

Análisis molecular de una cepa de virus de Newcastle de origen vacunal aislada a partir de un hisopado cloacal de aves sanas en Costa Rica - Molecular analysis of an isolated Newcastle disease virus strain obtained from cloacal swabs in healthy poultry farm in Costa Rica

León-Rodríguez, Bernal¹; **Vargas-Brenes Olga Marta**²; **Guevara-Soto, Maricruz**³; **Solano-Pereira, Max**⁴

¹ Laboratorio Seguridad, Departamento Servicio Nacional de Salud Animal, Ministerio de Agricultura y Ganadería. Costa Rica, Tel 506-22608300, e-mail: bleon@senasa.go.cr

² Sección Virología, Departamento Diagnóstico Veterinario, Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios, Servicio Nacional de Salud Animal, Ministerio de Agricultura y Ganadería. Costa Rica

³ Licenciada en Medicina Veterinaria. Patología, Escuela de Medicina y Cirugía Veterinaria San Francisco de Asís

⁴ Departamento Diagnóstico Veterinario, Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios, Servicio Nacional de Salud Animal, Ministerio de Agricultura y Ganadería. Costa Rica

Resumen

El virus de Newcastle (VNC) es un paramyxovirus tipo 1 (APMV-1) que pertenece a la familia Paramyxoviridae, género Avulavirus, los cuales son virus de ARN no segmentados de una sola hebra de polaridad negativa.

En Costa Rica, se vacuna con cepas de baja patogenicidad y nunca se ha detectado brotes de cepas de alta patogenicidad. En el artículo se informa sobre el aislamiento de una cepa de VNC la cual se hizo a partir de un huevo embrionado inoculado con un hisopado cloacal de una muestra de una parvada de aves que no presentó signos clínicos de la enfermedad. La cepa fue identificada por la prueba de inhibición de la hemaglutinación y confirmada por PCR. Posteriormente, se secuenció un fragmento de 310 pares de bases que incluyó el dominio de corte del gen F0 (posición 112 a 117 de la proteína), se demostró por análisis filogenéticos que la cepa aislada era de baja patogenicidad y de origen vacunal.

Palabras clave: Virus de Newcastle | inhibición de la hemaglutinación | PCR | secuenciación | análisis filogenéticos

Abstract

A Newcastle Disease Virus was isolated from an embryonated egg inoculated with a cloacal swab specimen fluid received for testing from a poultry flock without clinical signs. The sample was identify by the Hemagglutination-Inhibition Assay and confirmed by the Polymerase Chain Reaction technique (PCR). Subsequently, a region of the fusion protein gene FO of 310 base pairs (that included the cut site at position 112 to 117 of the protein) was sequenced and was demonstrated by phylogenetic and molecular analysis that the isolated strain was low pathogenic and vaccine origin.

Key words: Newcastle Virus|hemagglutination-inhibition assay|PCR|sequencing| phylogenetic analysis

Introducción

El virus de Newcastle (VNC) es un paramyxovirus tipo 1 (APMV-1) que pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, género *Avulavirus*, los cuales son virus de ARN no segmentados de una sola hebra de polaridad negativa (1).

Este tipo de virus muestra variabilidad patogénica, pudiendo presentar diferentes cuadros clínicos dependiendo del tipo de cepa, por ejemplo: Velogénica (Newcastle exótico) forma más virulenta con una alta mortalidad que puede ser velogénica viscerotrópico hemorragias gastrointestinales y o velogénica neurotrópico signos respiratorios y nerviosos, mesogénica, forma intermedia, baja mortalidad con signos respiratorios y esporádicamente nerviosos, cepas lentogénicas silvestres o vacunales (2), forma moderada, problemas respiratorios o entéricos leves, subclínicos y o asintomático (3). En el hombre este virus puede provocar conjuntivitis autolimitante que no deja secuelas (4).

Cepas del VNC de alta patogenicidad producen alta morbilidad y mortalidad en aves generando pérdidas económicas cuantiosas. En Estados Unidos de América, por ejemplo el costo de las medidas de control y sacrificio de las formas velogénicas hasta el 5 de agosto del 2003 en 4 estados del suroeste, fue aproximadamente de 188 millones de dólares, lo que correspondió al sacrificio de 9.3 millones de aves₂

Análisis molecular de una cepa de virus de Newcastle de origen vacunal aislada a partir de un hisopado cloacal de aves sanas en Costa Rica

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111109/111105.pdf>

infectadas o expuestas y la cuarentena de un poco más de 19000 granjas (5). No es de extrañar entonces, que este virus esté incluido en la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE (6).

