

REDVET Rev. electrón. vet. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> -<http://revista.veterinaria.org>
Vol. 12, Nº 6 Junio/2011– <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n120611.html>

Actualización sobre la enfermedad de Newcastle

Cuello, Sandra; Vega Armando y Noda Julia

Laboratorio de Virología Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10 San José de las Lajas, La Habana Cuba.

Contacto: sandra@censa.edu.cu

Resumen

La enfermedad de Newcastle es causada por el serotipo 1 de los paramixovirus aviares que pertenece al género Avulavirus de la subfamilia Paramyxovirinae, familia Paramyxoviridae. Incluida por la OIE en la lista de enfermedades de declaración obligatoria debido a que se considera la principal amenaza para la avicultura mundial por las graves pérdidas económicas que produce principalmente en el pollo. Los animales afectados pueden presentar desde una enfermedad inaparente hasta un cuadro clínico fulminante. Los signos clínicos y las lesiones patológicas por sí solos sugieren la presencia de la enfermedad pero no son patognómicos y requieren del aislamiento o la demostración directa de la presencia del virus y posterior caracterización patogénica como diagnóstico confirmativo. La serología se utiliza fundamentalmente en la evaluación de programas de vacunación y en la vigilancia epizootiológica en zonas de riesgo. En el control de la enfermedad se utiliza la combinación de medidas de bioseguridad junto con la aplicación de vacunas vivas e inactivadas que protegen a las aves de la enfermedad clínica severa y disminuyen la excreción viral.

Palabras claves: Enfermedad de Newcastle, diagnóstico, control

Abstract

Newcastle disease is caused by avian paramyxovirus type 1 of the genus Avulavirus belonging to subfamily Paramyxovirinae, family Paramyxoviridae, include in the OIE list of diseases of obligatory declaration. This disease is considered the main threat to poultry industry worldwide due to the serious economic losses produced mainly in chickens. The affected animals main show from a non-apparent disease to a fulminant clinical picture. The clinical signs and the pathological lesions suggest the disease but as they are not pathognomonic, the virus isolation or the direct demonstration of the virus and further pathogenic characterization are required as confirmative diagnostic. Serologic is mainly used for the evaluation of vaccination programs and the epidemiological surveillance in risk zones. For the control of the

disease a combination of biosafety measures together with the vaccination using live or inactivated vaccines is used for protecting poultry from severe clinical disease and diminishing viral excretion.

Key Words: Newcastle disease, diagnostic, control

Introducción

El desarrollo de la industria avícola como fuente de producción de alimentos constituye una de las principales actividades realizadas por el hombre a nivel mundial debido a que cuenta con un ciclo corto de explotación, buena conversión y permite disponer de huevo y carne. Sin embargo, esta producción está seriamente amenazada por la ocurrencia de enfermedades infecciosas, entre las que se encuentra la enfermedad de Newcastle (EN) en su forma virulenta (Alexander, 2001), que ocasiona graves pérdidas económicas.

La EN se reportó por primera vez en 1926 y a partir de este momento se diseminó por todo el mundo siendo actualmente endémica en muchos países (OIE, 2008). Es causada por el paramixovirus aviar tipo 1 (APMV-1) que afecta más de 200 especies de aves, incluido el pollo (Alexander, 1997; Gruñid y col., 2002; Kapczynski y Tumpey, 2003). Este virus (APMV-1) junto con otros ocho serotipos de paramixovirus aviares conforman el género Avulavirus de la familia Paramyxoviridae (Mayo, 2002).

El curso de la enfermedad en las aves puede variar desde forma subclínica hasta moderado a severo con alta mortalidad dependiendo principalmente de la virulencia de la cepa circulante y de la susceptibilidad de la especie infectada (Alexander, 2001 y 2003). En su forma severa está reconocida como la principal amenaza para la avicultura mundial, por las considerables pérdidas económicas asociadas tanto a la alta mortalidad, al sacrificio sanitario que se realiza para evitar una mayor diseminación de la enfermedad, así como, por las restricciones en el comercio de aves y productos avícolas desde y hacia la región afectada. Por su gravedad forma parte de la lista de enfermedades de notificación obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2004).

El método de control de esta enfermedad se basa, fundamentalmente, en el cumplimiento de un riguroso programa de bioseguridad unido a la aplicación de esquemas de vacunación que incluyen tanto a la progenie como a las reproductoras (Alexander, 1997; Czeglédi y col., 2003).

El diagnóstico de la EN sobre las base de los signos clínicos y alteraciones patológicas sólo es presuntivo por lo que es necesario, para su confirmación, realizar el diagnóstico de laboratorio, que involucra tanto las técnicas virológicas convencionales como las técnicas moleculares. El diagnóstico

serológico se utiliza fundamentalmente en la evaluación de los programas de vacunación y en la vigilancia epizootiológica en aves centinelas ubicadas en zonas de riesgo.

En Cuba la enfermedad fue descrita por primera vez por Pérez (1953) e incidió indistintamente en las crianzas especializadas como en las de patios particulares en todo el país. En 1962 se producen brotes de la enfermedad y se introduce la vacunación con vacuna inactivada, la cual no impidió la presentación de un brote en 1973. Esto motivó la introducción de la vacuna viva a principios del año 1980 y llevar a la práctica una nueva estrategia de inmunización que incluía la vacunación de toda la población avícola comercial, evaluación de la efectividad de la vacunación mediante el monitoreo serológico de las aves vacunadas y el estudio de anticuerpos de las aves en zonas de riesgo con lo cual la enfermedad se ha mantenido bajo control, Viamontes, 1984; Lemes, 1990 y Viamontes, 2003).

Objetivo

El presente trabajo tiene como objetivo hacer una compilación de parte de los conocimientos publicados hasta el momento sobre esta enfermedad, así como, su agente etiológico, bases moleculares de la patogenicidad, entre otros aspectos de interés con particular énfasis en el diagnóstico y control.

Historia

En 1926, se reporta una enfermedad altamente contagiosa y mortal de las gallinas en dos lugares diferentes del mundo, las Islas de Java, Indonesia y en la localidad de Newcastle-on-Tyne, Inglaterra.

Sin embargo, existían reportes de brotes de una enfermedad similar en Corea en 1924 y en Europa Central antes de 1926 (Alexander, 2001). Aunque se desconocía el agente causal, Doyle (1927) pudo establecer la diferenciación con la peste aviar mediante el empleo de pruebas de inmunidad y el virus recibió el nombre de virus de la enfermedad de Newcastle por el lugar donde se aisló.

Posteriormente, la enfermedad se difundió con rapidez a Filipinas, China, Japón, Corea, Australia, España y parte de África. En 1935, llega a la costa norteamericana del Pacífico y después de 1940 se difunde al resto de América, Egipto y todos los países de Europa (Schmidt, 1988). A partir de este momento se notifica la presencia de brotes de la enfermedad en todos los continentes excepto Oceanía (Alexander, 1997; Aldous y Alexander, 2001).

Se considera que se han presentado cuatro o más panzootias de la enfermedad (Alexander, 2001; Abolnik y col., 2004). La primera, abarcó desde el brote inicial en 1926 hasta cerca de los años 60, y se originó en el sudeste asiático con una lenta diseminación hacia Europa. La segunda, a diferencia de la primera, tuvo una rápida diseminación y comenzó a finales de

los años 60 hasta el año 1973. La difusión más rápida de la enfermedad en estos años estuvo influenciada por el mayor desarrollo de la industria avícola, con un considerable aumento en el comercio internacional (Alexander, 1997). El virus responsable de esta panzootia estuvo asociado con la importación de psitácidas (Walker y col., 1973; Francis, 1973), la cual provocó el desarrollo de vacunas y medidas para la protección de la industria avícola, entre las cuales se incluían nuevas regulaciones para la importación de aves exóticas (Alexander, 1997).

La tercera panzootia se inició a finales de los años 70 en el medio Oriente. La especie de ave inicialmente afectada fue la paloma doméstica, que no había sido considerada importante en la epizootiología de la enfermedad, lo que posibilitó una rápida diseminación de la EN a Europa y otras partes del mundo debido al contacto entre aves de competencia y ornamentales y al gran comercio internacional con tales aves (Biancifiori y Fioroni, 1983; Alexander, 1997). La diseminación de la enfermedad a los pollos produjo en Europa numerosos brotes como resultado de la comida contaminada por heces de palomas infectadas (Alexander y col., 1985a).

En la actualidad, se reconoce que la enfermedad se mantiene controlada, pero de forma enzoótica en esta especie, en muchos de los países afectados (Barbezange y Jestin, 2003a).

Desde finales del año 1996 hasta la actualidad se han presentado numerosos brotes de la enfermedad en diversas partes del mundo, que según varios autores (Cueto y col., 2001; Alexander 2001; Abolnik y col., 2004; FAO, 2004), constituyen elementos suficientes para que se les considere la cuarta panzootia de Newcastle, la cual afectó además de muchos países, a Australia, país que era libre de la enfermedad desde los años 1930-1932 (Kirkland, 2000; Westbury, 2001). En el continente americano durante el último lustro se han reportado brotes de la enfermedad en la industria avícola comercial en México, Honduras, Colombia, Venezuela, en varios estados de los Estados Unidos y en Canadá (Senne, 2003; Pedersen y col., 2004; HandiStatus II, 2004; Toro y col., 2005).

Distribución geográfica

El amplio uso de la vacunación para el control de la EN constituye una evidencia de la extensa difusión de la enfermedad a nivel mundial. Esto, unido a su forma de diseminación dificulta determinar su distribución geográfica, la cual depende también de las medidas tomadas por los diferentes países para el control y erradicación de la misma. La enfermedad está ampliamente diseminada en muchos países de Asia, África y América; solo algunos países de Oceanía parecen estar relativamente libres de la misma (Alexander, 1997; Aldous y Alexander, 2001; FAO, 2004).

Actualmente se reporta en el continente euroasiático, africano, americano, australiano (Nolou, 2003; Abolnik y col., 2004; Pedersen y col., 2004) donde ha ocasionado pérdidas considerables por la mortalidad que produce y por el sacrificio sanitario aplicado para evitar una mayor diseminación de la enfermedad, así como, las restricciones en el comercio de aves.

Importancia económica

Su importancia económica radica en ser una de las enfermedades, en su forma patógena, más importante y devastadora que afecta al pollo. La magnitud de este problema a nivel mundial varía debido a la presentación de brotes recurrentes de la EN caracterizados por alta mortalidad y otros donde solo se observan infecciones respiratorias ligeras o en algunos casos sin evidencias clínicas de enfermedad (Alexander, 2003).

