

ORIGINAL

Detection of Newcastle disease virus in backyard poultry in Chile

Detección del virus de la enfermedad de Newcastle en aves de traspatio en Chile

Cecilia Baumberger¹ M.Sc; Andrés Lazo¹ M.Sc; Pedro Jimenez-Bluhm¹ Ph.D;
Francisca Di Pillo¹ Ph.D; Nicolás Bravo-Vasquez² Ph.D; Christopher Hamilton-West^{1*} Ph.D.

¹Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Departamento de Medicina Preventiva, Unidad de Epidemiología, Av. Sta. Rosa 11735, Santiago, Chile. ²St Jude Children's Research Hospital, Department of Infectious Diseases, 262 Danny Thomas Pl, Memphis, TN, USA *Correspondencia: christopher.hamilton@veterinaria.uchile.cl

Received: June 2018; Accepted: October 2018.

ABSTRACT

Objective. To identify the presence of Newcastle disease virus (NDV) in birds from backyard production systems (BPS) in parts of the central zone of Chile. **Materials and methods.** Between 2013 and 2015, a total of 1.579 orotracheal swabs were collected from chickens, turkeys, ducks and geese belonging to 328 BPS from the central zone of Chile. In each BPS, swabs collected from birds of the same species were grouped in the same tube with transport medium forming a pool composed of no more than 5 samples. Pools were analyzed by real time RT-PCR. **Results.** Out of a total of 364 pools, 6 were positive for NDV. All positive pools corresponded to chickens from the regions of Valparaíso (n=1) and Libertador General Bernardo O'Higgins (n=5). Pools corresponding to turkeys, ducks or geese were diagnosed as negative. **Conclusions.** The positive results demonstrate the presence of NDV in BPS in Chile. This could be due to the circulation of lentogenic strains of the virus transmitted by wild birds or to the contact with vaccinal strains administered in industrial production systems whose vaccinated birds may end up in BPS.

Keywords: Family farming; newcastle disease; poultry farming; polymerase chain reaction (*Source: DeSC and AGROVOC*).

RESUMEN

Objetivo. Identificar la presencia del virus de la enfermedad de Newcastle (ENC) en aves de sistemas productivos de traspatio (SPT) de parte de la zona central de Chile. **Materiales y métodos.** Entre 2013 y 2015, un total de 1.579 hisopados orotraqueales fueron colectados de gallinas, pavos, patos y gansos pertenecientes a 328 SPT de la zona central de Chile. En cada SPT, los hisopos colectados de aves de la misma especie fueron agrupados en el mismo tubo con medio de transporte formando un pool compuesto por no más de 5 muestras. Los pools fueron analizados por RT-PCR a tiempo real. **Resultados.** De un total de 364 pools, 6 resultaron positivos al virus de la ENC. Los pools positivos correspondieron a gallinas de las regiones de Valparaíso (n=1) y Libertador General Bernardo O'Higgins (n=5). Ningún pool correspondiente a pavos, patos o gansos fue diagnosticado positivo. **Conclusiones.** Los resultados positivos demuestran la presencia del virus de la ENC en SPT en Chile. Esto podría deberse a la circulación de cepas lentogénicas del virus transmitidas por aves silvestres o bien al contacto con cepas vacunales administradas en los planteles industriales cuyas aves vacunadas pueden finalizar en SPT.

Palabras clave: Agricultura familiar; aves de corral; enfermedad de Newcastle; reacción en cadena de la polimerasa (*Fuente: DeSC y AGROVOC*).

INTRODUCTION

Newcastle disease (ND) is one of the diseases with greatest health and economic impact on poultry production worldwide. It is a highly contagious disease and its most virulent strains can lead to mortality close to 100%. This, together with restrictions on international trade, can have very significant economic consequences (1).

ND is caused by a virus belonging to the *Paramyxoviridae* family of the genus *Avulavirus*. Avian paramyxoviruses (APMV) are classified into twelve subtypes (APMV-1 to APMV-12), of which APMV-1 is associated with ND (2,3). This virus has a single-stranded, negative-sense, non-segmented RNA genome. The genome is made up of six genes that encode its six proteins: nucleoprotein (NP), phosphoprotein (P), matrix (M), fusion (F), hemagglutinin-neuraminidase (HN) and RNA polymerase (L) (2).

The different strains of Newcastle disease virus (NDV) are classified into 5 pathotypes according to their pathogenicity in chickens: 1) viscerotropic velogenic, 2) neurotropic velogenic, 3) mesogenic, 4) lentogenic and 5) asymptomatic enteric. The strains that produce the highest mortality are the velogenic strains, while the mesogenic strains have the lowest mortality. The remaining two strains cause mild or asymptomatic infections (4). The most virulent strains are on the World Organization for Animal Health (OIE) list of notifiable diseases.