Análisis filogenéticos recientes, basados en el tamaño del genoma y en la secuencia del gen F y de la polimerasa, han señalado dos clases dentro del serotipo 1 del virus de Newcastle (7). La mayoría de los virus notificados pertenecen a la clase II, mientras que la clase I incluye reportes de virus de aves acuáticas y en mercados de aves vivas en los Estados Unidos(8) Estos mismos estudios filogenéticos dentro de la clase II han determinado hasta el momento 9 genotipos.

El genoma del virus codifica para 6 proteínas, la ARN polimerasa dependiente de ARN (L), la proteína Hemaglutinina-Neuraminidasa (NH), una proteína de fusión (F), la proteína de la matriz (M), una fosfoproteína (P) y la nucleoproteína (N).

La proteína F permite la fusión de la membrana del virus con la membrana de la célula. Durante la replicación de los viriones el precursor de esta glicoproteína (F0) es cortada para producir dos proteínas F1 y F2 las cuales son necesarias para que estas partículas sean infecciosas (9).

Se ha determinado que la patogenicidad de las cepas está asociada a la secuencia de aminoácidos en el punto de corte de la proteína. La secuencia consenso en la región Carboxilo Terminal de la proteína F2 para cepas velogénicas y mesogénicas es 112R/K-R-Q-K/R-R-116 y una fenilalanina F117 en la terminación amino de la proteína F1, mientras que las cepas con baja patogenicidad, lentogénicas poseen la secuencia: 112G/E-K/R-Q-G/E-R116 y una L (leucina) en el residuo 117 (9,10,11).

En Costa Rica se vacuna con cepas vivas atenuadas del tipo lentogénicas y hasta el momento no se han presentado brotes de cepas velogénicas o mesogénicas.

Como parte del programa de vigilancia epidemiológica llevado a cabo por personal del Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA), junto con las empresas avícolas del país, se realizan constantes muestreos en granjas industriales, en los puertos de entrada de huevos fértiles e hisopados traqueales y cloacales de animales importados, muestreos aleatorios en diferentes granjas del país, incluyendo aves de traspatio tanto de animales sanos como denuncia de casos clínicos, con la finalidad de realizar una detección oportuna de la presencia de estos virus en las parvadas del país. Por esta razón es fundamental tener un método eficaz y rápido para el diagnóstico y diferenciación de las

distintas cepas del virus de Newcastle.

La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa conocidas en inglés por sus siglas PCR, es una metodología rápida, sensible y altamente específica que puede ser usada para ratificar un resultado previo obtenido de otra prueba, así como una sospecha en el caso de animales que presenten signos clínicos y un grado importante de mortalidad. Sin embargo, no basta con demostrar que se ha aislado un virus de Newcastle y que ha sido confirmado por PCR sino que también hay que demostrar si el virus aislado es de alta o baja patogenicidad. En esta publicación se informa sobre el aislamiento de un virus de Newcastle, realizado por el Laboratorio Seguridad (LSE) del Departamento Diagnóstico Veterinario del Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE).

Materiales y Métodos

Vigilancia epidemiológica.

El 26 de octubre del 2007 ingresaron 6 hisopados los que se identificaron con el protocolo D4533-07 y las muestras con los números 0999-07 hasta 1004-07, el cual correspondía a un muestreo rutinario de aves sanas de una granja localizada en la provincia de Alajuela.

Aislamiento viral a partir de huevos embrionados.

Los 6 hisopados de este protocolo se identificaron una vez que ingresaron al Laboratorio de Seguridad, posteriormente fueron centrifugados a 1000 rpm (DYNAC, Clay Adams Brand. USA) por 10 minutos, a cada sobrenadante se le agregó de 1400 µl a 2800 µl de una combinación de antibióticos (12) los cuales fueron inoculados el 31 de octubre de 2007 en huevos embrionados libres de patógenos específicos de 10-11 días de edad, (SPF- obtenidos en el Bioterio del SENASA).

Con cada hisopado se inocularon 3 huevos embrionados (procedimiento realizado dentro de una cámara de flujo laminar clase II A). Cada huevo fue limpiado en el área de la cámara de aire con alcohol iodado al 70%. Luego de una punción, se inocularon 300 µl del hisopado con una jeringa de 1 ml, adicionalmente, 100 µl fueron dispensados en un vial con 2 ml de caldo infusión cerebro corazón y se dejaron a 37 °C por 24 horas como control de esterilidad del hisopado. Los huevos se incubaron a 37 °C y se revisaron en el ovoscopio cada día durante 5 días. Se descartaron los embriones muertos dentro de las primeras 24 horas de haber sido inoculados. Se refrigeraron los embriones

4

Análisis molecular de una cepa de virus de Newcastle de origen vacunal aislada a partir de un hisopado cloacal de aves sanas en Costa Rica

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111109/111105.pdf>

mueritos del día 2 al día 5, al cabo de este periodo se dejaron los embriones sobrevivientes en refrigeración toda la noche. Al siguiente día se recolectó aproximadamente 1.5 ml del líquido amnio-alantoideo (LAA) de cada uno de los huevos.

