

Desarrollo de una vacuna recombinante de nueva generación contra la enfermedad de Newcastle mediante la tecnología CRISPR/Cas9.

Katherine Calderón^{a,b}, Aldo Rojas-Neyra, Brighth Carbajal-Lévano, Gloria Guerrero-Fonseca, Manolo Fernández-Sánchez, Manolo Fernández-Díaz

FILIACIONES

- Laboratorios de Investigación y Desarrollo (I+D), Farmacológicos Veterinarios S.A.C.
- Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

CORREOS DE AUTORES

kcalderon@farvet.com
aldo.s@farvet.com
acarbajal@farvet.com
gloria.guerrero@farvet.com
manoloj@farvet.com
farvet@farvet.com

CONTENIDO

El herpesvirus de pavo (*Meleagrid alphaherpesvirus 1*, HVT) es uno de los vectores virales más utilizado para el desarrollo de vacunas recombinantes contra enfermedades aviares. En este estudio, se desarrolló un virus recombinante rHVT-F, utilizando como plataforma el genoma del HVT, con el objetivo de expresar la proteína de fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle (vENC).

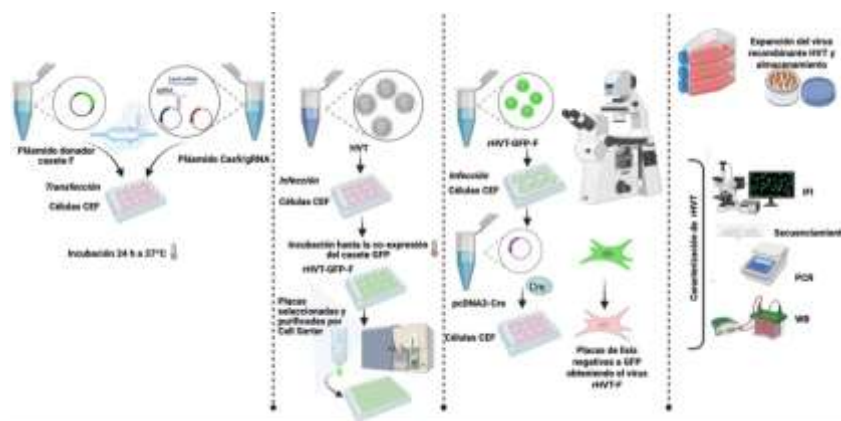
Para ello, el casete de expresión de la proteína fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle (vENC) genotipo XII fue introducido en la región intergénica UL45/46 del genoma del HVT mediante CRISPR/Cas9 asociada a la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ). El virus recombinante rHVT-F demostró estabilidad genética y expresión sostenida de la proteína F tanto *in vitro* como *in vivo* y, además, mantuvo una cinética de replicación similar a la del virus parental HVT wild-type (HVTwt).

La estabilidad y la expresión de la proteína F se evaluaron mediante PCR, inmunofluorescencia indirecta y Western blot. Asimismo, la inmunogenicidad y la eficacia protectora del rHVT-F fueron evaluadas en gallinas SPF y en pollos de engorde.

La respuesta humoral fue medida a los 20, 34 y 49 días post-vacunación (dpv) en gallinas SPF, y a los 32 y 42 dpv en pollos de engorde. Posteriormente, las aves fueron desafiadas con una cepa virulenta del genotipo XII del vENC por vía óculo-nasal-oral a los 49 dpv en gallinas SPF y a los 42 dpv en pollos de engorde. La diseminación viral fue evaluada mediante hisopados cloacales a los 3, 5 y 7 días post-desafío (dpd) en pollos SPF y a los 3 y 6 dpd en pollos de engorde. Los signos clínicos y la supervivencia fueron monitoreados hasta los 14 dpd.

El rHVT-F indujo una respuesta inmune humoral detectable en pollos inmunizados con una única dosis subcutánea al primer día de edad. Además, las aves vacunadas con rHVT-F alcanzaron una protección del 100% frente al desafío con vENC del genotipo XII. De manera significativa, la diseminación viral por vía cloacal se redujo en comparación con el grupo no inmunizado.