The NDV is transmitted between birds mainly by inhalation, ingestion or contact with mucous membranes, depending on the target organ of the circulating strain and various environmental factors, such as temperature and humidity (4). A wide variety of wild and domestic bird species are susceptible to this disease and it can affect virtually all bird species. Virulent strains have been isolated from multiple species of poultry. However, the presentation of this disease varies from specie to specie. Gallinaceous birds are very susceptible to this disease, while ducks generally have no clinical signs. In the case of wild birds, the NDV has been isolated most frequently from waterfowl, with the majority of isolates being of low virulence (5).

ND has a worldwide distribution and is considered endemic in many countries. A study conducted in Chile between 2004 and 2005 detected the presence of serum antibodies in birds of prey at bird rehabilitation centers in central and southern Chile. However, the authors of the study suggest that seropositivity may have been due to consumption of previously vaccinated (with live strains of ND) production birds or contact with the vaccine virus in these commercial premises (6).

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle (ENC) es una de las enfermedades de mayor impacto sanitario y económico para la producción avícola mundial. Es una enfermedad altamente contagiosa y sus cepas más virulentas pueden generar una mortalidad cercana al 100%. Esto, sumado a las restricciones del comercio internacional, pueden provocar consecuencias económicas muy significativas (1).

La ENC es causada por un virus perteneciente a la familia *Paramyxoviridae* del género *Avulavirus*. Los paramixovirus aviarios (PMVA) se clasifican en doce subtipos (PMVA-1 al PMVA-12), de los cuales el PMVA-1 es el asociado a la ENC (2,3). Este virus posee un genoma ARN de hebra simple de sentido negativo y no segmentado. El genoma se compone de seis genes que codifican sus seis proteínas: nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), matriz (M), fusión (F), hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y ARN polimerasa (L) (2).

Las distintas cepas del virus de la ENC se clasifican en 5 patotipos de acuerdo con su patogenicidad en pollos: 1) velogénico viscerotrópico, 2) velogénico neurotrópico, 3) mesogénico, 4) lentogénico y 5) entérico asintomático. Las cepas que producen mayor mortalidad son las velogénicas, mientras que las cepas mesogénicas tienen una menor mortalidad. Las restantes dos cepas producen infecciones leves o asintomáticas (4). Las cepas más virulentas forman parte de la lista de enfermedades de notificación obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

El virus de la ENC se transmite entre aves principalmente por inhalación, ingestión o contacto con las mucosas, dependiendo del órgano blanco de la cepa circulante y de diversos factores ambientales, como temperatura y humedad (4). Una gran variedad de especies de aves silvestres y domésticas son susceptibles a esta enfermedad, pudiendo afectar a prácticamente todas las especies de aves. Se han aislado cepas virulentas de múltiples especies de aves de corral. Sin embargo, la presentación de la enfermedad varía entre las distintas especies. Las aves gallináceas son muy susceptibles a la enfermedad, mientras que los patos generalmente no presentan signología clínica. En lo que respecta a las aves silvestres, el virus de la ENC ha sido aislado con mayor frecuencia en aves acuáticas, siendo la mayoría de las cepas aisladas de baja virulencia (5).

La ENC posee una distribución mundial considerándose endémica en muchos países. En un estudio realizado en Chile entre 2004 y 2005 se detectó la presencia de anticuerpos séricos en aves rapaces en centros de rehabilitación de aves de las zonas central y sur de Chile. No obstante, los autores del estudio sugieren que la seropositividad en las aves rapaces evaluadas pudo haberse debido al consumo de aves de producción previamente vacunadas con cepas vivas o bien al contacto con el virus vacunal en estos planteles comerciales

Chile has been free of the velogenic pathotype since 1975. However, in 2007, an outbreak of ND was reported in waterfowl in the coast of the Maule region. During this outbreak, no cases were reported in domestic poultry and in 2008 Chile regained its ND free status (7).