Debido a su importancia en el mercado avícola internacional por los brotes que pueden afectar el comercio, la OIE (1999) cambió la definición de la enfermedad que ahora incluye en su reporte infecciones por virus de moderada y de alta virulencia, mientras que la definición anterior solo incluía las infecciones por cepas altamente patógenas (King, 2004).

Agente etiológico

El virus de la enfermedad de Newcastle (VEN) está situado dentro del género Avulavirus subfamilia Paramyxovirinae, familia Paramyxoviridae, orden Mononegavirales, (Li y col., 2005; Van Regenmortel y col., 2005).

Los virus que pertenecen a esta familia son envueltos y pleomórficos. Generalmente, son redondeados y miden entre 100-150 nm de diámetro. La superficie de la partícula viral presenta proyecciones de aproximadamente 8 nm de longitud. Presenta alrededor de un 20-25% de lípidos derivados de la célula hospedero y cerca de un 6% de carbohidratos. El peso molecular de la partícula es de 500×10^6 daltons, con una densidad en gradiente de sacarosa de 1.18-1.20g/mL (Alexander, 1997). La cápsida tiene simetría helicoidal y el genoma es ácido ribonucleico (ARN), no segmentado, de simple cadena y polaridad negativa (Westover y Hughes, 2001; Pedersen y col., 2004).

Los Paramyxovirus aislados de las aves (APMV) han sido clasificados por inhibición de la hemaglutinación (IHA) en 9 serotipos, designados APMV-1 hasta el APMV-9. El VEN, aunque produce una variedad de signos clínicos en las aves, todas las cepas del virus forman un grupo antigénico homogéneo, que ha sido designado como APMV-1 (Alexander, 1997; King, 2004). Sin embargo, el Paramyxovirus tipo 1 que afecta a las palomas (PPMV) se diferencia antigénicamente de los APMV-1 clásicos por tener un patrón característico de reacción frente a anticuerpos monoclonales (Alexander y col., 1984, Duchatel y Vindevogel, 1986; Lana y col., 1988), lo que lo identifica como variante antigénica de APMV-1.

Organización del genoma viral

El ARN de aproximadamente 15 186 nucleótidos (de Leeuw y Peeters, 1999; Romer-Oberdorfer y col., 1999) tiene 6 genes, NP, P, M, F, HN, L, en el orden 3´-5´, que codifican a su vez para las proteínas estructurales y no estructurales: la nucleoproteína (NP), la proteína fosforilada (P), la ARN polimerasa ARN dependiente (L), la proteína de la matrix (M), no glicosilada, que forma la capa interna de la envoltura manteniendo su estructura e integridad, la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) (Huang y col., 2003; Mebatsion y col., 2003).

El gen L tiene 6 regiones altamente conservadas consideradas esenciales para la actividad enzimática de la polimerasa (Poch y col., 1990), es el más conservado de los genes virales (Locke y col., 2000; Seal y col., 2000) y es el último que se transcribe del genoma. Su producto, la proteína L es la menos abundante en la partícula viral y en asociación con la proteína P constituyen la polimerasa viral activa (Wise y col., 2004).

La nucleoproteína (NP), codificada por el gen NP, (Errington y Emmerson, 1997), es esencial para la replicación viral y las diferencias encontradas entre las proteínas NP de distintos aislados del virus pudieran tener un papel importante en la virulencia individual de las cepas (Seal y col., 2002). Este gen es bien conservado dentro de todos los APMV-1 (Krishnamurthy y Samal, 1998) y es el primero y que más se transcribe durante el ciclo de multiplicación viral (Longhi y Canard, 1999). Su proteína es la que se encuentra en mayor cantidad en la partícula viral y está estrechamente asociada con el ARN genómico formando la nucleocápsida (Seal y col., 2002; Kho y col., 2003; Wise y col., 2004). Asimismo, también están asociadas a la NP, la proteína fosforilada (P), y la ARN polimerasa ARN dependiente (L) y juntas forman la ribonucleoproteína (Nagai y Kato, 1999; Huang y col., 2003). A partir del gen P por el uso alternativo de diferentes marcos de lectura, el VEN transcribe tres ARN mensajeros (ARNm) que codifican para las proteínas P, V y W (Murphy y col., 1999; Mebatsion y col., 2003). La versatilidad funcional de las proteínas V y W han sido investigadas recientemente y se ha demostrado su participación en la transcripción, síntesis, ensamblaje y propagación viral (Uakan y col., 2000; Barou y Barrett, 2000). También se ha confirmado que la proteína V es indispensable para la replicación viral y está relacionada con la patogenicidad debido a que afecta la respuesta del interferón y apoptosis en la célula infectada (Peeters y col., 1999; Mebatsion y col., 2001; Mebatsion y col., 2003). Además, sus niveles de expresión están directamente relacionados con la virulencia del VEN para el embrión de pollo (Romer-Oberdorfer y col., 2003) y al mismo tiempo, está relacionada con el rango de hospedero que afecta este virus, restringiéndolo solamente a las células aviares debido a que la actividad antagonista del interferón es especie específica (Park y col., 2003, 2003a).

Las proteínas HN y F están expuestas como protuberancias en la superficie de

la envoltura del virión y son esenciales para iniciar la infección viral. La HN es la más grande de las moléculas glucoproteicas y tiene actividad hemaglutinante y de elusión (Scheid y Chopping, 1973; Murphy y col., 1999). Esta proteína es la responsable de la unión de las partículas virales a los receptores del ácido siálico de la célula hospedero, actúa como neuraminidasa removiendo los receptores del ácido siálico de la progenie viral para prevenir la aglutinación de las mismas y desempeña un papel importante en la patogenicidad de este virus (Huang y col., 2004).

Estudios realizados en la secuencia de nucleótidos del gen de la HN de diferentes aislados del VEN demostraron que pueden producirse tres genotipos diferentes de HN de acuerdo a la posición del codón de parada dentro del marco de lectura de esta proteína. De acuerdo con esto, durante la traducción se produce una proteína de 616, 577 o 571 aminoácidos. Mientras que la proteína de 616 aminoácidos se sintetiza como un precursor que necesita para activarse biológicamente de un procesamiento proteolítico, las de 577 o 571 aminoácidos no requieren ser segmentados para ser funcionales y están presentes en la mayoría de las cepas del VEN, incluyendo cepas lentogénicas, mesogénicas y velogénicas. Sin embargo, resulta interesante destacar que la HN de 571 aminoácidos se ha encontrado solamente en las cepas velogénicas (Romer-Oberdorfer y col., 2003).

La proteína F es la responsable de la fusión de las membranas celulares y virales durante la penetración (Shengging y col., 2002, Morrison, 2003). Esta proteína es el principal determinante de la patogenicidad del VEN (Collins y col., 1993; Peeters y col., 1999), su actividad es independiente del pH y como resultado de ello las células infectadas que expresan esta proteína viral en su superficie se fusionan con las células adyacentes formando células gigantes multinucleadas, efecto característico de este virus cuando se multiplica en cultivos celulares (Hernández y col., 1996; Morrison, 2003).

Propiedades biológicas

La infectividad del virus puede ser eliminada por tratamientos físicos y químicos tales como el calor, radiaciones, procesos de oxidación, efectos de pH, solventes lipídicos y varios compuestos químicos. La velocidad a la cual es destruida la misma depende de la cepa de virus, el tiempo de exposición, concentración viral, la naturaleza del medio de suspensión y las interacciones entre los tratamientos (Alexander, 1997).

En la médula ósea y músculos de pollos la infectividad de las partículas virales puede ser preservada por más de 6 meses en congelación y por más de 134 días a 4°C. En la piel el virus persiste infectivo por un período de alrededor de 60 días. En restos de animales muertos a temperatura entre los 40-43°C y con una humedad relativa entre el 20-30% la infectividad del virus persiste por al menos 4 semanas (Kouwenhoven, 1993).

Varias actividades biológicas están asociadas con los paramyxovirus, pero las principales y que caracterizan a este virus se relacionan con:

Actividad de Hemaglutinación: La capacidad del VEN de aglutinar eritrocitos es debida a la unión de la proteína HN a los receptores presentes en la superficie de los mismos. Esta propiedad y la inhibición específica de la misma por antisueros constituyen una poderosa herramienta para el diagnóstico de la enfermedad. Las cepas del VEN aglutinan glóbulos rojos de pollos pero también de otras aves, de reptiles, anfibios, ratón, curiel y humanos. Además algunas cepas aglutinan asimismo, eritrocitos de bovinos, ovinos, caprinos, porcino y equinos (Kouwenhoven, 1993; Alexander, 1997).

Actividad de Neuraminidasa: Es producida por el mucopolisacárido N-acetyl neuramínico presente en las partículas del VEN. Después de la unión a los eritrocitos, la neuraminidasa destruye el receptor del ácido siálico y produce la elusión de los mismos. Su función en la replicación viral no se conoce hasta el momento y no se han encontrado variaciones antigénicas entre las neuraminidasa de las diferentes cepas del VEN, por lo tanto no son de interés en el diagnóstico serológico (Kouwenhoven, 1993; Alexander, 1997).

El tiempo de elusión de las partículas virales a 4°C o 37°C y la destrucción de la actividad hemoaglutinante a 56°C son utilizadas en la caracterización de las cepas y son reconocidas como marcadores fenotípicos del VEN, que no están relacionadas con la patogenicidad o virulencia de las cepas (Hanson y Spalatin, 1978; Kouwenhoven, 1993).

Hemólisis y fusión celular: El VEN puede causar la hemólisis de eritrocitos aviares y mamíferos y aunque esta característica no se usa en el diagnóstico puede ser empleada para diferenciar aislados virulentos y avirulentos (Nagai y col., 1976; Kouwenhoven, 1993). También puede producir la fusión de varias células y resultar en la formación de sincitios o células gigantes (Alexander, 1997).

Multiplicación viral

La replicación del virus ocurre completamente en el citoplasma. Luego de la unión del virus a la célula por medio de los receptores glicolipídicos, se produce la fusión de las membranas virales y celulares a pH fisiológico y la nucleocápsida penetra dentro de la célula, donde permanece intacta con sus tres proteínas asociadas. Seguidamente, se activa la ARN polimerasa ARN dependiente para producir varios ARN complementarios de polaridad positiva, que actúan como ARN mensajeros y utilizan los mecanismos celulares para la producción de proteínas virales. Al mismo tiempo, se sintetiza un ARN completo de polaridad positiva que sirve como molde para la replicación del genoma viral de polaridad negativa que se asocia con la nucleoproteína y la transcriptasa para formar la nucleocápsida. La maduración del virión involucra en primer lugar la incorporación en la membrana de la célula hospedero de las

proteínas virales de la envoltura sintetizadas, seguido de la asociación de la proteína M y otras proteínas no glicosiladas con la membrana celular modificada. Posteriormente, se ubica la nucleocápsida bajo la proteína M y ocurre la formación y liberación de los viriones maduros por exocitosis (Alexander, 1997; Murphy y col., 1999).

