución del 10% para detectar la presencia de un virus hemaglutinante (24). Se debe tener en cuenta cuando se obtiene un resultado negativo que: En situaciones crónicas de la enfermedad, donde los anticuerpos alcanzan niveles elevados y la presencia del virus disminuye dado al efecto neutralizados de los anticuerpos generados por la infección, cuando la muestra es insuficiente y/o ha sido tomada en animales que no han sido seleccionados previamente con base en los signos clínicos, cuando se toma la muestra en animales muertos donde el virus ya se encuentra reducido o ausente, cuando la muestra es procedente de un animal muerto (24,51).



*Pruebas moleculares:* estas pruebas permiten identificar la clase del virus y se han convertido en una de las técnicas más comunes para su diagnóstico, (11) debido a la rápida demostración de la presencia del virus. Esta prueba puede fallar en la precisión por muestras procedentes de heces. Para esta prueba se implementa frecuentemente frotis traqueales u orofaríngeos ya que contienen poco material orgánico que interfiere con la interpretación del resultado, de igual manera se han utilizado muestras de tejido y de órganos (23). También se ha implementado una técnica que consiste en la implementación de las tarjetas FTA® (Flinders technology associates); En un estudio se evaluó la inactivación y transporte de fluido alantoideo infectado por el virus para ser diagnosticado por pruebas moleculares; donde se demostró que la utilización de estas tarjetas puede detectar el virus hasta 14 días después de su inactivación; la inactivación del virus por las tarjetas no influye en la secuencia de los nucleótidos, lo que permite detectar el grado de virulencia posteriormente; las tarjetas permiten alta bioseguridad; son una alternativa viable para el muestreo, inactivación y diagnóstico molecular de Newcastle (54). Esta técnica también ha sido implementada en otras enfermedades como Influenza Aviar, donde un estudio dice que su implementación facilita el transporte de la muestra por no requerir cadena de frío (55), actualmente se utiliza para diagnosticar ambas enfermedades en distintas partes del mundo como en el Medio Oriente (36).

*RT-PCR:* esta técnica es implementada para detectar y amplificar el ARN viral. Permite amplificar la región del gen F el cual traduce la proteína fusión (F) que contiene el punto de escisión F0 y valorar su virulencia (17,23,24,56), la cual debe escindirse en F1 y F2 para que las partículas sean infectivas (23). La proteína F se sintetiza como un precursor inactivo que es posteriormente clivado proteolíticamente para ser activo, este clivaje se realiza en el péptido entre los aminoácidos 116 y 117. La secuenciación de aminoácidos de esta glicoproteína difiere entre las cepas de alta y baja virulencia, en los residuos de aminoácidos donde se da el clivaje donde las cepas altamente virulentas tienen mayor capacidad de clivaje por mayor número de proteasas celulares (24). En la mayoría de los PMVA-1 que son de alta virulencia presentan una secuencia 112R/K-R-Q-K/R-R 116 en el extremo C-terminal (carboxílico) de la proteína F2 y F (felilalanina) en el residuo 117 y

en el extremo N-terminal (amino) de la proteína F1, en cambio los virus de baja virulencia tienen secuencias en la misma región 112G/E-K/R-Q-G/E-R116 y L (leucina) en el residuo 117 (18,23). El virus se considera virulento si presenta por lo menos tres residuos de arginina o lisina entre los residuos 113 y 116 en el terminal C de la proteína F2 y fenilalanina en el residuo 117, el cual es el terminal amino de la proteína F1 (18).

La secuenciación es el procedimiento que permite conocer el contenido genético de un fragmento ADN que se ha obtenido por PCR. En este proceso los productos de PCR son purificados, las dos hebras de ARN de cada producto, luego las secuencias son analizadas y depuradas para después ser comparadas y alineadas entre sí, de esta forma se analizan de manera detallada su región de clivaje y se determina si son cepas de alta o de baja virulencia (24). Para esta técnica se envía una muestra de líquido alantoideo para la extracción de ARN viral (56), también se debe enviar la muestra fresca en refrigeración de un animal sacrificado o recientemente muerto, de tráquea, pulmón o realizar un hisopado traqueal o cloacal, e la manera más aséptica posible, deben ser enviadas de manera inmediata con el fin de evitar la desnaturalización viral (24). Un resultado positivo deberá ser notificado al ICA (24) y un resultado negativo puede ser causado por una contaminación cruzada de la muestra (23). La técnica multiplex RT-PCR se implementa para una detección simultánea, rápida y para la diferenciación de las clases I y II del virus de Newcastle (57). Actualmente se ha implementado esta técnica con múltiples bandas en el cebador degenerado basado en RT-PCR anidada, que permite una detección rápida, precisa y económica, lo que puede ser de gran utilidad para vigilar, detectar y diferenciar los patotipos de Newcastle, se debe tomar la muestra a partir de fluido alantoideo, esta prueba permite evitar un resultado falso positivo o falso negativo que suelen suceder comúnmente por errores manuales o por infección de la muestra (58).