In Chile, industrial production concentrates the largest volume of poultry production. However, there are a significant number of birds that are reared in backyard production systems (BPS). This type of production contributes to rural family economies as a source of food, as well as generating economic resources through the local sale of its products (8). The management conditions and limited or no biosecurity measures present in BPS make this system a very important source of introduction and spread of infectious diseases (9). In most sites, birds are free to roam for at least part of the day. This management factor facilitates contact between neighboring poultry kept in BPS or between domestic and wild birds, which is a risk factor for the transmission of infectious agents between species and an entry point for infectious diseases into BPS (9). Another risk factor for the introduction of infectious agents is the close contact between humans and birds due to the fact that in most BPS visitors come into contact with birds without any type of control or disinfection at entry or exit (8,11). Therefore, BPS are a type of production with high susceptibility to the introduction, maintenance and spread of infectious diseases. This susceptibility is determined by the interaction of various factors such as the species of birds present, the density of animals, the dynamics of contact between birds within the BPS, surrounding BPS or wild birds and the biosecurity measures implemented (10,12). In this context, BPS can play an important role in the emergence and dissemination of ND with the potential to have a major impact on BPS, industry and public health.

The objective of this study was to identify the presence of the NDV in bird species (chickens, turkeys, ducks and geese) kept in BPS in central Chile.

MATERIALS AND METHODS

Study area and determination of sample size. The study was conducted between 2013 and 2015 in central Chile, which includes the regions of Valparaíso, Metropolitana and Libertador General Bernardo O'Higgins. The target population included BPS in central Chile that raised poultry and were no larger than 100 birds (13). According to data from the last agricultural and forestry census in 2007 (Instituto Nacional de Estadísticas), the number of BPS that raise birds in this area was 16.289 units.

(6). Chile es libre del patotipo velogénico desde el año 1975. Sin embargo, en 2007 se reportó un brote de la ENC en aves acuáticas en la costa de la región del Maule. Durante este brote no se reportaron casos en aves domésticas y en 2008 Chile recuperó el estatus de libre de la ENC (7).

En Chile, la producción industrial concentra el gran volumen de la producción avícola. Sin embargo, existe un significativo número de aves que son criadas en sistemas productivos de traspatio (SPT). Este tipo de producción contribuye a las economías familiares rurales como fuente de alimento, además de generar recursos económicos por la venta local de sus productos (8). Las condiciones de manejo y las medidas limitadas o ausentes de bioseguridad presentes en los SPT hacen de este sistema una fuente muy importante de ingreso y diseminación de enfermedades infecciosas (9). En la mayoría de los sitios, las aves se encuentran de manera libre durante, al menos, parte del día. Este factor de manejo facilita el contacto entre aves de corral de SPT aledaños o entre aves domésticas y silvestres, lo que constituye un factor de riesgo para la transmisión de agentes infecciosos entre especies y un punto de entrada de enfermedades infecciosas a los SPT (9). Otro factor de riesgo para el ingreso de agentes infecciosos es el estrecho contacto que existe entre personas y aves debido a que en la mayoría de los SPT los visitantes entran en contacto con las aves sin ningún tipo de control o desinfección a la entrada o salida (8,11). Por lo tanto, los SPT son un tipo de producción que presenta una elevada susceptibilidad al ingreso, mantenimiento y diseminación de enfermedades infecciosas. Esta susceptibilidad está determinada por la interacción de diversos factores tales como las especies de aves presentes, la densidad de animales, la dinámica de contacto entre aves dentro del SPT, SPT aledaños o aves silvestres y las medidas de bioseguridad implementadas (10,12). En este contexto, los SPT pueden jugar un rol importante en la emergencia y diseminación de la ENC con el potencial de generar un gran impacto en los SPT, la industria y la salud pública.

El objetivo de este estudio fue identificar la presencia del virus de la ENC en especies de aves (gallinas, pavos, patos y gansos) de SPT de la zona central de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de estudio y determinación del tamaño muestral. El estudio fue llevado a cabo entre 2013 y 2015 en la zona central de Chile, que incluye las regiones de Valparaíso, Metropolitana y Libertador General Bernardo O'Higgins. La población objetivo del presente estudio contempló SPT de la zona central de Chile que criaban aves de corral y cuyo tamaño no superaba las 100 aves (13). Según datos del último censo agropecuario y forestal de 2007 (Instituto Nacional de Estadísticas), el número de SPT que crían aves en esta área era de 16.289 unidades.

A stratified proportional random sampling was carried out, considering the 15 provinces included in the study area as strata (Table 1). The sample size was 328 BPS and the calculation is previously described in Alegría et al (13). Due to the lack of available data on the prevalence of the NDV in BPS, a prevalence of 50% was assumed for this calculation in order to maximize the sample size. The confidence level was set at 95% and the formulas used (equation 1 adjusted by equation 2) are described below (14). Random assignment of sampling points was performed using ArcGIS (ESRI, Redlands, CA) (13).

$$\text{Equation 1: } n = (Z\alpha)^2 pq/L^2$$

where,

n = sample size;

$Z\alpha$ = $Z\alpha$ value for a confidence level of $1-\alpha$;

P = expected prevalence of the pathogen; $q = 1-P$;

and L = accuracy of the estimate.

$$\text{Equation 2: } n_c = 1/(1/n + 1/N)$$

where,

n_c = corrected sample size;

n = sample size calculated in equation 1; N = number of BPS in the central zone of Chile.