Las cepas del VEN se multiplican bien en huevos embrionados de gallina y debido a esta propiedad y a los altos títulos virales que se alcanzan en ellos, son utilizados para el aislamiento y propagación del mismo. Las cepas virulentas se diseminan rápidamente por el embrión y producen mortalidad en corto tiempo, mientras que las cepas avirulentas no provocan mortalidad y si la producen, ocurre en un lapso mayor de tiempo después de la inoculación. No obstante, este comportamiento puede variar en función de la vía de inoculación, pues cepas que no producen mortalidad embrionaria al ser inoculadas por la cavidad alantoidea provocan la muerte del embrión al ser inoculadas vía saco vitelino. El tiempo que demora un aislado en producir mortalidad en el embrión de pollo está directamente relacionado con su patogenicidad para el pollo (Kouwenhoven, 1993; Alexander, 1997).

Cultivos celulares de origen aviar y de mamíferos también son utilizados para la multiplicación de las cepas del VEN, pero los bajos títulos virales obtenidos en la mayoría de los sistemas celulares hace que no sean utilizados generalmente (Alexander, 1997). La replicación en cultivos celulares está relacionada con la virulencia de las cepas para los pollos (Hernández y col., 1996; Li y col., 1998; Murphy y col., 1999; Morrison, 2003) y el efecto citopático (ECP) se caracteriza por la formación de sincitios, y la presencia de cuerpos de inclusión citoplasmáticos produciendo finalmente lisis celular. La formación de placas en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) es característico de las cepas velogénicas. Las cepas mesogénicas y lentogénicas forman placas sólo cuando iones magnesio y DEAE o tripsina son añadidos al medio (Alexander, 1997).

Patogenicidad

La patogenicidad de las cepas del VEN varía de acuerdo con el hospedero. En los pollos la enfermedad causada por las diferentes cepas del virus puede variar desde muerte súbita con un 100% de mortalidad hasta una infección subclínica (Huang y col., 2003). La influencia de la especie hospedero en la infección viral puede ser también marcada, por ejemplo, cepas de virus que provocan enfermedad severa en pollos y pavos pueden causar signos leves de enfermedad en patos y gansos (Alexander, 1998).

En los pollos, la patogenicidad de las cepas del VEN está determinada también por la cepa de virus, aunque la dosis, vía de inoculación, edad de los pollos y las condiciones ambientales influyen en la severidad de la enfermedad. Por lo general, los animales más jóvenes sufren la enfermedad más aguda (Alexander, 1997). Las aves infectadas por las vías naturales (nasal, ocular y oral) desarrollan la infección respiratoria (Beard y Easterday, 1967), mientras

que la infección por las vías intramuscular, intravenosa e intracerebral favorece la presencia de signos neurológicos (Beard y Hanson, 1984).

De acuerdo con los signos clínicos que los aislados del VEN producen en los pollos, estos se clasifican en (OIE, 2008):

Velogénica viscerotrópica (ENVV): forma de la enfermedad altamente patógena en la cual predominan las lesiones hemorrágicas intestinales.

Velogénica neurotrópica (ENVN): forma de la enfermedad que se presenta con alta mortalidad, en la cual predominan los signos nerviosos y respiratorios.

Mesogénicas: forma de la enfermedad que se presenta con signos respiratorios, signos nerviosos ocasionales y baja mortalidad.

Lentogénica o respiratoria: forma que se presenta con una infección respiratoria media o subclínica.

Entérica asintomática: Forma que se presenta generalmente como una infección entérica subclínica.

La determinación de la virulencia de los aislados del VEN, según la actual definición de la enfermedad por la OIE (2008), se realiza tanto por la secuenciación nucleotídica y deducción de la secuencia de aminoácidos de la región del péptido conectante de la proteína F como por pruebas de laboratorio in vivo. En la actualidad se recomienda realizar ambas pruebas pues se ha visto que aislados del VEN procedentes de otras especies de aves, como la paloma, muestran resultados discordantes cuando se les realiza la caracterización patogénica (King, 1996; Kommers y col., 2001, 2003, OIE, 2008).

La prueba in vivo recomendada es el índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) en pollitos de 1 día de edad (OIE, 2008). Sin embargo, otras pruebas como el tiempo promedio de muerte embrionaria (TPM), y el índice de patogenicidad intravenoso (IPIV) en pollos de 6-8 semanas de edad también son empleadas (Alexander, 1998; OIE, 2004). Estas pruebas de acuerdo con sus resultados (tabla 1) permiten clasificar las cepas o aislados en cepas asintomáticas, cepas de baja virulencia conocidas como lentogénicas, cepas de virulencia intermedia, conocidas como mesogénicas y las cepas altamente virulentas denominadas velogénicas, que a su vez se dividen en viscerotrópica y neurotrópica (Alexander, 1997, 1998; Panda y col., 2004).

Tabla 1. Patotipos e índices patogenicidad por pruebas Patotip	Rango de índices		
	TPM (horas)	IPIC	IPIV
Velogénico	Menor de 60	1.5- 2.0	2.0-3.0
Mesogénico	60-90	1.0- 1.5	0.0-0.5
Lentogénico	Mayor de 90	0.2-0.5	
Asintomática	Mayor de 90	0.0-0.2	

Algunas modificaciones de estas pruebas (IPIV) han sido realizadas con propósitos específicos, como la inoculación intraoal en pollos de 6-8 semanas de edad para diferenciar cepas velogénicas viscerotrópicas de otras velogénicas. Además otra prueba de laboratorio, como la formación de placas en fibroblastos de embrión de pollo en ausencia y presencia de tripsina, también es utilizada en la determinación de la virulencia de los aislados del VEN (Alexander, 1997,1998).

Bases moleculares de la patogenicidad

Las bases moleculares de la patogenicidad del VEN está determinada principalmente por la secuencia de aminoácidos presente en la región del péptido conectante o sitio de escisión de la proteína F, que proporciona una clara indicación de la virulencia del virus y por ello ha sido incorporada en la definición de la enfermedad (OIE, 2008). Esta proteína durante la replicación es sintetizada como un precursor F0, que es activado por un procesamiento proteolítico post-transcripcional entre los aminoácidos 116 y 117, dando lugar a los fragmentos F1 y F2 para que la progenie viral sea infecciosa (Gould y col., 2001; Zhao y Peeters, 2003; Römer-Oberdörfer y col., 2003).

Las cepas velogénicas y mesógenicas tienen alrededor de la glutamina en la posición 114 múltiples aminoácidos básicos (al menos 3 residuos de arginina o lisina entre las posiciones 113 y 116) en el extremo carboxilo de la proteína F2 y un residuo de fenilalanina en el extremo amino de la proteína F1. Esta estructura en el sitio de escisión de la proteína F0 es el sustrato de la furina, una proteasa intracelular presente en la mayoría de las células del hospedero (Gotoh y col., 1992) que posibilita que el virus se multiplique en diversos órganos y produzca una infección sistémica fatal (Meulemans y col., 2002; Römer-Oberdörfer y col., 2003; Morrison, 2003; Panda y col., 2004).

Excepciones en las secuencias de aminoácidos reportadas para este sitio en aislados virulentos han sido reportadas para aislados de palomas que muestran las secuencias de aminoácidos 112GRQKRF117 y 112RRKKRF117 en el sitio de escisión de la proteína F (Collins y col., 1994; Werner y col., 1999; Huovilainen, 2001). La primera de estas secuencias fue encontrada en los aislados de paloma que produjeron la panzootia de la década del 80 y estudios realizados por Fujii y col. (1999) demostraron que el residuo de arginina (R) de la posición 112 solo es requerido para alcanzar un máximo de eficiencia en el procesamiento proteolítico de esta proteína por la proteasa de la célula hospedero.

Estudios posteriores efectuados por Meulemans y col. (2002) acerca de la evolución de PPMV demostraron que la región del péptido conectante de la proteína F es asequible a la ocurrencia de mutaciones debido en primer lugar, a que el residuo de glicina presente en la posición 112 de los aislados de los años 80 (112GRQKRF117) había sido sustituida por una arginina (R) para los aislados de principios de los años 90 (112RRQKRF117) y en segundo lugar, la simultánea sustitución de la glutamina (Q) de la posición 114 por una arginina

(R) o lisina (K), dando lugar a la presencia de cinco aminoácidos básicos en este sitio (112RRKKRF117), lo cual no es común y que también ha sido reportado para algunos aislados de pollos (Oberdorfer y Werner, 1998; Herczeg y col., 1999).

Por el contrario, las cepas lentogénicas tienen en este sitio dos aminoácidos básicos en las posiciones 113 y 116 del extremo carboxilo de la proteína F2 y una leucina en la posición 117 en el extremo amino de la proteína F1. Las cepas que tienen esta secuencia de aminoácidos en el sitio de escisión de la proteína F0 solamente son escindidas por enzimas extracelulares similares a la tripsina, presentes solo en el tracto respiratorio e intestinal, resultando en una infección localizada (Shengging y col., 2002; Meulemans y col., 2002; Morrison, 2003; Otim y col., 2004).

Características de la enfermedad

El período de incubación de la enfermedad oscila de 2 a 15 días con un promedio entre 5 a 6 días. Entre los signos clínicos que pueden estar asociados con la enfermedad se encuentran problemas respiratorios, circulatorios, gastrointestinales y nerviosos. El predominio de determinadas manifestaciones clínicas depende de la edad y estado inmune del hospedero así como del tropismo y virulencia de la cepa actuante (Alexander, 1997; Murphy y col., 1999). En los animales afectados, se observa generalmente disnea, cianosis de crestas y barbillas, espasmos musculares, pérdida de apetito, indiferencia, sed intensa, debilidad y somnolencia. A nivel del tracto digestivo, se puede observar inflamación del buche, presencia de mucus espumoso y secreción fibrinosa en la faringe y diarrea verde-amarilla. Los signos nerviosos se expresan por parálisis de alas y patas, tortícolis, ataxia o movimientos circulares y convulsiones. En ponedoras ocurre una drástica disminución de la producción de huevos junto con despigmentación y pérdida de la cáscara y una reducción en la calidad de la albúmina (Murphy y col., 1999).