Prueba de Hemaglutinación en placa (HA).

Los eritrocitos utilizados en la prueba de hemaglutinación y de inhibición de la hemaglutinación fueron obtenidos de aves seronegativas a la enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar, criadas y mantenidas en el Bioterio del SENASA.

Se realizaron diluciones seriadas de 50 µl del LAA en 50 µl de PBS (un total de 4 pozos de una placa de microtítulo), posteriormente se agregó a cada pozo, 50 µl de glóbulos rojos de ave al 0.5%, la mezcla se homogenizó con movimientos de rotación durante 1 minuto. (Se dejaron 5 pozos como control positivo, uno como control negativo y dos para control de células), luego de una incubación a temperatura ambiente de 40 minutos se realizó la lectura. Los LAA que presentaban HA, se montaron nuevamente por duplicado usando todos los pozos de las placas.

Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) en placa.

Una vez que las muestras ingresaron al laboratorio, se procesaron siguiendo la metodología descrita previamente (13).

Las muestras venían con una titulación hemoaglutinante de 1:2048 y se ajusta para una concentración de 16 unidades hemoaglutinantes UHA/ 50µl (8UHA/ 25 µl), en, solución bufferada fosfatos (PBS).

Se montó la muestra por triplicado junto con los respectivos controles: control negativo A, una hilera con la muestra en estudio enfrentada con un Suero control normal, Control negativo B, se empleó LAA recolectado de huevos tipo SPF utilizados en su oportunidad como controles negativos sin inocular, confirmados con reacción Hemoaglutinante negativa y almacenados a -80°C. Para el control positivo se utilizó una hilera con antígeno de Newcastle de referencia (136-ADV) enfrentado con el antisuero de referencia (433-ADV). Los controles fueron comprados en el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios, (NVSL), Ames, Iowa del USDA-APHIS.

Se dispensaron 25 µl del LAA reaccionante (16UHA/ 50 µl) en cada uno de los pozos. Se adicionaron 25 µl del antisuero de Referencia de

Newcastle en el primer pocillo y se realizaron diluciones seriadas a través de siete pozos.

Se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente; se adicionaron 50µl de suspensión de eritrocitos (GR) al 0.5% en cada pozo. La lectura se realizó cuando los GR control sedimentaron en el fondo del pozo, aproximadamente a los 20-30 minutos.

Índice de Patogenicidad: Tiempo promedio de muerte embrionaria.

El líquido alantoico infectivo es diluido en solución salina estéril se toman las diluciones 10^{-6} a 10^{-9} . De cada dilución, se inoculan 0.1mL en la cavidad alantoica de cada uno de 5 huevos embrionados (libres de antígeno específico de 9-10 días de edad) y se incuban a 37°C. Otros 5 huevos son inoculados con 0.1mL de cada dilución (mantenidas a 4°C) 8 horas después y se dejan incubando a 37°C.

Cada huevo se examina dos veces al día durante 7 días y la fecha y hora de muerte de cada embrión se apunta. La dosis letal mínima es la dilución más alta de virus que cause la muerte de todos los embriones que fueron inoculados con esa muestra.

El tiempo medio de muerte (Mean Death Time -MDT) es el tiempo medio en horas para la dosis letal mínima en matar todos los embriones inoculados.

El MDT ha sido utilizado para clasificar cepas de NDV en velogénicas (toman menos de 60 horas en matar); mesogénicas (toman entre 60-90 horas en matar); y lentogénicas (toman más de 90 horas en matar).

Extracción de ácido nucleico.

Las vacunas B1 y La Sota liofilizadas se reconstituyeron, cada una, con 5 ml de agua destilada estéril y se extrajeron junto con el antígeno de Newcastle NDV AG136 utilizado en la IHA, para ello se usó un método comercial por columnas y centrifugación (NucleoSpin® Macherey-Nagel Alemania).

Prueba PCR Newcastle Comercial.

Las muestras se retrotranscribieron y amplificaron utilizando un protocolo de un PCR comercial (Genekam Biotechnology AG, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se hizo una dilución 1:100 del retrotranscripto y se realizó el PCR comercial para Newcastle.

Retrotranscripción de las muestras extraídas.