Table 1. Geographic location of backyard production systems (BPS) in central Chile and sample size determined by province and region.

Region	Province ¹	BPS (n) ²	Sample size (n)
Valparaíso	1	956	15
	2	500	5
	3	781	9
	4	770	20
	5	270	2
	6	384	10
Subtotal		3,661	61
Metropolitana	7	1,910	30
	8	426	11
	9	244	9
	10	237	4
	11	387	5
	12	632	13
Subtotal		3,836	72
LGB O'Higgins	13	1,974	90
	14	3,981	47
	15	2,837	58
Subtotal		8,792	195
Total		16.289	328

LGB O'Higgins = Libertador General Bernardo O'Higgins.

¹Province = (1): Pectorca; (2): Valparaíso; (3): Quillota; (4): San Felipe; (5): Los Andes; (6): San Antonio; (7): Melipilla; (8): Chacabuco; (9): Santiago; (10): Cordillera; (11): Talagante; (12): Maipo; (13): Cardenal Caro; (14): Cachapoal; (15): Colchagua.

² According to the 2007 Agricultural and Forestry Census (Instituto Nacional de Estadísticas).

Se realizó un muestreo aleatorio estratificado y proporcional, considerando como estratos a las 15 provincias incluidas en la zona de estudio (Tabla 1). El tamaño muestral fue de 328 SPT y el cálculo se encuentra descrito previamente en Alegría et al (13). En resumen, debido a la falta de información disponible de prevalencia del virus de la ENC en SPT, se asumió para este cálculo una prevalencia del 50% con el fin de maximizar el tamaño muestral. El nivel de confianza se estableció en 95% y las fórmulas utilizadas (formula 1 ajustada por fórmula 2) se describen a continuación (14). La asignación aleatoria de los puntos de muestreo se realizó utilizando ArcGIS (ESRI, Redlands, CA) (13).

$$\text{Fórmula 1: } n = (Z\alpha)^2 pq/L^2$$

donde,

n = tamaño de muestra;

$Z\alpha = Z\alpha$ para un nivel de confianza $1-\alpha$;

P = prevalencia esperada del patógeno; $q = 1-P$;

y L = precisión de la estimación.

$$\text{Fórmula 2: } n_c = 1/(1/n + 1/N)$$

donde,

n_c = tamaño de muestra corregido;

n = tamaño de muestra calculado en fórmula 1;

N = cantidad de SPT en la zona central de Chile.

Toma de muestra. En cada SPT, fueron seleccionadas 5 aves de corral aleatoriamente (o la totalidad de las mismas en SPT que tuvieran menos de 5 aves). Hisopados orotraqueales fueron colectados de gallinas, pavos, patos y gansos y se colocaron en tubos con medio de transporte universal (Copan Diagnostics, Murrieta, CA). En cada SPT, los hisopos colectados de aves de la misma especie fueron agrupados en el mismo tubo con medio de transporte formando un pool. Todas las muestras recolectadas provinieron de aves sanas. Asimismo, no se registraron signos de enfermedad o mortalidad en los SPT en las dos semanas previas a la toma de muestra. Las muestras obtenidas fueron mantenidas a 4°C desde su obtención hasta su llegada al Laboratorio de Epidemiología Veterinaria (Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile). Los pools de muestras fueron almacenados a -80°C hasta su procesamiento.

Diagnóstico molecular. La extracción de ARN de los pools orotraqueales se realizó utilizando QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Los purificados obtenidos fueron almacenados a -80°C hasta su amplificación mediante RT-PCR.

El diagnóstico del virus de la ENC se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) a tiempo real. El protocolo utilizado está diseñado para detectar una región conservada del gen de la proteína de matriz (M) del virus (15). Brevemente, se utilizó el kit TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA) y los partidores APMV-1

Sample collection. Five poultry were randomly selected from each BPS (or all poultry in BPS with less than 5 birds). Orotracheal swabs were collected from chickens, turkeys, ducks and geese and placed in tubes with universal transport medium (Copan Diagnostics, Murrieta, CA). In each BPS, the swabs collected from birds of the same specie were grouped in the same tube with transport medium to form a pool. All the samples collected came from healthy birds. There were also no signs of disease or mortality in BPS during the two weeks prior to sampling. The samples obtained were kept at 4°C from the time they were obtained until their arrival at the Laboratory of Veterinary Epidemiology (Faculty of Veterinary Sciences, University of Chile). The sample pools were stored at -80°C until processing.