Con cepas de virus muy virulentas la enfermedad puede aparecer súbitamente con alta mortalidad, precedida por lesiones hemorrágicas, signos respiratorios o nerviosos, o en ausencia de signos clínicos (Alexander, 1997; Romer-Oberdorfer y col., 2003). En brotes en pollos debido a virus velogénico viscerotrópico, los signos clínicos frecuentemente comienzan con apatía, aumento de la frecuencia respiratoria y debilidad, concluyendo con la postración y la muerte. También puede causar edema alrededor de los ojos y la cabeza y en las aves que no mueren tempranamente en la infección, puede observarse diarrea verde y antes de la muerte pueden presentarse temblores musculares, tortícolis, parálisis de patas y alas y opistótonos. La mortalidad frecuentemente alcanza el 100% en poblaciones de pollos susceptibles (Alexander, 1997).

La enfermedad velogénica neurotrópica, reportada principalmente en los Estados Unidos, se presenta con la aparición brusca de enfermedad

respiratoria severa seguida en los dos días posteriores por la aparición de signos neurológicos, una drástica disminución de la postura pero sin la presencia de diarrea generalmente. La morbilidad puede llegar al 100% pero la mortalidad es baja, aunque ha sido reportada hasta un 50% en aves adultas y un 90% en aves jóvenes (Alexander, 1997).

Las cepas mesogénicas del VEN generalmente causan enfermedad respiratoria en condiciones de campo. En aves adultas puede provocar una disminución de la postura que dura varias semanas. Pueden presentarse signos nerviosos pero no son comunes. La mortalidad es generalmente baja, excepto en aves muy jóvenes susceptibles que pueden ser considerablemente afectadas por condiciones exacerbantes (Alexander, 1997).

Las cepas lentogénicas pueden causar una infección media o subclínica en el tracto respiratorio o infecciones entéricas (Berinstein y col., 2001). En aves jóvenes susceptibles se pueden presentar serios problemas respiratorios con mortalidad cuando se producen infecciones mixtas (Alexander, 1997).

Patogénesis e Inmunidad

Inicialmente el virus se replica en las mucosas del tracto respiratorio e intestinal. La diseminación de la infección en la tráquea ocurre por la acción de los cilios y por la infección célula a célula. La subsiguiente diseminación del virus depende en gran medida de la virulencia de la cepa. Mientras que las cepas lentogénicas circulan con bajos títulos, las mesogénicas afectan los riñones, pulmones, bazo y la bolsa de Fabricio y las velogénicas se encuentran dentro de las 12-24 horas posinfección (pi) en prácticamente todos los tejidos, con altos títulos en el timo y más bajos en los músculos y el cerebro (Kouwenhoven, 1993, Murphy y col., 1999)

Después de la multiplicación inicial en el sitio de entrada, las cepas velogénicas se difunden por viremia al bazo, hígado, riñones y pulmones donde se interrumpe la multiplicación por 12-24 horas hasta las 36 horas pi y los títulos virales disminuyen. El virus infecta el cerebro antes de que circulen cantidades suficientes de anticuerpos y después que la multiplicación en los tejidos no nerviosos ha cesado (alrededor de las 60 horas pi) y las aves están moribundas (Kouwenhoven, 1993). Durante la segunda multiplicación, después de la interrupción, el virus es nuevamente liberado al flujo sanguíneo, lo cual está asociado con la aparición de los signos generales de la enfermedad y la excreción de virus. En algunas cepas de virus que afectan rápidamente órganos vitales como el riñón y el hígado, las aves pueden morir antes que los signos sean evidentes (Kouwenhoven, 1993).

La secuencia en la cual son infectados los tejidos explica porque los signos nerviosos aparecen después de la presencia de los signos respiratorios, intestinales y generales de la enfermedad. Sin embargo, en las cepas velogénicas neurotrópicas el virus puede estar presente al mismo tiempo en el

sistema nervioso central y en el tracto intestinal y respiratorio (Kouwenhoven, 1993).

La respuesta inmune inicial a la infección con el VEN es mediada por células y puede ser detectada tan temprano como 2-3 días posvacunación con vacuna viva (Timms y Alexander, 1977) lo que explica la temprana protección a la confrontación observada en aves vacunadas antes de que puedan ser detectados anticuerpos (Gough y Alexander, 1973) y evidencia la importancia de esta inmunidad en la respuesta a la vacunación (Agrawal y Reynolds, 1991; Ishikawa, 1992; Sharma, 1999). Sin embargo, se ha demostrado que esta inmunidad sola no protege contra la confrontación con cepas virulentas y los anticuerpos neutralizantes son necesarios para la protección (Reynolds y Maraga, 2000; 2000a), con un efecto cooperativo de ambos tipos de respuestas inmunes que resulta en la prevalencia de los anticuerpos neutralizantes (Ward y col., 2000).

La producción de anticuerpos es rápida, tanto a nivel local como sistémica. En el tracto respiratorio superior se detectan anticuerpos de tipo IgA con pequeñas cantidades de IgG, similar a las reveladas en la glándula de Harder que no permiten la replicación viral en estos órganos (Alexander, 1997). En la respuesta sistémica aparecen en una primera fase los anticuerpos de tipo IgM seguido por la IgG (Kouwenhoven, 1993), los cuales son detectados entre los 4 a 6 días pi y persisten por al menos 2 años (Alexander, 1997; Murphy y col., 1999). El nivel de los títulos de anticuerpos dependen de la cepa de virus que produce la infección, pero generalmente el nivel máximo de la respuesta se alcanza alrededor de la tercera o cuarta semana pi., después de la cual los títulos comienzan a declinar si no se realizan reinmunizaciones (Kouwenhoven, 1993; Alexander, 1997). Estos anticuerpos son transmitidos mediante el saco vitelino a la progenie y la protegen de la enfermedad en las primeras 3-4 semanas de vida sin interferir con el desarrollo de la respuesta local de anticuerpos (Kouwenhoven, 1993; Murphy y col., 1999).

Diagnóstico

En la EN el objetivo del diagnóstico es llegar a la decisión de si es necesario o no tomar medidas de control para evitar la diseminación de la enfermedad. Ninguno de los signos clínicos o lesiones producidos por el VEN son considerados patognomónicos y la amplia variación en las manifestaciones de la enfermedad solo sirven para sugerir que estamos en presencia de la misma. Además, su demostración sin la identificación del aislado viral es raramente una causa adecuada para la toma de medidas de control debido a la presencia de cepas lentogénicas en las poblaciones avícolas en la mayoría de los países por el amplio uso de vacunas vivas. Asimismo, cuando ocurren epizootias devastadoras de la enfermedad que puedan afectar el comercio de los productos avícolas, las medidas de control son tomadas a nivel nacional e internacional (Alexander, 1997; Murphy y col., 1999).

El diagnóstico confirmativo de la enfermedad debe ser realizado sobre la base del aislamiento y la identificación viral (Kouwenhoven, 1993; Alexander, 1997; FAO, 2004) y/o con el empleo de las técnicas moleculares que permitan la detección específica del virus, así como, la determinación de su potencial de virulencia (Barbezange y Jestin, 2002; Creelan y col., 2002; Li y Zhang, 2004, OIE, 2008).

Clínico-patológico

El VEN produce en los pollos afectados una variedad de signos clínicos y las lesiones patológicas varían por la misma razón que los signos. Todos ellos permiten realizar un diagnóstico presuntivo de la enfermedad pero sus resultados no se deben tomar como absolutos debido a que otras enfermedades producen daños y signos clínicos similares (FAO, 2004).

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

El examen histopatológico de los tejidos afectados mostró que todas las aves inoculadas tenían inflamación local del párpado consistente en una expansión edematosa a los dos días pi, que progresó al quinto día pi a una infiltración pleocelular y ocasional necrosis de las miofibras. Al 4to día pi se observó esplenomegalia y ausencia de células mononucleares, frecuentemente con grandes depósitos de fibrina sustituyendo el tejido linfoide periarteriolar de la cubierta. A este mismo tiempo pi se notó una masiva destrucción de áreas del tejido linfoide intestinal, más evidente en las tonsilas cecales, donde el tejido linfoide estaba sustituido por restos de fibrina, úlceras extensivas en el epitelio intestinal, rompimiento de las miofibras cardíacas y acumulación de macrófagos en el interior del miocardio. Asimismo, se evidenció depleción linfoide de la bolsa y el timo, degeneración neuronal focal y gliosis en el cerebro (Brown y col., 1999; Kommers y col., 2003).

Viroológico

Detección de antígenos virales por Inmunohistoquímica

Las técnicas inmunohistológicas son un método rápido para la demostración específica de la presencia de virus o antígenos virales en órganos y tejidos. La inmunofluorescencia y la inmunoperoxidasa en cortes o frotis de tráquea han sido utilizadas en infecciones producidas por el VEN (Alexander, 1997; Murphy y col., 1999). Asimismo, Kommers y col. (2001, 2003) utilizaron el complejo avidina-biotina para la detección de antígenos virales en muestras de corazón, tejidos linfoides, pulmones, tráquea, hígado, riñón y cerebro de pollos infectados experimentalmente con diferentes aislados del VEN.

Aislamiento e identificación viral

El aislamiento viral constituye un método inequívoco de diagnóstico de la EN que permite la caracterización del aislado viral (Alexander, 1998). Este método tiene el inconveniente de que los procedimientos utilizados generalmente son lentos pues requieren de múltiples pases, lo cual constituye una desventaja para el control de los brotes (Li y Zhang, 2004, Tiwari y col., 2004) debido a la rapidez con que se diseminan las enfermedades virales y el corto tiempo de vida productiva de la mayoría de las aves comerciales.

Por otra parte, la presencia de cepas lentogénicas del VEN en las poblaciones avícolas y su uso como vacunas vivas, hacen que el aislamiento no sea suficiente y haya que realizar la posterior identificación y caracterización, utilizando pruebas de laboratorio que permitan determinar la patogenicidad del aislado, ya que su importancia e impacto está directamente relacionado con su virulencia (Alexander, 1997; Kommers y col., 2003).

Para realizar el aislamiento viral en casos de enfermedad severa con alta mortalidad se utilizan muestras procedentes de aves muertas o recientemente eutinizadas que incluyen exudado oro-nasal y muestras de órganos como, tráquea, pulmones, intestino (con material fecal), cerebro, bazo, hígado, riñones y corazón. En el caso de aves vivas se utilizan exudados traqueales y cloacales (con restos de heces) (OIE, 2008).

Diferentes técnicas serológicas como la virus neutralización (VN), la inmunodifusión doble o agar gel difusión y ELISA se utilizan para la identificación de aislados del VEN, sin embargo el método convencional más utilizado es la inhibición de la hemaglutinación (IHA) (Alexander, 1998). La aplicación de esta técnica en la identificación de los aislamientos, se ve favorecida por el hecho de que los aislados de este virus pertenecen a un solo serotipo y por su facilidad y bajo costo (Alexander, 1997). (Alexander, 1998; OIE, 2004).