*Inmunohistoquímica*: esta técnica ha permitido estudiar la distribución de la proteína del virus en el tejido de las aves infectadas, la distribución del virus como tal (11) y permite identificar la presencia del antígeno viral específico de Newcastle. Se debe enviar una muestra fresca de un animal sacrificado o recientemente muerto, de tráquea, enviada en

formol buferado al 10% para inmunoperoxidasa y en congelación para inmunofluorescencia. Las pruebas que muestren positividad a las pruebas de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa en tejidos, deberá ser notificada como positiva a Newcastle ante el ICA. Un resultado negativo de la prueba pero las aves presentan evidencia clínica serológica, histopatológica o de aislamiento viral, de igual forma deberá ser notificada. El resultado de esta prueba se puede ver afectado por una reciente vacunación de vacunas vivas, por este motivo para la implementación de esta prueba se debe tener en cuenta los antecedentes del lote muestreado y procurar respaldarlas con otras pruebas (51). Actualmente existe un nuevo estudio para la detección histoquímica de las células infectadas por el virus, donde se implementó un método para la tinción de las células infectadas por el virus, por medio de un substrato de sialidasa fluorescente, implementando BTP3-Neu5Ac para la tinción, en el cual se confirmó la detección específica de las células infectadas por Newcastle (46). También en otro estudio se implementó un método de marcaje combinado donde, se demuestra que los colorantes fluorescentes general de membrana como PKH67 y PKH26, son de gran utilidad para el diagnóstico de Newcastle (59). En la tabla número 3 se dará a conocer el tiempo máximo desde la atención de la sospecha hasta la emisión de resultados por parte del laboratorio:

*Tabla 3:* tiempo máximo desde la atención de la sospecha hasta la emisión de resultados por parte del laboratorio

<b>Prueba diagnóstica</b>	<b>Tiempo máximo desde la atención de la sospecha hasta la emisión de resultados por parte del laboratorio</b>
Serología	72 horas
RT-PCR muestra directa	3-6 días
Histopatología	7 días
Aislamiento viral	8-22 días
RT-PCR de líquido alantoideo	6 días post aislamiento positivo
IPIC	16-30 días

Fuente: (24)

*Pruebas biológicas:* Una vez se ha aislado el virus, La patogenicidad de Newcastle puede medirse mediante el índice de patogenicidad intracerebral, el índice de mortalidad embrionaria en horas, el índice de patogenicidad intravenosa en semanas (11,18) y la técnica intracloacal (18).

El nivel de patogenicidad del virus puede medirse mediante un sistema recomendado por la OIE, consiste en un índice de patogenicidad intracerebral, el cual se mide en pollos de 1 día de edad donde se evalúa la capacidad del virus para generar signos, lesiones y mortalidad de aves (18). Los valores de este índice se calculan en una escala de 0'0 a 2'0 (18,23) y las cepas de virus de campo que se deben reportar a la OIE son las que presentan un índice de patogenicidad intracerebral mayor de 0'7. En general, las cepas velogénicas tienen un índice de 1'5 a 2'0, las mesogénicas de 1'0 a 1'5 y las lentogénicas como las cepas vacunales valores menores de 0'7 (14).

En esta prueba se debe diluir líquido alantoideo infectivo y fresco con un título HA >24 (>1/16) a 1/10 en solución salina isotónica estéril sin aditivos, como antibióticos. Luego se deben inyectar 0.05 ml del virus, vía intracerebral diluido en diez polluelos procedente de huevos de aves SPF que tengan entre 24 y 40 horas de vida. Se examinan cada 24 horas durante 8 días y en cada observación se deben puntuar las aves donde 0 es normal, 1 está enferma y 2 si está muerta o con incapacidad de alimentarse. Luego todos los valores son sumados y se promedian a los 8 días para saber su valor (23). En la figura número 2 se pueden observar las cepas que se deben reportar a la OIE:

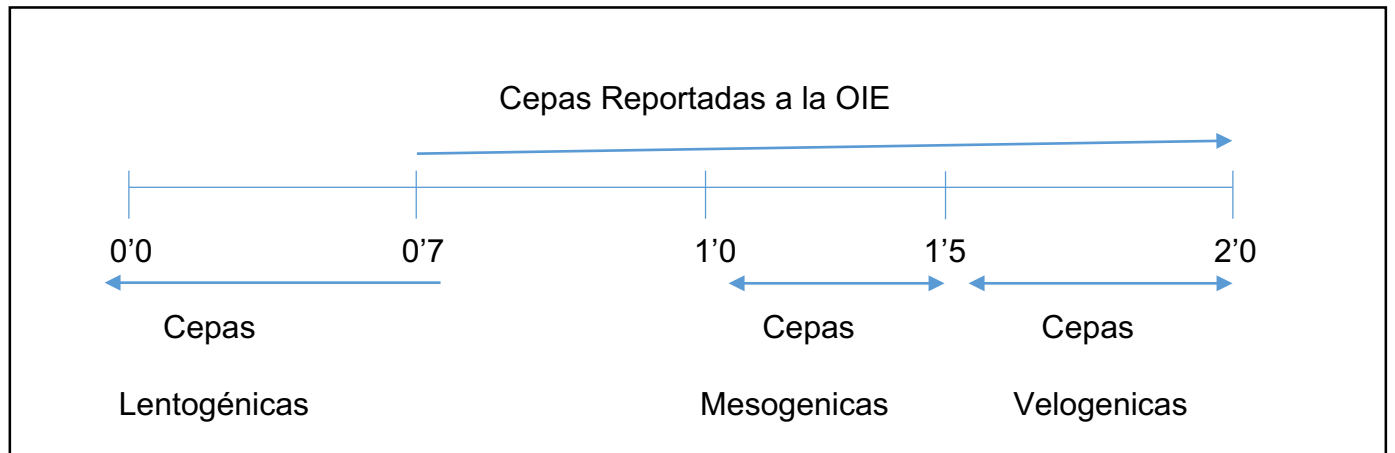


Figura 2: cepas de Newcastle que se deben reportar a la OIE

Fuente: (18)