Molecular diagnosis. RNA extraction from the orotracheal pools was performed using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The obtained purified products were stored at -80°C until they were amplified by RT-PCR.

The diagnosis of NDV was made by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The protocol used is designed to detect a preserved region of the virus matrix protein (M) gene (15). Briefly, the kit TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA) was used and the APMV-1 forward 5'-AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3', APMV-1 reverse: 5'-CCT GAG GAG AGG CAT TTG CTA-3' primers and APMV-1 probe: 5'[FAM] TTC TCT AGC AGT GGG ACA GCC TGC [TAMRA]-3'. Samples with a threshold value (C_T) <40 were considered positive (15). The diagnosis was made at the Laboratory of Veterinary Epidemiology (Faculty of Veterinary Sciences, University of Chile).

Ethical aspects. Sampling procedures and animal handling were carried out by veterinarians from the Faculty of Veterinary Sciences of the University of Chile. The protocol of the present study was approved by the Ethics Committee from the same institution.

RESULTS

A total of 1,579 birds belonging to 328 BPS were sampled, of which 93.7% were hens (n=1,480), 2.6% turkeys (n=41), 3.0% ducks (n=47) and 0.7% geese (n=11) (Table 2).

A total of 364 sample pools were analyzed. Of these, 6 were positive for the presence of NDV by real-time RT-PCR (Table 3). The 6 positive pools corresponded to hens from Valparaíso (n=1) and Libertador General Bernardo O'Higgins (n=5) regions. No pool corresponding to turkeys, ducks

forward 5'-AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3', APMV-1 reverse: 5'-CCT GAG GAG AGG CAT TTG CTA-3' y la sonda APMV-1 probe: 5'[FAM] TTC TCT AGC AGT GGG ACA GCC TGC [TAMRA]-3'. Muestras con un valor umbral (C_T) <40 fueron consideradas positivas (15). El diagnóstico se realizó en el Laboratorio de Epidemiología Veterinaria (Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile).

Aspectos éticos. Los procedimientos de muestreo y la sujeción de los animales fueron llevados a cabo por Médicos Veterinarios de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. El protocolo del presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la misma institución.

RESULTADOS

Un total de 1.579 aves pertenecientes a 328 SPT fueron muestreadas, de las cuales un 93.7% fueron gallinas (n=1.480), 2.6% pavos (n=41), 3.0% patos (n=47) y 0.7% gansos (n=11) (Tabla 2).

Se analizaron un total de 364 pooles de muestras. De estos, 6 resultaron positivos a la presencia del virus de la ENC por RT-PCR a tiempo real (Tabla 3). Los 6 pooles positivos correspondieron a gallinas de las Regiones de Valparaíso (n=1) y Libertador General Bernardo O'Higgins (n=5). Ningún pool correspondiente a pavos, patos o gansos fue

Table 2. Backyard production systems (BPS) evaluated in central Chile and number of birds sampled by province and region.

Province ¹	BPS (n)	Sampled species (n)					Total
		Hens	Turkeys	Ducks	Geese		
1	15	72	1	2	0	75	
2	5	25	1	1	1	28	
3	9	44	0	0	0	44	
4	20	96	1	2	0	99	
5	2	10	0	0	0	10	
6	10	50	0	0	0	50	
Subtotal ²	61	297	3	5	1	306	
7	30	143	0	3	2	148	
8	11	52	1	6	0	59	
9	9	40	0	3	2	45	
10	4	20	0	0	0	20	
11	5	21	0	3	0	24	
12	13	62	0	2	0	64	
Subtotal ³	72	338	1	17	4	360	
13	90	391	31	3	0	425	
14	47	219	0	5	3	227	
15	58	235	6	17	3	261	
Subtotal ⁴	195	845	37	25	6	913	
Total	328	1.480	41	47	11	1.579	

¹Province = (1): Petorca; (2): Valparaíso; (3): Quillota; (4): San Felipe; (5): Los Andes; (6): San Antonio; (7): Melipilla; (8): Chacabuco; (9): Santiago; (10): Cordillera; (11): Talagante; (12): Maipo; (13): Cardenal Caro; (14): Cachapoal; (15): Colchagua. ²Subtotal Valparaíso region. ³Subtotal Metropolitana region. ⁴Subtotal Libertador General Bernardo O'Higgins region.

or geese was diagnosed positive. All C_T values obtained from the positive pools were greater than 37 (minimum $C_T=37.10$; maximum $C_T=39.03$).