Se agregó 1 µl de hexámeros (300 ng/ µl), 2 µl DNtps (10 mM Sigma, USA.), 4 µl de muestra extraída, posteriormente se incubó a 70 °C por 10 min, luego se puso en hielo, después de esto se agregó 1 µl de Retrotranscriptasa RT (virus de leucemia murina Maloney, 200 unidades/ µl, Sigma USA.), 2 µl de Buffer de la RT, 0.5 µl del Inhibidor de RNAsas (40 unidades/µl Roche, USA.) y 6.5 µl de agua tratada con DEPC para un total de 20 µl de reacción. La reacción se corrió en un termociclador 2400 Eppendorff, con el siguiente esquema 42 °C por 60 min, 99 °C por 5 min.

Prueba PCR Newcastle adaptado por el LSE.

La metodología de este PCR se adaptó de un protocolo publicado por Pang y colaboradores 2002 (14). Las muestras se amplificaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 de Perkin Elmer. La región amplificada va de la posición 148 nt a 457 nt del gen F del virus de Newcastle tomando como referencia la secuencia EU330230.

Detección de productos amplificados

Tanto para el PCR comercial como para el adaptado se utilizaron geles de agarosa al 2%. A cada muestra se le agregó 2 µl de buffer de corrida y se usó un marcador molecular de 100 a 1000 pb. Se cargaron 10 µl de muestra a analizar por pozo y se corrieron a 120 v por 40 min

Tanto para el PCR comercial como para el PCR "adaptado" el tamaño del amplicon debe ser de 320 pb

Purificación de las bandas a partir de agarosa.

Las bandas positivas observadas en el PCR "adaptado" fueron seccionadas del gel de agarosa y purificadas utilizando un kit de Qiagen (EUA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Reacción de secuenciación.

Se utilizaron los mismos iniciadores de la reacción de PCR a una concentración de 1.6 µM, 2 µl de cada iniciador, 4 µl del ADN purificado, 4 µl de master mix Big Dye (Apply Biosystems, USA.), 2 µl Buffer (Apply Biosystems, USA.), 8 µl agua, las muestras se corrieron en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), con el siguiente programa 96 °C por 1 min y 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 50 °C por 5 seg, 60 °C por 4 min, se mantuvo a 4 °C, finalmente se₇

Análisis molecular de una cepa de virus de Newcastle de origen vacunal aislada a partir de un hisopado cloacal de aves sanas en Costa Rica

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111109/111105.pdf>

precipitó el ADN usando EDTA y acetato de sodio 3 M y se realizó la electroforesis en un secuenciador Genetic Analyzer 3130.

Análisis filogenético.

Una vez que se limpiaron las secuencias 1002-2 y La Sota se alinearon usando el programa Bioedit (15), junto con otras secuencias obtenidas de Genbank los números de acceso aparecen en la fig 3. El análisis filogenético se realizó usando el programa Mega (16), utilizando la prueba de Neighbor-Joining, con un bootstrap de 1000 réplicas.

Resultados

En el cuadro 1 se presenta la mortalidad observada en los embriones pos inoculación.

Tabla 1. Mortalidad de los embriones inoculados con hisopados de muestras traqueales o cloacales.

Muestra	Días pos inoculación					
Hisopado	1	2	3	4	5	6
999	1 ⁺ -1 [*]					
1001	1-3	1-2			1-1	
1002	1-1				1-3	
1003			1-2		1-3	
1004	1-3	1-1				
1005	1-2	1-3				

⁺ cantidad de embriones muertos en ese protocolo

^{*} corresponde al número que se le dió al huevo inoculado

Todos los huevos, excepto aquellos cuyos embriones murieron el día 1 de inoculación, fueron recolectados el 6 de noviembre de 2007. El 7 de noviembre se realizó la prueba de hemoaglutinación, solo en el LAA recolectado del huevo 2 del hisopado 1002 se observó una reacción de hemoaglutinación con un título preliminar 1:16. El 13 de noviembre se pasó una alícuota al laboratorio de Virología donde se realizó la prueba de inmunodifusión en agar para influenza, la cual dió negativa el 14 de noviembre. Ese mismo día se repitió la prueba de hemoaglutinación por duplicado usando todos los pozos de la placa, el título alcanzado fue de 1:256. Con el resto del LAA del huevo 2 se inocularon 3 huevos para un segundo pasaje el 14 de noviembre, el embrión del huevo 3 murió el primer día (no se recolectó) y los dos restantes el día 5, la recolección se realizó el 20 de noviembre, el 22 se hizo la prueba de hemaglutinación, título 1:16 y el siguiente día se repitió la prueba en la

placa completa por duplicado, el título fue de 1:2048. La cantidad de LAA permitió esta vez hacer extracción de ácidos nucleicos para realizar la prueba de PCR y se remitió parte del LAA al laboratorio de Virología, la muestra repitió negativa por inmunodifusión en agar gel para influenza aviar pero dio positiva la prueba IHA para la enfermedad de Newcastle el día 26 de noviembre. El título final obtenido fue mayor a 1:128, sin embargo, no fue posible obtener la titulación final debido a la poca existencia disponible de la muestra.