El índice de patogenicidad intravenosa se evalúa en aves de 6 semanas de edad. Se inoculan 10 pollos a nivel de la vena braquial con 0.1 ml de líquido alantoideo y se observa cada 24 horas por 10 días y se registran los valores los cuales son 0 = normal, 1 = enfermo, 2 = parálisis y 3 = muerto. Se suman los datos de cada pollito y se calcula el promedio. El valor máximo de esta prueba es de 3.0 (24), esta prueba es de gran utilidad para diferenciar cepas mesogénicas de velogénicas (18). El índice de mortalidad embrionaria, es el tiempo en horas que transcurre para que la dosis mortal mínima cause la muerte de embriones de pollos de 9 a 11 días de incubados (7,24). La prueba se puede interpretar de la siguiente manera: cepas lentogénicas presentan un tiempo promedio de más de 90 horas, las cepas mesogénicas presentan un tiempo promedio entre 60 y 90 horas y las cepas velogénicas presentan un tiempo menor a 60 horas. En el procedimiento se inocula 0.1 ml de una dilución de 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-10</sup> de líquido alantoideo de la cámara de aire y los embriones son observados en un tiempo máximo de 8 días (24). El índice intracloacal se realiza en aves libres de patógenos específicos, de 8 semanas de edad, es implementado para diferenciar las cepas velogénicas vicerotrópicas de las

velogénicas neurotrópicas (18). En la tabla número 4 se darán a conocer según los resultados si el virus es de baja o alta virulencia:

*Tabla 4:* Grado de virulencia según la prueba y cepa

	Tiempo promedio muerte de embriones por hora	Indice patológico intravenoso	Indice patológico intracloucal
<b>Velogénico</b>	<60	2-3	Positivo
<b>Mesogénico</b>	60-90	0-1	Negativo
<b>Lentogénico</b>	>90	0	Negativo

Fuente (18)

Newcastle es una enfermedad que no tiene tratamiento (21,24), por este motivo se deben establecer medidas estrictas para su prevención y control. Existen varios aspectos fundamentales, como lo son la bioseguridad y la vacunación, evitando el ingreso del virus mediante procesos estrictos de bioseguridad y brindando una adecuada inmunización de las aves mediante vacunas (1,22,24,51). También se ha implementado el sacrificio de las aves afectadas (18,47) y la ampliación de la investigación en cuanto a la respuesta inmune de las aves de corral para Newcastle, sería fundamental para implementar nuevas estrategias y programas para su control en un futuro (47,48). Ante la sospecha de Newcastle se deben tener en cuenta algunos parámetros para ser más exactos en su diagnóstico (24):

1. La alteración de los parámetros zootécnicos: en pollos de engorde se considera sospechoso si disminuye su consumo de alimento 3 gramos/día y en aves de postura se considera sospechoso si disminuye su consumo de alimento 7 gramos/día.
2. La presencia de signos respiratorios y nerviosos: respiratorios como ruidos respiratorios anormales, inflamación de la cabeza y secreción nasal u ocular y signos nerviosos como torticolis, parálisis o temblor.

3. Mortalidad: Al presentarse un alta mortalidad, después de la aparición de algunos signos patognomónicos de la enfermedad (24).

4. Vacunación: es de gran importancia saber que todas las granjas cumplan con la normatividad del ICA en la “resolución 01937 de Julio 22 del 2003” sobre la vacunación en pollos de engorde con al menos dos vacunas contra la enfermedad de Newcastle y las gallinas comerciales y reproductoras con al menos tres vacunas vivas durante el levante y una inactivada antes de iniciar producción. Si hay una granja que se presenta signos similares a los de Newcastle y no cumple con esta norma, se considerara una granja sospechosa (51).

#### *Vacunación de Newcastle*

La vacunación constituye la herramienta profiláctica más efectiva, menos costosa (22) y es la única manera de brindar protección a las aves frente a infecciones virales. La vacunación es una medida para contribuir al control de enfermedades de fácil diseminación (41). La aplicación de la vacuna debe ser monitoreada y evaluada mediante pruebas como HI y Elisa (17), además la vacunación es de gran importancia, debido a que hay evidencia de que aves silvestres como palomas pueden representar reservorios naturales de los virus mesógenos (42,44). También se debe tener en cuenta que las avestruces pueden padecer esta enfermedad, por lo que se requiere vacunar frente a Newcastle todo tipo de ave destinada a producción (60). Las cepas empleadas para la vacuna de Newcastle son a partir de virus vivos, virus atenuados e incluso existe una vacuna *in ovo* formulada a partir del virus de Newcastle de baja virulencia. Las vacunas comerciales de virus vivos se clasifican en 2 grupos, vacunas lentogénicas tales como: Hitchner-B1, La Sota, V4, NDW, 12 y F, y vacunas mesogénicas como: Roakin, Mukteswar y Komarov. Se deben emplear cepas de baja virulencia que no superen un índice de patogenicidad mayor a 0.7 (23). Actualmente se está usando tecnología de genética reversa, en China se desarrolló una vacuna del genotipo VII que protegió contra el desafío de la cepa patógena original del mismo serotipo (18).