DISCUSSION

The risk of introduction, maintenance and spread of an infectious disease to a country is determined by the interaction of several factors. When referring to BPS, management characteristics make these small family farms possible hot spots for entrance and dissemination of infectious agents. Large commercial farms and BPS coexist in Chilean poultry production, where birds are susceptible to the same diseases. However, the implementation of biosecurity measures differs widely in both production systems. Large commercial farms have high biosecurity standards which reduce the risk of introduction of infectious agents. In contrast, BPS have severe biosecurity deficiencies (8,10). Previous studies have shown that ND can be spread through these production systems (16,17).

In South America, several studies have reported the presence of antibodies against NDV in unvaccinated birds. In Peru, the disease is endemic in some areas and antibodies have been detected in poultry that have not been previously vaccinated (18). In the Colombian coffee growing region, high seroprevalence (30.7%) has also been reported in unvaccinated backyard birds. (19). In Brazil, a population of unvaccinated birds reared in BPS near a wetland area with a large presence of migratory birds was studied, with 33.8% seroprevalence being reported (20). In Ecuador, 9.8% seroprevalence in unvaccinated birds was reported (21).

Several studies have found seropositivity in birds but have not detected the presence of the virus by molecular techniques. In Brazil, 292 cloacal and orotracheal samples were analyzed by real-time RT-PCR without positive results, while 33.8% seroprevalence was found (20). In New Zealand, the virus was not detected in any of the 162 cloacal and orotracheal pools collected from seropositive BPS hens (22). The lack of molecular detection in seropositive birds in these studies may have been due to the fact that the timing of sampling was not optimal, reducing the probability of virus detection. On the other hand, negative results in these investigations may have been due to the circulation of low pathogenic strains that produce seroconversion but, when eliminated for a short period, the virus is not detected by molecular techniques (20). Due to these factors, the sample size was maximized in this study and the sampling period was extended from 2013-2015 and throughout all seasons.

Table 3. Prevalence of Newcastle disease virus (NDV) in backyard production systems (BPS) in provinces of central Chile.

Province	Evaluated BPS (n)	Positive BPS (n)	Prevalence
San Antonio	10	1	10%
Cardenal Caro	90	4	4%
Cachapoal	47	1	2%

diagnosticado positivo. Todos los valores C_T obtenidos de los pools positivos fueron superiores a 37 (mínimo $C_T=37.10$; máximo $C_T=39.03$).

DISCUSIÓN

El riesgo de introducción, mantenimiento y diseminación de una enfermedad infecciosa a un país está determinado por la interacción de diversos factores. Al referirnos a SPT, factores de manejo característicos de estos sistemas hacen de estas pequeñas explotaciones familiares posibles puntos de entrada y diseminación de agentes infecciosos. Grandes granjas comerciales y SPT coexisten en la producción avícola chilena presentando aves susceptibles a las mismas enfermedades. Sin embargo, la implementación de medidas de bioseguridad difiere ampliamente en ambos sistemas productivos. Las grandes granjas comerciales comparten elevados estándares de bioseguridad lo que reduce el riesgo de ingreso de agentes infecciosos. Por el contrario, los SPT cuentan con severas deficiencias de bioseguridad (8,10). Ha sido demostrado en previos estudios que la ENC puede diseminarse a través de estos sistemas productivos (16,17).

En Sudamérica, diversos estudios han reportado la presencia de anticuerpos contra el virus de la ENC en aves no vacunadas. En Perú, la enfermedad es endémica en algunos departamentos donde se ha detectado presencia de anticuerpos en aves de corral que no habían sido previamente vacunadas (18). En el eje cafetero colombiano, se ha descrito una alta seroprevalencia (30.7%) también en aves de traspatio no vacunadas (19). En Brasil, se estudió una población de aves no vacunadas criadas en SPT aledaños a un área de humedales con gran presencia de aves migratorias reportándose un 33.8% de seroprevalencia (20). En Ecuador, se reportó un 9.8% de seroprevalencia en aves no vacunadas (21).

Diversos estudios han hallado seropositividad en aves pero no han detectado la presencia del virus mediante técnicas moleculares. En Brasil se analizaron 292 muestras cloacales y orotraqueales mediante RT-PCR a tiempo real sin obtener resultados positivos, mientras que hallaron un 33.8% de seroprevalencia (20). En Nueva Zelanda, no se detectó el virus en ninguno de los 162 pools cloacales y orotraqueales recolectados de gallinas seropositivas de SPT (22). La falta de detección molecular en aves seropositivas en estos estudios puede haberse debido a que el momento del muestreo no fue el óptimo, disminuyendo la probabilidad de detección del virus. Por otro lado,