La identificación del aislado se realiza frente a los 16 antisueros de los subtipos de hemaglutinina del virus de la Influenza aviar (Fouchier y col.,

2005; OIE, 2008) como diagnóstico diferencial y frente a los 9 antisueros de los serotipos de los APMV, entre los que se han reportado reacciones cruzadas entre el APMV-1 y el APMV-3, particularmente cuando este último es aislado de psitácidas, de aves en cautiverio o exóticas, así como, con el APMV-7 aislado de avestruces, pavos y palomas (Srinivasappa y col., 1986; OIE, 2004).

Los anticuerpos monoclonales (AcMc) han sido utilizados en la caracterización de los aislados y cepas del VEN y han posibilitado determinar la diversidad antigénica y las similitudes existentes entre los APMV-1. La utilidad de esta diversidad en el diagnóstico y epidemiología de los brotes de la EN depende en gran medida de lo estrechamente relacionada que estén la diversidad antigénica con las propiedades biológicas del virus y el mantenimiento de esta antigenicidad durante una epizootia (Alexander y col., 1997).

Su empleo ha permitido realizar una serotipificación altamente específica y diferenciar virus vacunal de aislados de campo (Srinivasappa y col., 1986; Lana y col., 1988; King y Seal, 1998), así como, establecer la especificidad de la variante paloma del VEN y su distribución a nivel mundial (Collins y col., 1989; Alexander, 1998). Asimismo, los trabajos realizados por Alexander y col., (1997) con la utilización de 9 AcMc permitió agrupar los virus analizados en 14 patrones diferentes de unión comparado con los 8 reportados por Russell y Alexander (1983).

La caracterización patogénica de los aislados del VEN se realiza, de acuerdo con lo reportado en la OIE, (2008), por el Índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) en pollitos SPF de 1 día de edad y por la determinación de la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión del péptido conectante de la proteína F.

Molecular

La introducción de las técnicas moleculares como prueba aceptada para el diagnóstico, identificación y caracterización del VEN por la OIE (2008) ha posibilitado realizar el diagnóstico de una forma rápida, segura, sensible y específica que permita tomar las medidas de control adecuadas para prevenir la posterior diseminación y minimizar las pérdidas ocasionadas por la enfermedad.

La detección del ácido nucleico viral en muestras de tejidos empleando las técnicas moleculares ha sido reportado por Brown y col., (1999) y Kommers y col., (2001), quienes utilizaron la hibridación "in situ" para detectar la extensión de la replicación viral en muestras de tejidos de pollos infectados con cepas velogénicas, mesogénicas y lentogénicas del VEN.

Diferentes ensayos moleculares para la detección y/o diferenciación de las cepas y aislados del VEN han sido desarrollados sobre la base de las diferencias en las secuencias nucleotídicas en la región del péptido conectante

de la proteína F que correlacionan con los diferentes fenotipos virales (Aldous y Alexander, 2001; Cavanagh, 2001). Entre estas se han usado la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcripción reversa (RT-PCR) (Alí y Reynolds, 2000), RT-PCR anidado (Barbezange y Jestin, 2002), RT-PCR en combinación con el análisis con enzimas de restricción (Gohm y col., 2000; Nanthakumar y col., 2000; Herczeg y col., 2001), la hibridización de ácidos nucleicos con sondas patógenas específicas (Jarecki-Black y King, 1993; Oberdorfer y Werner, 1998), análisis por "fingerprint" (Palmieri y Mitchell, 1991; Aldous y Alexander, 2001) y el ensayo de movilidad heteroduplex (Berinstein y col., 2001) entre otros.

Recientemente se han reportados ensayos de RT-PCR basados en la fluorescencia en tiempo real (RRT-PCR) para la detección de antígenos virales en muestras clínicas por las ventajas que reporta sobre los métodos de RT-PCR convencionales (Bernd Hoffmann, 2009) ver con CLPReview RRT-PCR. Este método se ha empleado no solo para la detección del VEN en muestras clínicas sino también para la detección de cepas virulentas, incluidas cepas del tipo de paloma y para la diferenciación de cepas lentogénicas/vacunales y velogénicas (Wise y col., 2004a; SheauWei Tan y col., 2009).

El empleo de estas técnicas en el diagnóstico de la EN ha permitido también determinar el origen y diseminación de las cepas del VEN (Aldous y Alexander, 2001; Perderson y col., 2004). Con el análisis de la secuencia de nucleótidos de la región del péptido conectante de la proteína F, se han diferenciado cepas y aislados del virus estrechamente relacionados, revelando importantes evidencias epizootiológicas acerca de su origen (Alexander y col., 1999) y junto con los análisis filogenéticos han establecido los diferentes genotipos del VEN (Seal y col., 1995; Kwon y col., 2003; Aldous y col., 2003) y permitió conocer que durante la primera panzootia de la enfermedad estuvieron involucrados los genotipos II, III y IV del virus (Ballagi-Pordany y col., 1996; Yu y col., 2001; Mase y col., 2002): que los genotipos V y VI fueron considerados los responsables de la segunda y tercera panzootia (Herczeg y col., 2001; Czegledi y col., 2002; Wehmann y col., 2003), mientras que el genotipo VII del virus fue el responsable de la cuarta panzootia de la enfermedad (Tsai y col., 2004; Abolnik y col., 2004).

Serológico

La presencia de anticuerpos específicos al VEN en las aves ofrece poca información sobre la cepa de virus que infecta y por lo tanto tiene limitado valor diagnóstico. No obstante, en poblaciones de aves no vacunadas la demostración de anticuerpos indica que ha sucedido la infección lo que unido al cuadro clínico observado es suficiente para emitir el diagnóstico (OIE, 2004). Diferentes pruebas serológicas se han utilizado para la detección de anticuerpos al VEN, pero las más empleadas en la actualidad son la IHA y los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) (de Witt y col., 1992; Cvelic-Cabrilo y col., 1992; Perera y col., 1993, 1996; Alfonso y col., 2001).

El diagnóstico serológico post-vacunal es utilizado para confirmar la aplicación exitosa de la vacuna y una adecuada respuesta inmune por el ave (Alexander, 1997). Además, este diagnóstico es de gran utilidad en la vigilancia epidemiológica de la enfermedad pues permite conocer si existe circulación viral en las poblaciones avícolas, determinado por un incremento de los títulos de anticuerpos comparado con el perfil que las aves vacunadas deben mostrar, aunque no muestren signos clínicos. Esto fue detectado por Cuello y col. (2003) quienes evaluaron la cinética de anticuerpos por ELISA en poblaciones de reproductoras vacunadas, evidenciando la circulación de este virus en el campo.

Control

Uno de los objetivos del control es proteger a las aves de la infección con el VEN y por otra parte reducir el número de aves susceptibles mediante la aplicación de la vacunación (Alexander, 1997). Para el control, se tiene en cuenta como factor primordial la diseminación de la enfermedad y en consecuencia, se adoptan disposiciones a nivel nacional e internacional que regulan el comercio de los productos avícolas, así como, de aves vivas. Sin embargo, los factores más importantes en prevenir la introducción de la enfermedad y su diseminación en presencia de un brote, son las condiciones bajo las cuales las aves son criadas y el grado de bioseguridad practicado en las explotaciones avícolas (Alexander, 1997).

Bioseguridad

La bioseguridad y la higiene constituyen dos elementos fundamentales para el control de la EN (Alexander, 1997; FAO, 2004; King, 2004) y debido a su rápida diseminación entre las poblaciones avícolas, las precauciones sanitarias que se aplican para prevenir la difusión de las enfermedades deben ser rigurosamente utilizadas en este caso.

La bioseguridad es parte indispensable de los procedimientos de las buenas prácticas de producción, por ser la mejor defensa contra las enfermedades. De no cumplirse con las mismas de nada valdrían las técnicas de diagnóstico de avanzada y la producción de vacunas por ingeniería genética. Sólo la prevención permite lograr que el ave manifieste su potencial biológico productivo, por lo tanto el desarrollo y cumplimiento de un extenso programa de bioseguridad constituye uno de los factores más importantes para reducir las pérdidas debido al VEN (FAO, 2004). El control de la enfermedad sólo se logra vinculando de una manera correcta un buen programa de bioseguridad y un efectivo programa de vacunación, que incluya tanto a los progenitores como a la progenie.

Las fuentes y vías de transmisión son los factores que esencialmente facilitan que los agentes se transmitan de una unidad a otra. En esto influyen los animales infectados, los fómites, el agua y el alimento contaminado, la yacija y otros desechos de la crianza. Además, el hombre es otro factor en la

transmisión de esta enfermedad ya que las visitas a las granjas por personal especializado son inevitables, lo que implica un reforzamiento en las medidas de higiene y desinfección (FAO, 2004).

Vacunación

La vacunación constituye la herramienta profiláctica más efectiva y menos costosa para el control de las enfermedades infecciosas (Huang y col., 2003) y el uso combinado de vacunas vivas atenuadas e inactivadas induce en las aves una mayor protección frente a los agentes infecciosos. La inmunización de las reproductoras reviste una especial importancia pues estas le confieren a la progenie una inmunidad pasiva que puede protegerla durante las primeras semanas de vida.

En la EN la vacunación tiene un papel fundamental para su control (Czegledi y col., 2003; King, 2004) y aunque se producen altos títulos de anticuerpos en las aves inmunizadas, la vacuna solo protege a las aves de las más serias consecuencias de la enfermedad pero no de la infección y excreción de virus que puede ocurrir a un bajo nivel (Alexander, 1997; Alexander y col., 1999). El desarrollo de la biología molecular y el conocimiento acerca de los mecanismos involucrados en la patogenicidad y antigenicidad del VEN han permitido el clonaje de los genes involucrados en diferentes vectores, reportando la obtención de inmunidad protectora con vacunas recombinantes de fowlpox, pigeonpox y herpesvirus de pavo (OIE, 2004). Por otro lado, el desarrollo de la tecnología de la genética reversa permite el uso de los virus con genoma ARN, no segmentado, de polaridad negativa, para expresar genes heterólogos, lo cual provee un nuevo método para el perfeccionamiento de la generación de vacunas y vectores recombinantes (Huang y col., 2003).

Como consecuencia de la amplia distribución de este virus que ocasiona pérdidas cuantiosas a la industria avícola en los países donde se presenta, diferentes estrategias de lucha se han utilizado en el control de la EN, entre las cuales se encuentran:

1. La no aplicación de vacuna.
2. La vacunación de reproductoras y ponedoras solamente.
3. El uso de estrategias de vacunación combinadas con la erradicación, con la vacunación en anillo en caso de brote o la vacunación de toda la población combinada con la erradicación, entre otras.