En la actualidad los planes de vacunación practicados en reproductoras y ponedoras manejan mínimo 3 vacunaciones con productos a virus vivo en todo su ciclo productivo. En reproductoras se aplica una vacuna oleosa antes del inicio de su producción, en un promedio de 18 y 20 semanas de edad. En ponedoras se implementan vacunas a virus vivo o en algunos casos se maneja una vacuna inactivada antes de la producción. En pollos el protocolo depende de la región y el virus, normalmente se manejan vacunas con virus vivos los primeros 15 – 18 días de edad. En países como estados unidos la cepa patógena está controlada por adecuados manejos con vacunación *in ovo* (18), vacunas con vectores basadas en el herpes virus del pavo (HVT) portando proteínas del virus de Newcastle. En la producción de pollo de engorde no está controlada la cepa de alta virulencia (18,23), se implementa vacunación con vacunas vivas e inactivadas simultáneamente, lo que induce cómo respuesta la producción de anticuerpos humorales, a nivel local inmunoglobulina A y en el sistema circulatorio inmunoglobulina G, que proporciona altos niveles de inmunidad frente a Newcastle (18).

Las vacunas vivas se pueden administrar a las aves en el agua de bebida, por aspersion, vía ocular o vía nasal (23). Las vacunas con virus muerto son las menos implementadas para el control de enfermedades virales en la avicultura, ya que requieren de varias dosis para lograr una correcta estimulación del sistema inmune (1). Las vacunas atenuadas se preparan para su uso mediante una emulsión con aceite vegetal o mineral y se deben administrar por vía intramuscular o subcutánea (23). En países donde no se tiene buenas prácticas en cuanto a la administración y conservación en las cadenas de frio de las vacunas, como la refrigeración para conservar vacunas a virus vivo, se puede manifestar la enfermedad (47,61,62). Igualmente se ha demostrado que la susceptibilidad de las aves de corral se debe al resultado de las malas prácticas de los productores durante la vacunación de las aves (63). También se han implementado nuevos sistemas en cuanto a la vacunación, ya que las vacunas vivas por medio de una mala administración pueden volver a ser cepas virulentas y provocar la enfermedad, el sistema consiste en la utilización de vacunas de ADN recombinante que están compuestas por organismos vivos, a los cuales se les ha eliminado su gen virulento y se ha reemplazado por genes



de otro patógeno contra el que se quiera inmunizar. La implementación de este sistema vacunal va a permitir una menor presentación de una reacción postvacunal de tipo respiratorio (1,18) y va a generar una respuesta de tipo humoral y celular (1). Para la implementación de vacunas vectorizadas o recombinantes se ha utilizado como vector el Herpes virus de pavo (HVT) el cual le insertan la proteína fusión (F) y genera una protección frente a Newcastle para pollos de engorde y ponedoras comerciales (18). De igual forma se está implementando como vector el virus de la viruela aviar (23).

Otra técnica nueva consiste en la implementación de vacunas de baculovirus recombinantes que expresan los genes F Y HN del virus de Newcastle. Esta técnica de construcción de la vacuna mediante vacunas de baculovirus puede ser de gran ayuda ya que combina los beneficios inmunoestimulantes de un vector de virus recombinante con los beneficios no replicantes de una vacuna de ADN (64). En la actualidad se han desarrollado vacunas donde el virus de Newcastle es implementado como un vector para transportar los genes del virus de influenza aviar, lo que genera una protección para ambos virus (18). Actualmente se pueden formular vacunas monovalentes o bivalentes, acompañado por el virus de bronquitis infecciosa (18). De igual forma se ha demostrado que la implementación de protocolos de vacuna formulada con una cepa homologa en condiciones experimentales, reduce la mortalidad (65).

En Colombia las vacunas a virus vivo que son utilizadas son la Sota, B1 y VG/GA (66), las vacunas la Sota y B1 son a base de virus lentogénicos y la vacuna VG/GA son a base de virus asintomático (18). Las vacunas inactivadas también son implementadas, y se obtienen por medio de la adición de formaldehído a preparaciones víricas infectivas o mediante un tratamiento con beta-propiolactona (23).

### *Manejo ante una sospecha de un brote de Newcastle*

El manejo ante la sospecha de Newcastle se debe tener en cuenta lo siguiente: Se debe hacer la notificación de un foco o brote de la enfermedad a un ente oficial como el ICA, la notificación del caso debe hacerse de manera inmediata ante el médico veterinario del ICA, el centro diagnóstico del ICA de su región o ante el técnico Fenavi –Fonav el cual debe presentarse en un máximo de 24 horas desde la notificación. Se permite el ingreso del ente oficial a la producción y se aporta la información necesaria como el tiempo transcurrido desde el inicio del episodio hasta el momento de la notificación, el cual debe ser el menor tiempo posible. Frente a una sospecha de Newcastle todos los involucrados de la cadena avícola deben de maximizar sus normas de bioseguridad (24).

Se debe tener en cuenta que el virus de Newcastle tiene un periodo de incubación que puede variar desde 2 hasta 15 días, debido a esto la cuarentena debe durar mínimo 15 días (38). La cuarentena es una estrategia sanitaria protectora, implementada para ayudar a evitar la diseminación de las enfermedades infecciosas, debe ser realizada tanto en animales vivos como en los productos, subproductos, residuos orgánicos de origen aviar, vehículos y personas. Esta medida sanitaria se basa en la observación de animales enfermos, animales aparentemente sanos pero expuestos a la infección y a la restricción de transporte de aves, sus productos o subproductos. La cuarentena será realizada por el ICA de acuerdo con las normas y teniendo en cuenta que: Se debe implementar mínimo 24 horas después del diagnóstico confirmativo de la enfermedad; el propietario, veterinario o responsable de la granja debe estar al tanto de la cuarentena; cuando ya se ha comunicado la cuarentena a el ente oficial la resolución será firmada y entregada al propietario; se debe garantizar el cumplimiento estricto de la cuarentena y se debe asegurar el área sin perjudicar producciones vecinas. A la hora de instalar la cuarentena se debe de tener en cuenta ciertas disposiciones como: la restricción de movilización de aves que presenten signos patognomónicos o que presenten alta mortalidad; se debe minimizar el ingreso de vehículos a la producción, desinfectarlos previamente en la entrada y la salida; no se permite el ingreso de personal que no labore en la producción;