En la fig 1, se presenta el resultado del PCR comercial, se observa una banda esperada (320 pb) en el carril 1, vacuna B1, carril 2, antígeno NDV AG136, carril 3, muestra del LAA 1002-2 así como en el 6, control positivo de la prueba y carril 9, dilución 1:1000 de la muestra extraída del segundo pasaje. No se observó amplificación en los carriles 4, control de reactivos (agua), 5 control negativo de la prueba o en los 7 y 8 resultado de la amplificación de las diluciones 1:1000 de la vacuna B1, y el antígeno NDV AG136 respectivamente.

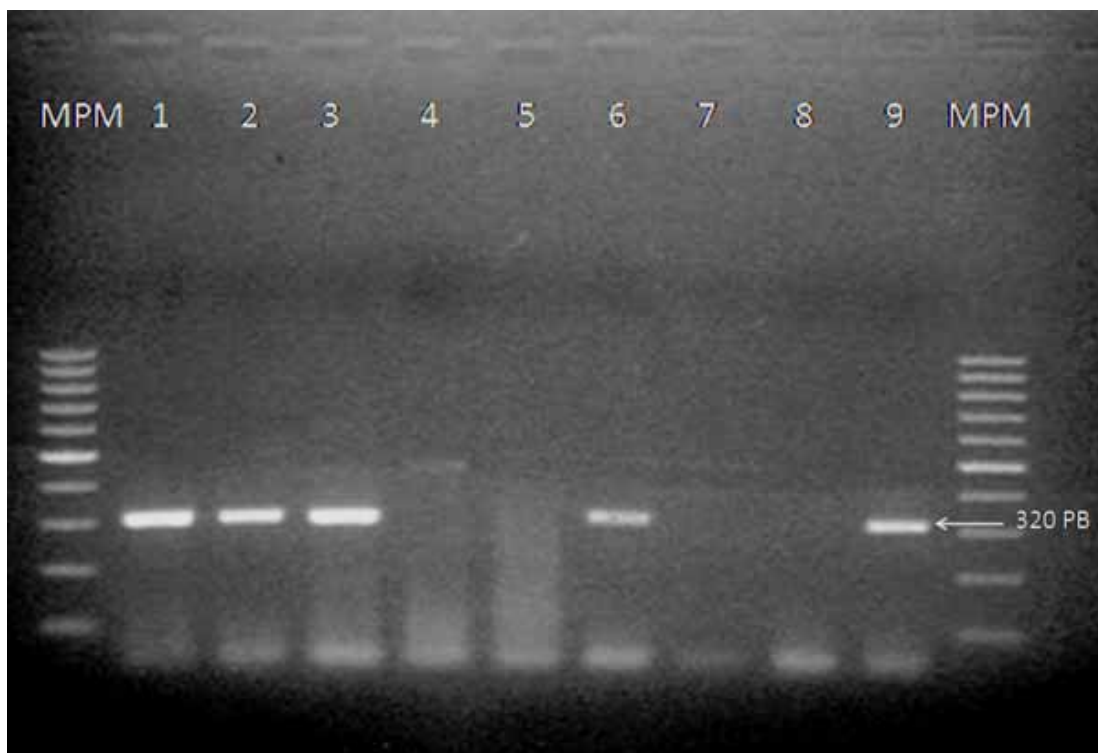


Fig 1. PCR Newcastle comercial

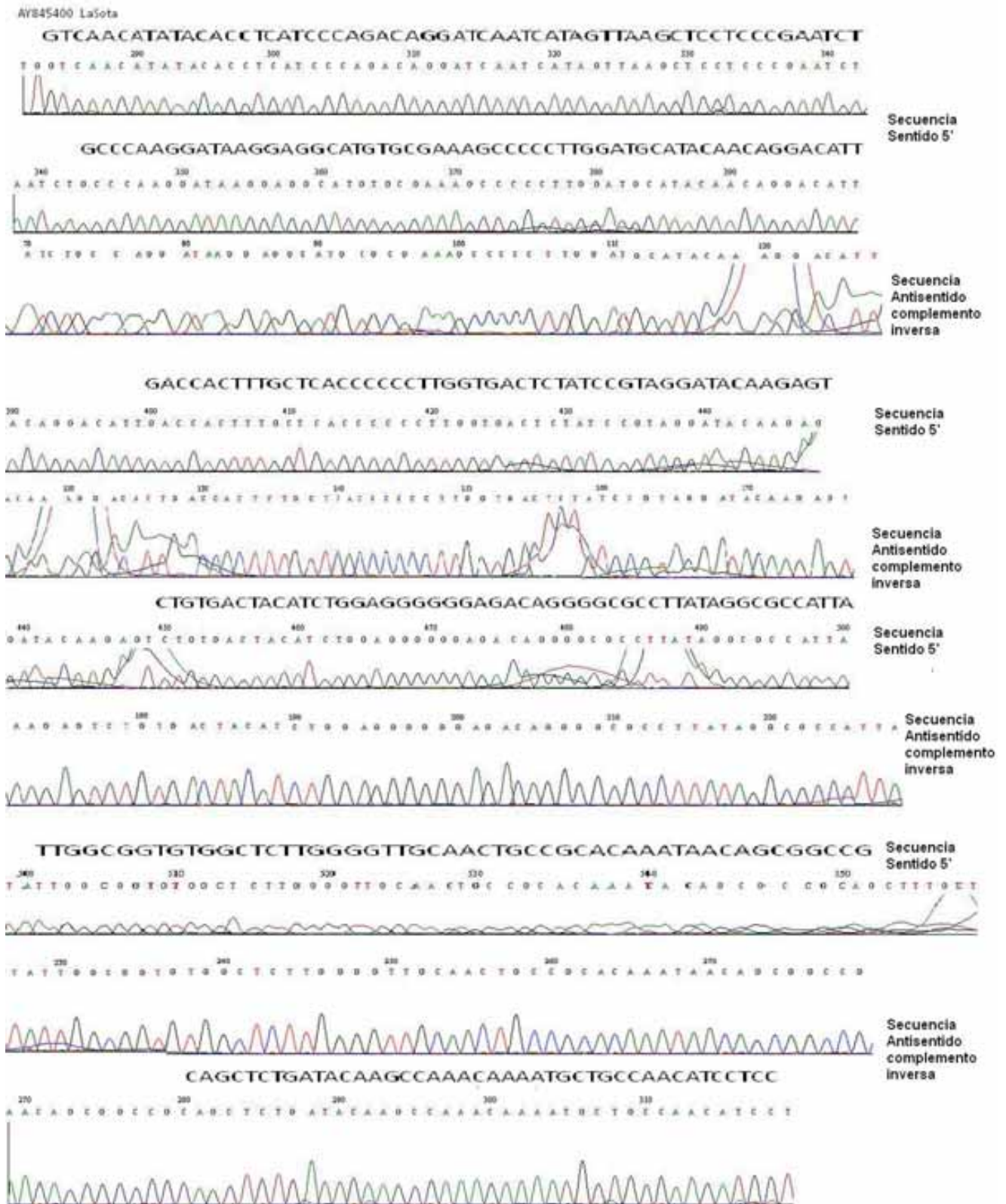


Fig 2. Electroferograma de la secuencias sentido 5' y antisentido 3'