La elección de una u otra estrategia dependerá del área geográfica o país en cuestión, sus contactos con otras regiones que puedan favorecer la introducción de virus virulento y los riesgos de bloqueo del comercio en caso de brotes de la enfermedad. La vigilancia epizootiológica con la realización de los muestreos serológicos y los sistemas de reporte tanto nacionales como

internacionales son esenciales para la eficiencia de estas medidas (Kouwenhoven, 1993).

Debido a que numerosos brotes de la enfermedad en pollos han estado asociados a virus de Newcastle variante paloma, la vacunación en esta especie de ave se utiliza como forma de control de la enfermedad. Diferentes vacunas vivas e inactivadas han sido aplicadas obteniendo mejores resultados con las vacunas inactivadas que protegen a las palomas de la enfermedad clínica y de la muerte pero no de la infección viral y redujeron de forma significativa la diseminación viral después de la confrontación (Vindevogel y col, 1984; Duchatel y col., 1985; Stone, 1989).

Conclusiones

La enfermedad de Newcastle continúa siendo la principal amenaza de la avicultura mundial. Su control basado en la aplicación de programas de bioseguridad, vacunación y vigilancia epidemiológica constituyen los pilares fundamentales para la prevención de brotes graves de la enfermedad y la toma de medidas de control que eviten la diseminación de la misma. La revisión y compilación realizada en este trabajo sobre aspectos fundamentales que son necesarios conocer acerca del VEN, con particular énfasis en el diagnóstico y control, será de utilidad a los profesionales de la rama avícola para actuar de forma rápida y eficiente ante una sospecha de la enfermedad.

Referencias bibliográficas

1. Abolnik, C.; Ilorner, R.F.; Bisschop, S.P.R.; Parker, M.E.; Romito, M. y Viljoen, G.J. (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.* 49:603-619.
2. Agrawal, P.W. y Reynolds, D.L. (1991). Evaluation of the cell-mediated immune response of chicken vaccinated with Newcastle disease virus as determined by the under-agarose leukocyte-migration-inhibition technique. *Avian Dis.*, 35:360-364.
3. Aldous, E.W. y Alexander, D.J. (2001). Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathol.*, 30:117-128.
4. Aldous, E.W.; Mynn, J.K.; Banks, J. y Alexander, D.J. (2003). A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol.*, 32(3):239-257.
5. Alexander, D.J.; Russell, P.H. y Collins, M.S. (1984). Paramyxovirus type 1 infections in racing pigeons. Characterization of isolated viruses. *Vet. Rec.*, 114: 444-446.
6. Alexander D.J. (1997). Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infections. In: *Diseases of Poultry*, Tenth Edition, Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R. & Saif Y.M., eds. Iowa State University Press, Iowa, USA, 541–570.

7. Alexander, D.J. (1998). Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses. In: Isolation and identification of avian pathogens, fourth edition, Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Pearson, J.E. and Redd, W.M. eds. Published by The American Association of Avian Pathologist, Inc, Kennett Square, Pennsylvania, pág. 156-163.
8. Alexander, D.J.; Banks, J.; Collins, M.S.; Manvell, R.J.; Frost, K.M.; Speidel, E.C. y Aldous, E.W. (1999). Antigenic and genetic characterization of Newcastle disease viruses isolated from outbreaks in domestic fowl and turkey in Great Britain during 1997. *Vet. Record*, 145:417-421.
9. Alexander, D.J. (2001). Newcastle disease. *British Poultry Science*, 42:5-22.
10. Alexander, D.J. (2003). Newcastle Disease. *Diseases of Poultry*. 11th edition, 64-87, ed. Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., Mc Dougald, L. R. y Swayne, D.E. Ames, Iowa: Iowa State Press.
11. Alfonso, P.; Noda, J.; Perera, C.L. y Cuello, S. (2001). Validación de un ELISA indirecto para detectar anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle. *Rev. Salud Anim.*, 23(3), 2001.
12. Ali, A. y Reynolds, D.L. (2000). A multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay for Newcastle disease virus and avian pneumovirus (Colorado strain). *Avian Dis.*, 44:938-943.
13. Ballagi-Pordany, A.; Wehmann, E; Herczerg, J.; Belak, S. y Lomniczi, B. (1996). Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F gene. *Arch. Virol.*, 141:243-261.
14. Barbezange, C. y Jestin, Véronique (2002). Development of a RT-nested PCR test detecting pigeon Paramyxovirus-1 directly from organs of infected animals. *J. of Virological Methods*, 106:197-207.
15. Barbezange, C. y Jestin, Véronique (2003a). Monitoring of pigeon paramyxovirus type-1 in organs of pigeons naturally infected with *Salmonella typhimurium*. *Avian Pathol.*, 32(3):277-283.
16. Barou, M.D. y Barrett, T. (2000). Rinderpest viruses lacking the C and V proteins show specific defects in growth and transcription of viral RNAs. *J. Virol.*, 74:2603-2611.
17. Beard, C.W. y Easterday, B.C. (1967). The influence of route of administration of Newcastle disease virus on host response. *J. Infect Dis.*, 117:55-70.
18. Beard, C.W. y Hanson, R.P. (1984). Newcastle disease. In: M.S. Hofstad, H.J. Barnes, B.W. Calnek, W.M. Reid, H.W. Yoder (eds). *Diseases of Poultry*, 8th ed. Iowa State University Press, Ames, IA, pág. 452-470.
19. Berinstein, A.; Sellers, H.S.; King, D.J.; y Seal, B.S. (2001). Use of a heteroduplex mobility assay to detect differences in the fusion protein cleavage site coding sequence among Newcastle Disease virus isolates. *J. of Clin. Microb.*, 39(9):3171-3176.
20. Biancifiori, F. y Fioroni, A. (1983). An occurrence of Newcastle disease in pigeons: Virological and serological studies on the isolates. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 6:247-252.
21. Brown, C.; King, D.J. y Seal, B.S. (1999). Pathogenesis of Newcastle Disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. *Vet. Pathol.*, 36:125-132. Cavanagh, D. (2001). Innovation and discovery: the application of nucleic acid-based technology to avian virus detection and characterization. *Technical Review. Avian Pathol.*, 30:581-598.

22. Collins, M.S.; Alexander, D.J.; Brockman, S.; Kemp, P.A. y Manvell, R.J. (1989). Evaluation of mouse monoclonal antibodies raised against an isolate of the variant avian paramyxovirus type 1 responsible for the current panzootic in pigeons. *Arch. Virol.*, 104:53-61.
23. Collins, M.S.; Bashiruddin, J.B. y Alexander, D.J. (1993). Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Arch. of Virology*, 128:363-370.
24. Collins, M.S.; Strong, I y Alexander, D.J. (1994). Evaluation of the molecular basis of the pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed pigeon PMV-1 viruses. *Arch. of Virol.*, 134:403-411.
25. Creelan, J.L.; Graham, D.A. y McCullough, S.J. (2002). Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 (APMV-1) from field cases using one step RT-PCR. *Avian Pathol.*, 31(5):493-499.
26. Cuello, S; Noda, J.; Perera, C.L. y Alfonso, P. (2003). Enfermedad de Newcastle. Cinética de anticuerpos posvacunales en reproductoras y su transferencia a la progenie. *Rev. Salud Animal*, 25(3):167-172.
27. Cueto, S.; Medina, S.; Quintana, J.A. y Tamayo, M. (2001). Newcastle disease in México. 50th Western Poultry Disease Conference, EU.
28. Cvelic-Cabrilo, Vesna; Mazija, H.; Bidin, Z. y Ragland, W.L. (1992). Correlation of haemagglutination inhibition and enzyme linked immunosorbent assay for antibodies to Newcastle disease virus. *Avian Pathol.*, 21:509-512.
29. Czegledi, A.; Herczeg, J.; Hadjlev, G.; Doumanova, L.; Wehmann, E. y Lomniczi, B. (2002). The occurrence of five major Newcastle disease virus genotypes (II, IV, V, VI and VIIb) in Bulgaria between 1959 and 1996. *Epidemiol. Infect.*, 129:679-688.
30. Czegledi, A.; Wehmann, E. y Lomniczi, B. (2003). On the origins and relationships of Newcastle disease virus vaccine strains Hertfordshire and Mukteswar and virulent strain Herts´33. *Avian Pathol.*, 32(3):271-276.
31. de Leeuw, O. y Peeters, B. (1999). Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J. Gen. Virol.* 80:131-136.
32. de Witt, J.J.; Davelaar, F.G. y Braunius, W.W. (1992). Comparison of the enzyme linked immunosorbent assay, the haemagglutination inhibition test and the agar gel precipitation test for the detection of antibodies against infectious bronchitis virus and Newcastle disease in commercial broilers. *Avian Pathol.*, 21:651-658.
33. Doyle, T.M. (1927) A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. *J. of Comp. Pathology and Therapeutics*, 40:144-169.
34. Duchatel, J.P.; Leroy, P.; Coignoul, F.; Pastoret, P.P. y Vindevogel, H. (1985). Essais de vaccination de pigeons contre la paramyxovirose par injection sous-cutanee de vaccins inactives. *Ann. Med. Vet.*, 129:39-50.
35. Duchatel, J.P. y Vindevogel, H. (1986). Assessment of vaccination of pigeons against paramyxovirus type 1 infection with inactivated aqueous suspension or oil emulsion vaccines. *Avian Pathol.*, 15:455-465.
36. Errington, W. y Emmerson, P.T. (1997). Assembly of recombinant Newcastle disease virus nucleocapsid protein into nucleocapsid-like structures is inhibited by the phosphoprotein. *J. Gen. Virol.*, 78:2335-2339.

37. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2004). A technology review: Newcastle disease with special emphasis on its effects on village chickens. FAO, 2004.
38. Francis, D.B. (1973). Newcastle and psittacines, 1970-71. *Poult. Dig.* 32:16-19.
39. Fouchier, R. A.M.; Munster, V.; Wallensten, A.; Bestebroer, T.M.; Herfst, S.; Smith, D.; Rimmelzwaan, G.F.; Olsen, B. y Osterhaus, A.D.M.E. (2005). Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J. of Virology*, 79(5):2814-2822.
40. Fujii, Y.; Sakaguchi, T.; Kiyotani, K. y Yoshida, T. (1999). Comparison of substrate specificities against the fusion glycoprotein of virulent Newcastle disease virus between a chick embryo fibroblast processing protease and mammalian subtilisin like proteases. *Microbiol. Immunol.*, 43:133-140.
41. Gohm, D.S.; Thur, B. y Hofmann, M.A. (2000). Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR. *Avian Pathol.*, 29:143-152.
42. Gotoh, B; Ohnishi, Y.; Inocencio, N.M.; Esaki, E.; Nakayama, K.; Barr, P.J.; Thomas, G. y Nagai, Y. (1992). Mammalian subtilisin related proteinases in cleavage activation of the paramyxovirus fusion glycoprotein: superiority of furin/PACE to PC2 or PC1/PC3. *J. Virol.*, 66:6391-6397.
43. Gough, R.E. y Alexander, D.J.(1973). The speed of resistance to challenge induced in chickens vaccinated by different routes with a B1 strain of live NDV. *Vet. Rec.* 92:563-564.
44. Gould, A.R.; Kattenbelt, J.A.; Selleck, P.; Hansson, E.; Della-Porta, A. y Westbury, H.A. (2001). Virulent Newcastle disease in Australia: Molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. *Virus Res.*, 77:51-60.
45. Gruñid, C. H., Werner, O., Gelderblom, H.R., Grimm, F. y Kusters, J. (2002). Avian Paramyxovirus Serotype 1 Isolates from the Spinal Cord of Parrots Display a Very Low Virulence. *J. Vet. Med. B* 49,445 –451.
46. Hanson, R.P. y Spalatin, J. (1981). Suppression of inherent virulence for chickens of a Newcastle disease strain by a shift within its subpopulations. *Avian Dis.*, 25:225-227.
47. Herczeg, J.; Wehmann, E.; Bragg, R.R.; Travassos, D.P.M.; Hadjiev, G.; Werner, O. y Lomniczi, B. (1999). Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in southern Africa, one (VIIb) of which reached southern Europe. *Arch. Virol.*, 144:2087-2099.
48. Herczeg, J.; Pascucci, S.; Massi, P.; Luini, M.; Selli, L.; Capua, I. y Lomniczi, B. (2001). A longitudinal study of velogenic Newcastle disease virus genotypes isolated in Italy between 1960 and 2000. *Avian Pathol.*, 30:163-168.
49. Hernández, L.D.; Hoffman, L.R.; Wolfsberg, T.G. y White, J.M. (1996). Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu. Rev. Cell Biol.* 12:627-661.
50. HandiStatus II, WORLD / 2004 / Newcastle disease ANIMAL HEALTH STATUS
51. Hoffmann, Bernd, Beer, Martin, Scott M. Reid, Peter Mertens, Chris A.L. Oura, Piet A. van Rijn, Marek J. Slomka, Jill Banks, Ian H. Brown, Dennis J. Alexander, Donald P. King (2009). A review of RT-PCR
52. technologies used in veterinary virology and disease control: Sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health . *Vet. Microb.*,,

53. Huang, Z.; Elankumaran, S.; Panda, A. y Samal, S.K. (2003). Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *Poultry Sci.* 82:899-906.
54. Huang, Z.; Panda, A.; Elankumaran, S.; Govindarajan, D.; Rockemann, D. y Samal, S.K. (2004). The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. *J. of Virology*, 78(8):4176-4184.
55. Huovilainen, A.; Ek-Kommonen, C.; Manvell, R. y Kinnunen, L. (2001). Phylogenetic analysis of avian paramyxovirus 1 strains isolated in Finland. *Arch. Virol.*, 146:1775-1785.
56. Ishikawa, Y. (1992). HN-specific cell-mediated immune response to a recombinant vaccinia virus expressing the HN gene of Newcastle disease virus. *Jpn. J. Vet. Res.*, 40:33-37.
57. Jarecki-Black, J.C. y King, D.J. (1993). An oligonucleotide probe that distinguishes isolates of low virulence from the more pathogenic strains of Newcastle disease virus. *Avian Dis.* 37:724-730.
58. Kapczynski, D.R y Tumpey, T.M. (2003). Development of a virosome vaccine for Newcastle disease virus. *Avian Dis.* 47(3):578-587.
59. Kho, C. L.; Tan, W.S.; Tey, B.T. y Yusoff, K. (2003). Newcastle disease virus nucleocapsid protein: self assembly and length determination domains. *J. of Gen. Virology*, 84:2163-2168.
60. King, D.J. (1996). Avian Paramyxovirus type 1 from pigeons: Isolate characterization and pathogenicity after chicken or embryo passage of selected isolates. *Avian Dis.*, 40:707-714.
61. King, D.J. y Seal, B.S. (1998). Biological y molecular characterization of Newcastle disease virus (NDV) field isolates with comparisons to reference NDV strains. *Avian Dis.*, 42:507-516.
62. King, D.J. (2004). Newcastle Disease and Its Influence on the International Poultry Market. Seminario Internacional de Patología Aviar. Univ. De Valdivia, Chile, Sept. 2004.
63. Kirkland, P.D. (2000). Virulent Newcastle disease virus in Australia: in through the 'back door'. *Austral. Vet. J.*, 78:331-333.
64. Kommers, G.D.; King, D.J.; Seal, B.S. y Brown, C.C. (2001). Virulence of pigeon origin Newcastle disease virus isolates for domestic chickens. *Avian Dis.*, 45:906-921.
65. Kommers, G.D.; King, D.J.; Seal, B.S.; Carmichael, K.P. y Brown, C.C. (2002). Pathogenesis of six pigeon-origin isolates of Newcastle disease virus for domestic chickens. *Vet. Pathol.*, 39:353-362.
66. Kommers, G.D.; King, D.J.; Seal, B.S. y Brown, C.C. (2003). Virulence of six heterogeneous-origin Newcastle disease virus isolates before and after sequential passages in domestic chickens. *Avian Pathol.*, 32:81-93.
67. Kouwenhoven, B. (1993). Newcastle disease In: Virus infectious of birds. J.B. Mc Ferran and M.S. McNulty eds. *Vet. Res. Lab.*, Department of Agriculture, Stormont, Belfast, Northern Ireland, Elsevier Science Publisher, B.V.
68. Krishnamurthy, S. y Samal, S.K. (1998). Nucleotide sequences of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic regions of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of the entire genome sequence. *J. Gen. Virol.*, 79:24119-2424.
69. Kwon, H.J.; Cho, S.H.; Ahn, Y.J.; Seo, S.H.; Choi, K.S. y Kim, S.J. (2003). Molecular epidemiology of Newcastle disease in Republic of Korea. *Vet. Microb.*, 95:39-48.

70. Lana, D.P.; Snyder, D.B.; King, D.J. y Marquardt, W.W. (1988). Characterization of a battery of monoclonal antibodies for differentiation of Newcastle Disease Virus and pigeon paramyxovirus-1 strains. *Avian Dis.* 32:273-281.
71. Lemes, E. (1990). Enfermedad de Newcastle en Cuba. Significación epizootológica de las aves del sector privado para las crianzas estatales. Tesis presentada en opción al grado científico de candidato a Doctor en Ciencias Veterinarias, UNAH, La Habana, Cuba.
72. Li, Z.; Sergel, T.; Razvi, E y Morrison T. (1998). Effect of cleavage mutants on syncytium formation directed by the wild-type fusion protein of Newcastle disease virus. *J. Virol.*, 72 (5):3789-3795.
73. Li, Y.P. y Zhang, M.F. (2004). Rapid pathotyping of Newcastle disease virus from allantoic fluid and organs of experimentally infected chickens using two nobel probes. *Arch. Virol.* 149:1231-1243.
74. Li, J.; Melanson, V.R.; Mirza, A.M. y Iorio, R.M. (2005). Decreased dependence on receptor recognition for the fusion promotion activity of L289A-mutated Newcastle disease virus fusion protein correlates with a monoclonal antibody detected conformational change. *J. of Virology*, 79(2):1180-1190.
75. Locke, D.P.; Sellers, H.S.; Crawford, J.; Schultz-Cherry, S. King, D.J.; Meinersmann, R.J. y Seal, B.S. (2000). Newcastle disease virus phosphoprotein gene analysis and transcriptional editing in avian cells. *Virus Res.*, 69:55-68.
76. Longhi, S. y Canard, S. (1999). Mècanisme de transcription et de rèplication des Paramyxoviridae. *Virologie*, 3:227-240.
77. Mase, M.; Imai, K.; Sanada, Y.; Sanada, N.; Yuasa, N.; Imada, T.; Tsukamoto, K. y Yamaguchi, S. (2002). Phylogenetic análisis of Newcastle disease virus genotypes isolated in Japan. *J. of Clin. Microb.* 40(10):3826-3830.
78. Mayo, M.A. (2002). A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch. Virology* 147: 1655-1663.
79. Mebatsion, T.; Verstegen, S.; De Vaan, L.T.; Romer-Oberdorfer, A. y Schrier, C.C. (2001). A recombinant Newcastle disease virus with low level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chickens embryos. *J. Virol.*, 75:420-428.
80. Mebatsion, T.; de Vaan, L.T.C.; de Haas, N.; Romer-Oberdorfer, A. y Braber, M. (2003). Identification of a mutation in editing of defective Newcastle disease virus recombinants that modulates P-gene mRNA editing and restores virus replication and pathogenicity in chicken embryos. *J. of Virology*, 77(17):9259-9265.
81. Meulemans, G.; van den Berg, T.P.; Decaesstecker, M. y Boschmans, M. (2002). Evolution of pigeons Newcastle disease virus strains. *Avian Pathol.*, 31:515-519.
82. Morrison, T. (2003). Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochemica et Biophysica Acta* 1614:73-84.
83. Murphy, F.A.; Gibbs, E.P.J.; Horzinek, M.C. y Studdert, M.J. (1999). Paramyxoviridae. In: *Veterinary Virology*, Chapter 26, 3ra. Ed. Academic Press, Inc., pp 405-458.