los operarios o veterinario de la granja no debe visitar otras producciones (24,51); se debe maximizar las normas de bioseguridad; no se permite la salida de la mortalidad de la producción, esta se eliminara técnicamente ya sea por compostaje, incineración o entierro; solo se permitirá el movimiento de alimento procedente de granjas positivas el cual no debe salir más de 3 km del área intervenida; hacer limpieza y desinfección del galpón después de haber retirado la gallinaza que debe pasar un proceso de sanitización; en este momento inicia el vacío sanitario el cual debe durar de 15 a 21 días (24).

El objetivo de este proyecto fue recopilar información sistemática actualizada y redactar un documento donde se dé a conocer información sobre el virus, su manejo y como llegar a un posible diagnóstico confirmativo de la enfermedad de Newcastle. Esto debido a que es una enfermedad que no ha sido erradicada totalmente en Colombia y se quiere dar a conocer información sobre el virus, sus técnicas diagnósticas, su control y manejo.

### **Materiales y métodos**

Se usaron las siguientes bases de datos para la recolección de información: Scielo, Science Direct, Scopus y Google academic, Utilizando los conectores booleanos “and”, “or” y “not”. Se tuvo acceso a Science Direct y scopus, gracias a las bases de datos suscritas en la Universidad Tecnológica de Pereira. El criterio de exclusión que se tuvo en cuenta fue, implementar artículos de los últimos 12 años. Para la redacción del documento se usaron dos computadores con la aplicación Microsoft Word y las citas bibliográficas se realizaron mediante la aplicación Mendeley con el estilo Vancouver.

Para la búsqueda de información se utilizaron las siguientes palabras clave: Control, enfermedad de Newcastle; *Paramyxovirus*, producción avícola, Pruebas de Laboratorio; Control, Newcastle disease, Laboratory test, *Paramyxovirus*, poultry production.

En la tabla número 5 se dara a conocer las referencias bibliograficas según el tema:

Tabla 5: referencias bibliograficas según el tema

Pruebas diagnósticas		Autor
ELISA		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu X, Bahl J, Afonso CL; 2016</li> <li>• Cajacuri C; 2014</li> </ul>
Inhibición de hemaglutinación		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu X, Bahl J, Afonso CL; 2016</li> <li>• ICA; 2009</li> <li>• Perozo F, Villegas P, Alvarado I, Estévez C, Rivera S; 2006</li> </ul>
Histopatología		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu X, Bahl J, Afonso CL; 2016</li> <li>• Cajacuri C; 2014</li> </ul>
Diagnóstico directo		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu X, Bahl J, Afonso CL; 2016</li> </ul>
Aislamiento viral		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Botero H;2006</li> <li>• ICA; 2009</li> <li>• Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu X, Bahl J, Afonso CL; 2016</li> </ul>
Pruebas moleculares		<ul style="list-style-type: none"> <li>• ICA; 2009</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu X, Bahl J, Afonso CL; 2016</li> <li>• Marks F, Rodenbusch C, Okino C, Hein H, Costa E, Machado G,; 2014</li> </ul>
RT-PCR		<ul style="list-style-type: none"> <li>• ICA; 2009</li> <li>• Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu X, Bahl J, Afonso CL; 2016</li> <li>• Villegas P; 2015</li> </ul>
Inmunohistoquímica		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kapczynski R, Afonso L, Miller J; 2013</li> <li>• Cajacuri C; 2014</li> <li>• Yin Y, Cortey M, Zhang Y, Cui S, Dolz R, Wang J; 2011</li> </ul>
Pruebas biológicas		<ul style="list-style-type: none"> <li>• OIE; 2016</li> <li>• Botero H;2006</li> <li>• Olaya J, Gómez A, Alvares D, Soler D, Romero J, Villamil L; 2010</li> </ul>
Vacunación		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Santander A, Álvarez D, Jaimes J, Gómez A, Villamil L; 2014</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cajacuri C; 2014</li> <li>• ICA; 2009</li> <li>• OIE; 2012</li> <li>• OIE; 2016</li> <li>• Liu H, Zhang P, Wu P, Chen S, Mu G, Duan X; 2013</li> <li>• Villegas P; 2015</li> <li>• Li B, Ye J, Lin Y, Wang M, Jia R, Zhu J; 2014</li> <li>•</li> </ul>
Manejo		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dai C, Kang H, Yang W, Sun J, Liu C, Cheng G; 2015</li> <li>• Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu X, Bahl J, Afonso CL; 2016</li> <li>• Cajacuri C; 2014</li> </ul>
Epidemiologia		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nath B, Barman NN, Kumar S; 2015</li> <li>• Al-Garib S, Gielkens A, Gruys E, Koch G, Article O, Bell J; 2011</li> <li>• Miller P, Dimitrov K, Williams-Coplin D, Peterson M, Pantin-</li> </ul>