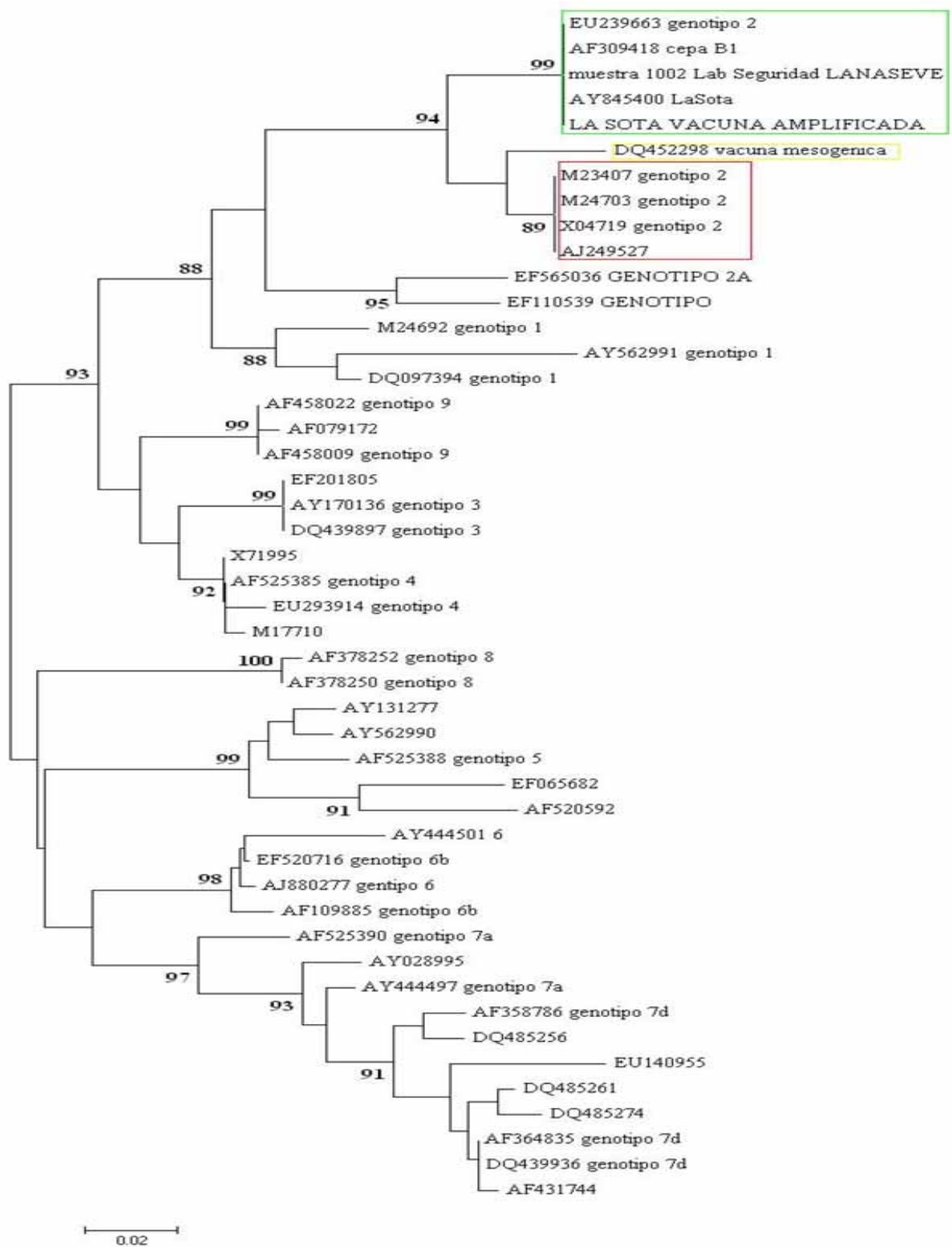


Fig 3. Dendrograma de los diferentes genotipos del virus de Newcastle

El electroferograma de la secuenciación se muestra en la fig 2, tanto de la secuencia sentido como antisentido (complementaria inversa) de la muestra 1002-2 las cuales se analizaron con el programa DNASTAR (USA) usando como patrón la secuencia La Sota obtenida del Genbank con el número de acceso AY845400. Es importante notar que en ciertas regiones donde la secuencia no es nítida en uno de los sentidos la secuencia es compensada en el otro sentido.

La muestra 1002-2 aislada en el Laboratorio de Seguridad del Departamento Diagnóstico Veterinario del LANASEVE, se ubica en el genotipo 2, junto con las cepas vacunales B1 y La Sota tanto la secuenciada como la obtenida del Genbank así como también la cepa EU239663, no se observó diferencias en la secuencia de nucleótidos en estas secuencias con un valor bootstrap de 99. Dentro del genotipo 2, pero en un nodo diferente se observan otras secuencias como Beaudette C y Texas G.B (ambas velogénicas), separada de estas se encuentra la cepa mesogénica DQ452298, fig 3.

Finalmente, en la figura 4, se muestra la comparación de los dominios del sitio de corte del precursor de la proteína F (112-117). Las cepas lentogénicas del dendrograma fig 3 de los genotipos 2 y 1 presentan la misma composición de aminoácidos que a la cepa aislada en nuestro laboratorio. La cepa AF309418 que aparece en el dendrograma junto con la cepa aislada 1002, corresponde a la cepa vacunal lentogénica Hitchner B1.

Fig 4.- Dominio del sitio de corte del precursor de la proteína FO

EU293914	RRQRRF
AF458009	RRQRRF
AF458022	RRQRRF
DQ439897	RRQRRF
AF378252	RRQKRF
X71995	RRQRRF
M17710	RRQRRF
AY444501	RRQKRF
EF201805	RRQRRF
AY170136	RRQRRF
AY131277	RRQKRF
AY562990	RRQKRF
AF525385	RRQRRF
AF525388	RRQKRF
AY444497	RRQKRF
AF525390	RRQKRF
EF520716	RRQKRF
AF079172	RRQRRF
DQ439936	RRQKRF
AF364835	RRQKRF
AF431744	RRQKRF
AJ249527	RRQKRF
AF520592	RRQKRF
DQ485261	RRQKRF
DQ485256	RRQKRF
DQ485274	RRQKRF
M24703	RRQKRF
EF065682	RRQKRF
AF358786	RRQKRF
AF378250	RRQKRF
AY028995	KRQKRF
M23407	RRQKRF
X04719	RRQKRF
AJ880277	GRQKRF
AF109885	GRQKRF
DQ452298_vacuna_mesogenica	RRQKRS
EF565036	EKQGRL
EF110539	GKQGRL
AY562991	GKQGRL
EU140955	GRQARL
DQ097394	GKQGRL
M24692	GKQGRL
EU239663	GRQGRL
AF309418	GRQGRL
muestra_1002_Lab_Seguridad_LAN	GRQGRL
LA_SOTA_VACUNA_AMPLIFICADA	GRQGRL
AY845400_LaSota	GRQGRL