Estos resultados demuestran que el rHVT-F constituye un candidato vacunal recombinante prometedor contra la EN, con capacidad para inducir una protección clínica completa y reducir la excreción viral en gallinas SPF y en pollos de engorde. Este desarrollo representa una estrategia biotecnológica de nueva generación con potencial de aplicación en la prevención de enfermedades aviares de alto impacto sanitario y productivo.



Flujograma del desarrollo y obtención de la vacuna recombinante rHVT-F.

Katherine Ivette Calderon Mayo

Biologist, virologist, and Ph.D. candidate focused on the development and creation of new strategies for the control and prevention of viral diseases using viral vectors: Newcastle disease virus (NDV) via reverse genetics, turkey herpesvirus (HVT) and *Gallid alphaherpesvirus-3*/MDV Serotype 2 strain SB-1, both via CRISPR/Cas9, against various avian diseases: infectious bronchitis (IB), Marek's disease (MD), infectious bursal disease (IBD), infectious laryngotracheitis (ILT), Newcastle disease (NDV), and avian influenza (AI). Recently, she has been studying the oncolytic and cytotoxic capacity of the Newcastle disease virus (NDV) in tumor cell cultures. She currently works as a researcher in the Research and Development (R&D) Laboratory at Farmacológicos Veterinarios S.A.C. - Peru. As a researcher, she is currently a member of the Spanish Society of Virology (SEV), the World Society for Virology (WSV), and the American Association of Avian Pathologists (AAAP), and a member of the National Biosafety Commission of the College of Biologists of Peru (CBP) for 2025–2026, and of the Subcommittee on Biosafety and Biobanks for Research at the National Agrarian University of La Molina (UNALM) for 2024–2026.

REFERENCIAS

1. Chumbe A, Izquierdo-Lara R, Tataje-Lavanda L, et al. Characterization and Sequencing of a Genotype XII Newcastle Disease Virus Isolated from a Peacock (*Pavo cristatus*) in Peru. *Genome Announc.* 2015;3(4):e00792-15. doi:10.1128/genomeA.00792-15
2. Chumbe A, Izquierdo-Lara R, Tataje L, et al. Pathotyping and Phylogenetic Characterization of Newcastle Disease Viruses Isolated in Peru: Defining Two Novel Subgenotypes Within Genotype XII. *Avian Dis.* 2017;61:16-24. doi:10.1637/11456-062016-Reg
3. Izquierdo-Lara R, Chumbe A, Calderón K, Manolo FD, Vakharia VN. Genotype-matched Newcastle disease virus vaccine confers improved protection against genotype XII challenge: The importance of cytoplasmic tails in viral replication and vaccine design. *bioRxiv.* 2019;14(11):e0209539. doi:10.1101/492421
4. Sultan HA, Elfeil WK, Nour AA, et al. Efficacy of the newcastle disease virus genotype vii.1.1-matched vaccines in commercial broilers. *Vaccines.* 2022;10(1). doi:10.3390/vaccines10010029
5. Tang N, Zhang Y, Pedrera M, et al. A simple and rapid approach to develop recombinant avian herpesvirus vectored vaccines using CRISPR/Cas9 system. *Vaccine.* 2018;36(5):716-722. doi:10.1016/j.vaccine.2017.12.025
6. Liu H, de Almeida RS, Gil P, et al. Can genotype mismatch really affect the level of protection conferred by Newcastle disease vaccines against heterologous virulent strains? *Vaccine.* 2018;36(27):3917-3925. doi:10.1016/j.vaccine.2018.05.074
7. Miller PJ, King DJ, Afonso CL, Suarez DL. Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine.* 2007;25(41):7238-7246. doi:10.1016/j.vaccine.2007.07.017

PALABRAS CLAVES

CRISPR/Cas9

Newcastle Disease virus

Genotype XII

Shedding viral