		<p>Jackwood M, Swayne D; 2015</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sosa Franco J; 2014</li> <li>• ICA; 2009</li> <li>• Ganar K, Das M, Sinha S, Kumar S; 2014</li> <li>• Araujo RJ; 2011</li> <li>• Umali D V, Ito H, Kato H, Ito T; 2014</li> <li>• Shekaili T A, Clough H, Ganapathy K, Baylis M; 2015</li> <li>• Kim B, Lee D, Kim M, Jang J, Lee Y, Park J; 2012</li> </ul>
virus		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Carrasco A, Seki M, Benevenuto J, Ikeda P, Pinto A; 2016</li> <li>• Villegas P; 2015</li> <li>• Miller PJ, Decanini EL, Afonso CL; 2010</li> <li>• OIE; 2012</li> <li>• Sosa Franco J; 2014</li> </ul>

## **Resultados y discusión**

Newcastle es un virus que afecta un amplio número de especies de aves en los cuales la OIE afirma que afecta más de 200 especies de aves (23), sin embargo otros autores argumentan una cifra más exacta, afectando 250 especies de aves (43). Según la OIE Newcastle tiene un periodo de incubación de 21 días (19), pero otros autores afirman que Newcastle tiene un periodo de incubación entre 3 y 8 días (18,20,24), aunque se ha reportado en algunas especies de aves periodos de incubación hasta de 25 días (43).

## **Conclusiones y recomendaciones**

Newcastle es un virus letal que no tolera un inadecuado manejo de bioseguridad y vacunación, lo que conlleva a grandes pérdidas económicas. Este virus no se puede diagnosticar con una necropsia. Se debe diferenciar principalmente con Influenza Aviar. Para su diagnóstico las pruebas más implementadas son Elisa, Inhibición de la Hemaglutinación, aislamiento viral, pruebas biológicas y actualmente se están implementando pruebas de histoquímica. Para su control postvacunal la técnica más utilizada es Elisa, ya que es ideal tener un control de la vacuna y verificar que el ave haya tenido una adecuada respuesta inmune. Se recomienda tener máxima bioseguridad, seguir la normatividad en cuanto a las vacunaciones sobre esta enfermedad y si considera un lote de aves sospechoso se debe hacer una notificación inmediata al ICA en Colombia o ente oficial correspondiente, así este se encargara y contribuirá con evitar la diseminación de este virus letal.



## Bibliografía

1. Santander Torres AF, Álvarez Espejo DCM, Jaimes-Olaya JA, Gómez Ramírez AP, Villamil Jiménez LC. Design of recombinant vaccines for Gumboro, Newcastle and Avian Infectious Laryngotracheitis. *CES Med Vet y Zootec*. 2014;9(2):262–80.
2. Republica L. Avicultura sacó la cara por el sector. Editorial El Globo. 2013. p. 1.
3. Avila F. Balance avícola 2015 y expectativas 2016. especial perspectivas. 2016;6–22.
4. FENAVI. El sector avícola vale \$14.8 billones. *Avicultores* N° 233. 2015 Dec;1–60.
5. Nath B, Barman NN, Kumar S. Molecular characterization of Newcastle disease virus strains isolated from different outbreaks in Northeast India during 2014-15. *Microb Pathog* [Internet]. 2016;91:85–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2015.11.026>
6. Al-Garib SO, Gielkens ALJ, Gruys E, Koch G, Article O, Bell JG, et al. Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination. *Virology* [Internet]. 2011;40(2):37–42. Available from: <http://www.virologyj.com/content/11/1/211> \n84231076\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\_uids=7518987\nhttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170215001409\nhttp://journals.plos.org/plosone
7. Farooq M, Saliha U, Munir M, Khan QM. Biological and genotypic characterization of the Newcastle disease virus isolated from disease outbreaks in commercial poultry farms in northern Punjab, Pakistan. *Virol Reports* [Internet]. 2014;3:30–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virep.2014.10.002>
8. Miller PJ, Dimitrov KM, Williams-Coplin D, Peterson MP, Pantin-Jackwood MJ, Swayne DE, et al. International Biological Engagement Programs Facilitate Newcastle Disease Epidemiological Studies. *Front public Heal* [Internet]. 2015;3:235. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4609827&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

9. Angulo E. Enfermedad de Newcastle Aviar. Virbac al dia publicacion trimestral N°12. 2012;12(1):1–8.
10. Miller PJ, Haddas R, Simanov L, Lublin A, Rehmani SF, Wajid A, et al. Identification of new sub-genotypes of virulent Newcastle disease virus with potential panzootic features. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2015;29:216–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.032>
11. Cattoli G, Susta L, Terregino C, Brown C. Newcastle disease a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *J Vet Diagnostic Investig* [Internet]. 2011;23(4):637–56. Available from: <http://vdi.sagepub.com/content/23/4/637>  
<http://vdi.sagepub.com/content/23/4/637>  
[.long\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21908305](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21908305)
12. Botero H. Experiencias de Campo en el Manejo y Control de Cepas Altamente Patógenas de la Enfermedad de Newcastle. XI Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar. 2006.
13. Siddique N, Naeem K, Abbas MA, Ali Malik A, Rashid F, Rafique S, et al. Sequence and phylogenetic analysis of virulent Newcastle disease virus isolates from Pakistan during 2009-2013 reveals circulation of new sub genotype. *Virology*. 2013;444(1-2):37–40.
14. Carrasco A de OT, Seki MC, Benevenuto JL, Ikeda P, Pinto AA. Experimental infection with Brazilian Newcastle disease virus strain in pigeons and chickens. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2016;47(1):231–42. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838215000350>
15. Briceño EJ, Rodríguez NJ, Rodríguez SP. Seroprevalencia de la enfermedad de Newcastle en gallos de pelea (*Gallus gallus*) del municipio de Saboya, Boyaca. *Fac ciencias agrarias*. 2012;2:1–10.