In the present study, the NDV was identified in 6 BPS belonging to three provinces in central Chile. In Chile, seroprevalence was detected in birds of prey at rehabilitation centers in the central and southern zones of the country (6). However, because industrial poultry in Chile is vaccinated with live strains of ND, these findings may have been due to contact with the vaccine virus (6). Unlike these studies where serological diagnosis was made, in the present study only the molecular diagnosis of the virus was performed, which constitutes the first evidence of the presence of the NDV in BPS in Chile. While the movement of vaccinated birds from industrial production systems to BPS cannot be ruled out as a possible explanation for the origin of the identified virus, the presence of the virus could also be due to the circulation of lentogenic strains transmitted by wild birds. To characterize the identified virus and evaluate its biological similarity to vaccine strains, virus isolation would have been necessary. Unfortunately, isolation was not attempted in the present study because the positive results showed C_T values greater than 37. The probability of virus isolation is inversely proportional to the C_T value and low isolation frequency is expected in samples with values greater than 37 (23).

It would be desirable to consider future studies in areas at higher risk of ND presentation including viral isolation for the assessment of the biological characteristics of identified viruses compared to vaccine strains. The BPS identified as positive for NDV in the present study were mainly located in coastal areas, being these of similar characteristic to the place of introduction of the virus into the country in 2007 (7).

Both ND and other avian infectious diseases share risk factors such as low biosecurity levels, potential contact with wild birds, high bird density and proximity to wetlands (8). These factors are generally present in BPS. Due to the role of these systems as sentinels in the introduction of new pathogens into the country, the correct functioning of national epidemiological surveillance systems is essential in order to have an early detection of the introduction of infectious diseases with high economic and health impact such as ND and thus, prevent its spread to other susceptible populations.

los resultados negativos en estas investigaciones pueden haberse debido a la circulación de cepas de baja patogenicidad que producen seroconversión pero, al eliminarse por un período corto, el virus no es detectado por técnicas moleculares (20). Debido a estos factores, en el presente estudio se maximizó el tamaño muestral y el período de muestreo se extendió entre los años 2013- 2015 y durante todas las estaciones.

En el presente estudio, el virus de la ENC fue identificado en 6 SPT pertenecientes a tres provincias de la zona central de Chile. Existen antecedentes en Chile de detección de seroprevalencia en aves rapaces de centros de rehabilitación de la zona central y sur (6). Sin embargo, debido a que en Chile se realiza la vacunación con cepas vivas de la ENC en aves de producción industrial, este hallazgo puede haberse debido al contacto con el virus vacunal (6). A diferencia de este estudio donde se realizó el diagnóstico serológico, en el presente estudio solo se realizó el diagnóstico molecular del virus, lo que constituye la primera evidencia de presencia del virus de la ENC en SPT en Chile. Si bien no se puede descartar el traslado de aves vacunadas desde sistemas productivos industriales hacia los SPT como posible explicación del origen del virus identificado, la presencia del virus también podría deberse a la circulación de cepas lentogénicas transmitidas por aves silvestres. Para caracterizar el virus identificado y evaluar su similitud biológica con cepas vacunales, hubiese sido necesario realizar el aislamiento viral. Lamentablemente, en el presente estudio no se intentó el aislamiento debido a que los resultados positivos presentaron un valor de C_T superior a 37. La probabilidad de aislamiento viral es inversamente proporcional al valor C_T y se espera baja frecuencia de aislamiento en muestras con valores superiores a 37 (23).

Sería deseable considerar futuros estudios en zonas con mayor riesgo de presentación para de la ENC incluyendo el aislamiento viral para la evaluación de las características biológicas de los virus identificados en comparación con las cepas vacunales. Los SPT identificados como positivos al virus de la ENC en el presente estudio se ubicaban principalmente en zonas costeras, siendo estos de similar característica al punto de introducción del virus al país en el año 2007 (7).

Tanto la ENC como otras enfermedades infecciosas aviarias comparten factores de riesgo tales como bajos niveles de bioseguridad, potencial contacto con aves silvestres, alta densidad de aves y la cercanía a cuerpos de agua (8). Estos factores se encuentran generalmente presentes en los SPT. Debido al rol de estos sistemas como centinelas en la introducción de nuevos patógenos al país, resulta fundamental el funcionamiento de los sistemas nacionales de vigilancia epidemiológica a fin de detectar de manera temprana la introducción de enfermedades infecciosas con gran impacto económico y sanitario como lo es la ENC y así evitar su diseminación a otras poblaciones susceptibles.