84. Nagai, Y.; Klenk, H.D. y Rott, R. (1976). Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 72:494-508.
85. Nagai, Y. y Kato, A. (1999). Paramyxovirus reverse genetics is coming of age. *Microbial Immunol.*, 43:613-624.
86. Nanthakumar, T.; Kataria, R.S.; Tiwari, A.K.; Butchiah, G. y Kataria, J.M. (2000). Pathotyping of Newcastle disease viruses by RT-PCR and restriction enzyme analysis. *Vet. Res. Comm.* 24:275-286.
87. Nolou, R. S. (2003). Emergency declared: exotic Newcastle disease found in commercial poultry farms. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 222:411.
88. Oberdorfer, A. y Werner, O. (1998). Newcastle disease virus: detection and characterization by PCR of recent German isolates differing in pathogenicity. *Avian Pathol.*, 27:237-243.
89. Office International des Epizooties (1999). OIE official acts. Resolution No. XIII-Newcastle Disease. *Office International des Epizooties Bulletin*, 111:266-267.
90. Office International des Epizooties (2003). Handistatus II. International Animal Health code. <http://www.oie.int>
91. Oficina Internacional de Epizootias. (2004). Newcastle disease. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 5ta ed.
92. oiie-info-web@oie.int. Enfermedad de Newcastle en Chipre, 19 de enero del 2005.
93. Oficina Internacional de Epizootias. (OIE) (2005). <http://www.defra.gov.uk/animalh/diseases/monitoring/index.htm>, 2005
94. Otim, M.O.; Christensen, H.; Jorgensen, P.H.; Handberg, K.J. y Bisgaard, M. (2004). Molecular characterization and phylogenetic study of Newcastle disease virus isolates from recent outbreaks in eastern Uganda. *J. of Clin. Microbiol.*, 42(6):2802-2805.
95. Palmieri, S. y Mitchell, B.W. (1991). Comparison of three velogenic strains of Newcastle disease virus by RNA oligonucleotide fingerprinting. *Avian Dis.* 35:384-388.
96. Panda, A.; Huang, Z.; Elankumaran, S.; Rockemann, D.D. y Samal, S.K. (2004). Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microbial Pathogenesis*, 36(1):1-10.
97. Park, M.S.; Shaw, M.L.; Munoz-Jordan, J.; Cros, J.F.; Nakaya, T; Bouvier, N.; Palese, P.; García-Sastre, A. y Basler, C.F. (2003). Newcastle disease virus (NDV) based assay demonstrates interferon antagonist activity for the NDV V proteins and the Nipah virus V, W and C proteins. *J. Virol.* 77:1501-1511.
98. Park, M.S.; García-Sastre, A.; Cros, J.F.; Basler, C.F. y Palese, P. (2003a). Newcastle disease virus V protein is a determinant of host range restriction. *J. of Virology*, 77(17):9522-9532.
99. Peeters, B.P.H.; de Leeuw, O.S.; Koch, G. y Gielkens, A.L.J. (1999). Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: Evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. of Virology*, 73(6):5001-5009.
100. Pedersen, J.C.; Senne, D.A.; Woolcock, P.R.; Kinde, H.; King, D.J.; Wise, M.G.; Panigraphy, B. and Seal, B.S. (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. Microb.*, 42:2329-2334.

101. Perera, Carmen L.; Noda, Julia; Alfonso, P.; Acosta, Isis y Núñez, Amalia (1993) Estandarización de un ELISA para detectar anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle. *Rev. Salud Anim.* 15:135-140.
102. Perera, C.L.; Noda, J. Alfonso, P. y Cuello, S. (1996). Desarrollo del sistema UMELISA para detectar anticuerpos contra la enfermedad Newcastle. *Rev. Salud Animal* 18:completar,.
103. Pérez, I. (1953). Enfermedades infecciosas y parasitarias de los animales domésticos. Editorial Minerva, Cuba.
104. Poch, O.; Blumberg, B.M.; Bougueleret, L. y Tordo, N. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J. Gen. Virol.*, 71:1153-1162.
105. Reynolds, D.L. y Maraga, A.D. (2000). Protective immunity against Newcastle disease: the role of cell mediated immunity. *Avian Dis.*, 44:145-154.
106. Reynolds, D.L. y Maraga, A.D. (2000a). Protective immunity against Newcastle disease: the role of antibodies specific to Newcastle disease virus polypeptides. *Avian Dis.*, 44:138-144.
107. Romer-Oberdorfer, A.; Mundt, E.; Mebatsion, T.; Buchholz, U.J. y Mettenleiter, T.C. (1999). Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J. Gen. Virol.* 80:2987-2995.
108. Romer-Oberdorfer, A.; Werner, O.; Veits, J.; Mebatsion, T. y Mettenleiter, T.C. (2003). Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *J of Gen. Virol.*, 84:3121-3129.
109. Russell, P.H. y Alexander, D.J. (1983). Antigenic variation of Newcastle disease virus strains detected by monoclonal antibodies. *Arch. Virol.*, 75:243-253.
110. Scheid, A. y Choppin, P.W. (1973). Isolation and purification of the envelope proteins of Newcastle disease virus. *J. Virol.*, 11:263-271.
111. Seal, B.S.; King, D.J. y Bennett, J.D. (1995). Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *J. of Clin. Microb.*, 33:2624-2630.
112. Seal, B.S.; King, D.J. y Meinersmann, R.J. (2000). Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Virus Res.*, 66:1-11.
113. Seal, B.S.; Crawford, J.M.; Sellers, H.S.; Locke, D.P. y King, D.J. (2002). Nucleotide sequence analysis of the Newcastle disease virus nucleocapsid protein gene and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Virus Res.*, 83:119-129.
114. Senne, D.A. (2003). Exotic Newcastle disease virus characterization. Proceedings of the fifty second western poultry disease conference. Sacramento, California, March 8-11, pág. 28-30
115. Sharma, J.M. (1999). Introduction to poultry vaccines and immunity. *Adv. Vet. Med.*, 41:481-494.
116. SheauWei, Tana,, Aini Ideris, Abdul Rahman Omar, Khatijah Yusoff, Mohd Hair-Bejo (2009). . Detection and differentiation of velogenic and lentogenic Newcastle disease viruses using SYBR Green I real-time PCR with

- nucleocapsid gene-specific primers. *Journal of Virological Methods*, 160:149–156.
117. Shengging, Y.; Kishida, N.; Ito, H.; Kida, H.; Otsuki, K.; Kawaoka, Y. and Ito, T. (2002) Generation of velogenic Newcastle disease viruses from a nonpathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens. *Virology*, 301:206-211.
118. Srinivasappa, G.B.; Snyder, D.B.; Marquardt, W.W. y King, D.J. (1986). Isolation of a monoclonal antibody with specificity for commonly employed vaccine strains of Newcastle disease virus. *Avian Dis.*, 30(3):562-567.
119. Stone, H.D. (1989). Efficacy of oil emulsion vaccines prepared with pigeon paramyxovirus-1, Ulster and La Sota Newcastle disease viruses. *Avian Dis.*, 33:157-162.
120. Timms, L. y Alexander, D.J. (1977). Cell mediated immune response of chickens to Newcastle disease vaccines. *Avian Pathol.* 6:51-59.
121. Tiwari, A.K.; Kataria, R.S.; Nanthakumar, T.; Dash, B.B. y Desai, G. (2004). Differential detection of Newcastle disease virus strains by degenerate primers based RT-PCR. *Comp. Immunol. Microb. And Infectious Diseases*, 27(3):155-223.
122. Toro, H.; Hoerr, F.J.; Farmer, K.; Dykstra, C.C.; Roberts, S.R. y Perdue, M. (2005). Pigeon Paramyxovirus: Association with common avian pathogens in chickens and serologic survey in wild birds. *Avian Dis.*, 49(1):92-98.
123. Tsai, H.J.; Chang, K.H.; Tseng, C.H.; Frost, K.M.; Manvell, R.J. y Alexander, D.J. (2004). Antigenic and genotypical characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwán between 1969 and 1996. *Vet. Microb.*, 104:19-30.
124. Uakan, M.K.; Kato, A.; Muranaka, M.; Yamaguchi, R.; Sakai, Y.; Uatano, L.; Toshiro, M. y Nagai, Y. (2000). Versatility of the accessory C proteins of Sendai virus: contribution to virus assembly as an additional role. *J. Virol.* 74:5619-5628.
125. Van Regenmortel, H.V.; Bishop, D.H.L.; Fauquet, C.M. Eds. *Virus Taxonomy*, VIII Report of the International Committee on Taxonomy viruses. <http://www-micro.msb.le.ac.uk/default.html>; *Virology*: Taxonomy, April 2005.
126. Viamontes, O. (1984). La enfermedad de Newcastle en Cuba. Estudios clínicos, virológicos, serológicos e infección experimental. Tesis en opción al grado de Dr. En Ciencias Veterinarias. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de la Habana, La Habana, 1984.
127. Viamontes, O. (2003). Estrategia de inmunización contra la enfermedad de Newcastle. *Rev. Cub. de Ciencia Avícola*, 27:89-94.
128. Vindevogel, H.; Thiry, E.; Pastoret, P.P. y Meulemans, G. (1982). Lentogenic strains of Newcastle disease virus in pigeons. *Vet. Rec.*, 110:497-499.
129. Walker, J.W.; Heron, B.R. and Mixson, M.A. (1973). Exotic Newcastle disease eradication program in the United States of America. *Avian Dis.*, 17:486-503.
130. Ward, M.D.W.; Fuller, F.J.; Mehrotra, Y. y De Buysscher, E.V. (2000). Nucleotide sequence and vaccinia expression of the nucleoprotein of a highly virulent neurotropic strain of Newcastle disease virus. *Avian Dis.* 44: 34-44.
131. Wehmann, E. Czeglédi, A.; Werner, O.; Kaleta, E.F. y Lomniczi, B. (2003). Occurrence of genotypes IV, V, VI and VIIa in Newcastle disease outbreaks in Germany between 1939 and 1995. *Avian Pathol.*, 32:157-163.
132. Werner, O.; Römer-Oberdörfer, A.; Köllner, B.; Manvell, R.J. y Alexander, D.J. (1999). Characterization of avian paramyxovirus type 1 strains isolated in Germany during 1992 to 1996. *Avian Pathol.* 28:79-88.

133. Westbury, H. (2001). Newcastle disease virus: an evolving pathogen. *Avian Path.* 30: 5-11.
134. Westover, K.M. and Hughes, A.L. (2001). Molecular evolution of viral fusion and matrix protein genes and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21(1):128-134.
135. Wise, M.G.; Sellers, H.S.; Alvarez, R. and Seal, B.S. (2004). RNA-dependent RNA polymerase gene analyses of worldwide Newcastle disease virus isolates representing different virulence types and their phylogenetic relationship with other members of the Paramyxoviridae. *Virus Res.*, 104:71-80.
136. Wise, Mark G., David L. Suarez, Bruce S. Seal, Janice C. Pedersen, Dennis A. Senne, Daniel J. King, Darrell R. Kapczynski, and Erica Spackman (2004a). Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for Detection of Newcastle Disease Virus RNA in Clinical Samples. *J. of Clin. Microb.*, Vol. 42: 329–338.
137. Yu, L.; Wang, Z.; Jiang, Y.; Chang, L. y Kwang, J. (2001). Characterization of Newly emerging Newcastle disease virus isolates from the people´s Republic of China and Taiwan. *J. of Clin. Microb.* 39(10):3512-3519.
138. Zhao, H. y Peeters, B.P.H. (2003). Recombinant Newcastle disease virus as a viral vector: effect of genomic location of foreign gene on gene expression and virus replication. *J. of Gen. Virol.*, 84: 781-788.