16. Jaimes JA, Gómez AP, Álvarez DCM, Soler D, Romero JR, Villamil LC. Las enfermedades infecciosas y su importancia en el sector avícola. *Revista de Medicina Veterinaria*. 2010;20:13.
17. Sanchez VM. Aplicación de técnicas moleculares para la detección de contaminación con otros agentes virales en vacunas de newcastle. Universidad Javeriana; 2013.
18. Villegas P. Newcastle Epidemiología y Estrategias de Control. *aviNews*. 2015 Nov;66–82.
19. OIE. Infección por el virus de la enfermedad de newcastle. *Recom Apl a las enfermedades la lisa la OIE y a otras enfermedades importantes para el Comer Int*. 2016;2:1–12.
20. Araujo RJ. Enfoque Zoonótico de la Enfermedad de Newcastle. *Revista del colegio de medicos veterinarios del estado de lara*. 2011;(0251):1–6.
21. OIE. Newcastle disease. Aetiology, epidemiology, diagnosis, prevention and control references. 2013;1–6.
22. Cuello S, Armando V, Noda J. Actualización sobre la enfermedad de Newcastle. 2011;12:1–30.
23. OIE. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). *Man las pruebas diagnostico y las vacunas para los Anim Terr Version Adopt en la Asam Mund Deleg la OIE en mayo del 2012*. 2012;1–20.
24. ICA. Guía para la prevención, control y erradicación de la enfermedad de Newcastle. 2009 Dec;1–78.
25. Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu X, Bahl J, Afonso CL. Infection , Genetics and Evolution Temporal , geographic , and host distribution of avian paramyxovirus 1 ( Newcastle disease virus ). *MEEGID [Internet]*. 2016;39:22–34. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.008>

26. Ganar K, Das M, Sinha S, Kumar S. Newcastle disease virus : Current status and our understanding. *Virus Res* [Internet]. 2014;184:71–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.02.016>
27. Sosa Franco JE. Enfermedad de Newcastle. 2014. p. 1.
28. ICA. Notificaciones 2016. Boletín epidemiológico semanal-ICA semana 22 del 2016. 2016. p. 1.
29. ICA. Casos de alta patogenicidad 2016. Boletín epidemiológico semanal-ICA semana 22 del 2016. 2016.
30. Romero M, Narvaez W, Sanchez J. Enfermedad de Newcastle en Aves de Traspatio del Eje Cafetero Colombiano. 2009;14(2):1705–11.
31. Barin A, Arabkhazaeli F, Rahbari S, Madani SA. The housefly, *Musca domestica*, as a possible mechanical vector of Newcastle disease virus in the laboratory and field. *Med Vet Entomol*. 2010;24(1):88–90.
32. Umali D V, Ito H, Kato H, Ito T. Surveillance of avian paramyxovirus in migratory waterfowls in the San-in region of western Japan from 2006 to 2012. *J Vet Med Sci* [Internet]. 2014;76(3):423–30. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4013370&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
33. Hoque MA, Burgess GW, Karo-Karo D, Cheam AL, Skerratt LF. Monitoring of wild birds for Newcastle disease virus in north Queensland, Australia. *Prev Vet Med* [Internet]. 2012;103(1):49–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.08.013>
34. Gaikwad S, Kim J-Y, Lee H-J, Jung SC, Choi K-S. Genetic characterization and evolutionary analysis of Newcastle disease virus isolated from domestic duck in South Korea. *Gene* [Internet]. 2016;579(1):34–40. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111915015383>

35. Kim BY, Lee DH, Kim MS, Jang JH, Lee YN, Park JK, et al. Exchange of Newcastle disease viruses in Korea: The relatedness of isolates between wild birds, live bird markets, poultry farms and neighboring countries. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2012;12(2):478–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.004>
36. Shekaili T AI, Clough H, Ganapathy K, Baylis M. Sero-surveillance and risk factors for avian influenza and Newcastle disease virus in backyard poultry in Oman. *Prev Vet Med*. 2015;122(1-2):145–53.
37. Marks FS, Rodenbusch CR, Okino CH, Hein HE, Costa EF, Machado G, et al. Targeted survey of Newcastle disease virus in backyard poultry flocks located in wintering site for migratory birds from Southern Brazil. *Prev Vet Med* [Internet]. 2014;116(1-2):197–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.06.001>
38. Molia S, Traoré I, Kamissoko B, Diakité A, Sanogo M, Diarra K, et al. Acta Tropica Characteristics of commercial and traditional village poultry farming in Mali with a focus on practices influencing the risk of transmission of avian influenza and Newcastle disease. *Acta Trop* [Internet]. 2015;150:14–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.015>
39. Dai C, Kang H, Yang W, Sun J, Liu C, Cheng G, et al. O-2-Hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan nanoparticles for the delivery of live Newcastle disease vaccine. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2015;130:280–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.008>
40. Gogoi P, Ganar K, Kumar S. Avian Paramyxovirus: A Brief Review. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2015;
41. Das M, Kumar S. Recombinant phosphoprotein based single serum dilution ELISA for rapid serological detection of Newcastle disease virus. *J Virol Methods*

[Internet]. 2015;225:64–9. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.09.003>