REFERENCES

1. Alexander DJ, Aldous EW, Fuller CM. The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathol.* 2012; 41(4):329–35.
2. Aldous EW, Alexander DJ. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathol.* 2001; 30(2):117–128.
3. Terregino C, Aldous EW, Heidari A, Fuller CM, De Nardi R, Manvell RJ, et al. Antigenic and genetic analyses of isolate APMV/wigeon/Italy/3920-1/2005 indicate that it represents a new avian paramyxovirus (APMV-12). *Arch Virol.* 2013; 158(11):2233–2243.
4. Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev Sci Tech Int des Epizoot.* 2000; 19(2):443–455.
5. 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.* 2011; 23(4):637–56
6. González-Acuña D, Gaete Á, Moreno L, Ardiles K, Cerda-Leal F, Mathieu C, et al. Anticuerpos séricos contra la enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar en aves rapaces de Chile. *Rev MVZ Cordoba.* 2012; 17(3):3118–24.
7. Moreno V, García A, Mathieu C, Aguilera M, Rojas M, Vásquez M. Caracterización molecular y patogenicidad del virus de la enfermedad de Newcastle (ENC) aislado en cormoranes Chile 2007. [en línea]. *Boletín Vet Of.* 2009; 1–13. URL Available in: https://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_9_I_semestre_2009/articulos/caracterizacion_ENC_2007.pdf
8. Hamilton-West C, Rojas H, Pinto J, Orozco J, Hervé-Claude LP, Urcelay S. Characterization of backyard poultry production systems and disease risk in the central zone of Chile. *Res Vet Sci.* 2012; 93(1):121–4.
9. Vandegrift KJ, Sokolow SH, Daszak P, Kilpatrick AM. Ecology of avian influenza viruses in a changing world. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1195:113–128.
10. Van Steenwinkel S, Ribbens S, Ducheyne E, Goossens E, Dewulf J. Assessing biosecurity practices, movements and densities of poultry sites across Belgium, resulting in different farm risk-groups for infectious disease introduction and spread. *Prev Vet Med.* 2011; 98(4):259–270
11. Bravo-Vasquez N, Di Pillo F, Lazo A, Jiménez-Bluhm P, Schultz-Cherry S, Hamilton-West C. Presence of influenza viruses in backyard poultry and swine in El Yali wetland, Chile. *Prev Vet Med.* 2016; 134:211–215.
12. Grunkemeyer VL. Zoonoses, Public Health, and the Backyard Poultry Flock. *Vet Clin North Am - Exot Anim Pract.* 2011; 14(3):477–90.
13. Alegria-Moran R, Lazo A, Urcelay S, Hamilton-West C. Using spatial tools for high impact zoonotic agent surveillance design in backyard production systems in central Chile. *Vet México OA.* 2017; 4(1):10–8. DOI: <https://doi.org/10.21753/vmoa.4.1.435>
14. Dohoo IR, Martin W, Stryhn H. *Veterinary epidemiologic research.* AVC Incorporated: Charlottetown, Canada; 2003.
15. Wise MG, Suarez DL, Seal BS, Pedersen JC, Senne DA, King DJ, et al. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(1):329–38.
16. Shekaili T Al, 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.
17. Kouakou AV, Kouakou V, Kouakou C, Godji P, Kouassi AL, Krou HA, et al. Prevalence of Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus in avian influenza negative birds from live bird markets and backyard and commercial farms in Ivory-Coast. *Res Vet Sci.* 2015; 102:83–88.
18. Ferrer R, Icochea E, Salas A, Alba M. Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de newcastle en *Gallus gallus* de Lima. *Rev Inv Vet Perú.* 2008; 19(1):67–74.

19. Romero M, Narvaez W, Sánchez J. Enfermedad de Newcastle en aves de traspatio del eje cafetero colombiano. *Rev MVZ Córdoba*. 2009; 14(2):1705-11.
20. 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*. 2014; 116(1-2):197-202.
21. Sanchez GVE, Sánchez GVE, Castillo FC, Neira AL. La prevalencia del virus de Newcastle en pollos nativos de las comunidades rurales en el sur de Ecuador. *CEDAMAZ*. 2016; 5(1):109-113.
22. Dunowska M, Zheng T, Perrott MR, Christensen N. A survey of avian paramyxovirus type 1 infections among backyard poultry in New Zealand. *N Z Vet J*. 2013; 61(6):316-22.
23. Moresco KA, Stallknecht DE, Swayne DE. Evaluation of different embryonating bird eggs and cell cultures for isolation efficiency of avian Influenza A Virus and Avian paramyxovirus serotype 1 from real-time reverse transcription polymerase chain reaction-positive wild bird surveillance samples. *J Vet Diagnostic Investig*. 2012;24(3):563-567.