42. Liu H, Zhang P, Wu P, Chen S, Mu G, Duan X, et al. Phylogenetic characterization and virulence of two Newcastle disease viruses isolated from wild birds in China. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2013;20:215–24. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.021>
43. The Center for Food Security and Public Health. Enfermedad de Newcastle. *Código Sanit para Anim Terr*. 2010;1–15.
44. Miller PJ, Decanini EL, Afonso CL. Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. Vol. 10, *Infection, Genetics and Evolution*. 2010. p. 26–35.
45. Li B, Ye J, Lin Y, Wang M, Jia R, Zhu J. Selection and characterization of single-chain recombinant antibodies against phosphoprotein of newcastle disease virus. *Biologicals*. 2014;42(5):285–9.
46. Takahashi T, Takano M, Agarikuchi T, Kurebayashi Y, Minami A, Otsubo T, et al. A novel method for detection of Newcastle disease virus with a fluorescent sialidase substrate. *J Virol Methods* [Internet]. 2014;209:136–42. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.09.010>
47. Kapczynski DR, Afonso CL, Miller PJ. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2013;41(3):447–53. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.012>
48. Parks GD, Alexander-Miller MA. Paramyxovirus activation and inhibition of innate immune responses. *J Mol Biol* [Internet]. 2013;425(24):4872–92. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.015>
49. Gopinath VP, Raj GD, Raja A, Kumanan K, Elankumaran S. Rapid detection of Newcastle disease virus replication in embryonated chicken eggs using quantitative real time polymerase chain reaction. *J Virol Methods* [Internet].

2011;171(1):98–101. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.10.007>

50. Chaka H, Thompson PN, Goutard F, Grosbois V. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays and a haemagglutination inhibition tests for the detection of antibodies to Newcastle disease virus in village chickens using a Bayesian approach. *Prev Vet Med* [Internet]. 2015;119(1-2):21–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.01.016>
51. Mossos N, Peña N, Correa R. Guía metodológica para la definición y atención de focos de la enfermedad de Newcastle. [Internet]. 2004. 49 p. Available from: <http://www.ica.gov.co/getattachment/53914567-3536-4737-9824-ed14e9d015dd/Publicacion-1.aspx>
52. Cajacuri C. Concordancia entre las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (hi) y Elisa, en la detección de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle en pollos de engorde. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
53. Barasoain JA. El virus de la enfermedad de Newcastle : Modelo de interacción virus-célula y vector de expresion. Universidad de Salamanca; 2009.
54. Perozo F, Villegas P, Alvarado I, Estévez C, Rivera S. Utilization de las tarjetas FTA® para el diagnóstico molecular del virus de la enfermedad de Newcastle en muestras de fluido alantoideo. 2006;XVI:118–23.
55. Abdelwhab EM, Lüscho D, Harder TC, Hafez HM. The use of FTA® filter papers for diagnosis of avian influenza virus. *J Virol Methods* [Internet]. 2011;174(1-2):120–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.03.017>
56. Zhang L, Pan Z, Geng S, Chen X, Hu S, Liu H, et al. Sensitive, semi-nested RT-PCR amplification of fusion gene sequences for the rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus. *Res Vet Sci* [Internet]. 2010;89(2):282–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.02.007>

57. Liu H, Zhao Y, Zheng D, Lv Y, Zhang W, Xu T, et al. Multiplex RT-PCR for rapid detection and differentiation of class I and class II Newcastle disease viruses. *J Virol Methods* [Internet]. 2011;171(1):149–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.10.017>
58. Desingu PA, Singh SD, Dhama K, Kumar VR V, Singh R, Singh RK. A rapid method of accurate detection and differentiation of Newcastle disease virus pathotypes by demonstrating multiple bands in degenerate primer based nested RT-PCR. *J Virol Methods* [Internet]. 2015;212:47–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.11.005>
59. Balogh A, Pap M, Markó L, Koloszar I, Csatóry LK, Szeberényi J. A simple fluorescent labeling technique to study virus adsorption in Newcastle disease virus infected cells. *Enzyme Microb Technol*. 2011;49(3):255–9.
60. Yin Y, Cortey M, Zhang Y, Cui S, Dolz R, Wang J, et al. Molecular characterization of Newcastle disease viruses in Ostriches (*Struthio camelus* L.): Further evidences of recombination within avian paramyxovirus type 1. *Vet Microbiol*. 2011;149(3-4):324–9.
61. Dortmans JCFM, Peeters BPH, Koch G. Newcastle disease virus outbreaks: Vaccine mismatch or inadequate application? *Vet Microbiol* [Internet]. 2012;160(1-2):17–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.003>
62. Kumar S. Newcastle disease virus outbreaks in India: Time to revisit the vaccine type and strategies. *Vaccine* [Internet]. 2015;33(29):3268–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.003>
63. Dortmans JCFM, Venema-Kemper S, Peeters BPH, Koch G. Field vaccinated chickens with low antibody titres show equally insufficient protection against matching and non-matching genotypes of virulent Newcastle disease virus. *Vet Microbiol* [Internet]. 2014;172(1-2):100–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.05.004>



64. Ge J, Liu Y, Jin L, Gao D, Bai C, Ping W. Construction of recombinant baculovirus vaccines for Newcastle Disease Virus and an assessment of their immunogenicity. *J Biotechnol* [Internet]. 2016;231:201–11. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165616301444>
65. Cardenas-Garcia S, Diel DG, Susta L, Lucio-Decanini E, Yu Q, Brown CC, et al. Development of an improved vaccine evaluation protocol to compare the efficacy of Newcastle disease vaccines. *Biologicals* [Internet]. 2015;43(2):136–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2014.11.003>
66. ICA. Registro de productos o licencia de venta de Biológicos Veterinarios con Registro Vigente a 16 de Septiembre de 2013 Dirección Técnica de Inocuidad e Insumos Veterinarios. 2013.