Debido a problemas de infraestructura, se decidió utilizar la prueba de mortalidad promedio de huevos embrionados en vez del índice de patogenicidad intracerebral. Después de inoculados los huevos se determinó que la menor dilución en la que murieron todos embriones fue 10^{-8} y que el periodo en el que se logró el 100% de la mortalidad fue mayor a 90 horas.

Discusión

Las cepas velogénicas de la enfermedad de Newcastle están incluidas en la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), por lo que su diagnóstico debe ser notificado a este organismo, lo que conlleva a realizar estrictas medidas cuarentenarias, el sacrificio inmediato de las aves involucradas en el brote, así como embargos comerciales (6). Por esta razón la caracterización y posterior diferenciación de este tipo de cepas con respecto a las mesogénicas y lentogénicas es de suma importancia.

Esta caracterización puede ser realizada con técnicas "*in vivo*" como el índice de patogenicidad intracerebral (ICPI) realizado en pollitos de un día de edad, el tiempo promedio de muerte de huevos embrionados (MDT) libre de patógenos específicos y el índice de patogenicidad intravenoso (IVPI) realizado en aves de 6 semanas de edad, además de estas pruebas biológicas la OIE ha aceptado también el patrón de aminoácidos derivado de la secuenciación de nucleótidos en el sitio de corte de la proteína F como criterio adicional de virulencia (15).

En este estudio se implementó el criterio utilizando la técnica molecular como metodología válida para determinar el grado de virulencia de la cepa aislada en el laboratorio, a partir de huevos embrionados SPF, y se reforzó el criterio con la prueba MDT. Adicionalmente, se realizó un análisis filogenético para establecer el posible origen de la cepa aislada.

El conocer los linajes o genotipos de cualquier agente infeccioso es muy importante desde el punto de vista epidemiológico, ya que permite rastrear el origen de estos y así tomar medidas de control para evitar futuros brotes. Con respecto a Newcastle varias panzoótias se han dado en el mundo correspondientes a los genotipos II, III y VI. En Japón, el genotipo VII está empezando a desplazar al VI en aves domésticas (17). En Costa Rica no tenemos cepas velogénicas circulando y se vacuna con cepas lentogénicas. Aún no hemos generado estudios sobre la situación de posibles cepas lentogénicas en aves acuáticas las que según la

literatura podrían jugar un papel importante en la epidemiología de VNC en brotes en aves domésticas o industriales (18).

El virus de Newcastle afecta alrededor de unas 250 especies de aves, siendo las aves acuáticas las más resistentes, las cuales pueden ser reservorios de la enfermedad (18). Nuestro país al igual que el resto del istmo Centroamericano es un corredor biológico y poseemos gran diversidad de aves y entre esa gran variedad tenemos especies que podrían ser portadoras de la enfermedad (19), razón por la cual es necesario estar constantemente muestreando las granjas industriales, así como los casos de denuncias de presencia de signos clínicos en aves de traspatio y a nivel de laboratorio responder con un diagnóstico preciso en el menor tiempo posible.

Por esta razón se han desarrollado diferentes metodologías como: PCR tiempo real para diferenciar entre cepas de alta y media patogenicidad, sin embargo, este tipo de pruebas podrían no detectar todas las cepas debido a mutaciones en los genes donde se unen los iniciadores o las sondas (5). Los iniciadores usados en este estudio fueron seleccionados de regiones bastante conservadas con muy pocos polimorfismos según se constató cuando se compararon con secuencias de los diferentes genotipos obtenidos del genbank.

A nivel molecular se han usado enzimas de restricción que reconocen el sitio de corte del gen F y que logren diferenciar entre cepas de baja o alta patogenicidad (20). Sin embargo; la eficacia de este método también está sujeta a que no se den mutaciones en la secuencia de nucleótidos, por lo que la secuenciación del gen F sigue siendo la técnica de elección para demostrar molecularmente el grado de virulencia de la cepa aislada así como la presencia de estas mutaciones.

Publicaciones previas han establecido que la secuenciación del gen F o en su defecto de regiones que van del nucleótido (nt) 47 al 420 nt o del 329 nt al 582 pueden ser usados para determinar relaciones filogenéticas de cepas de Newcastle, seleccionando el fragmento de nucleótidos de la región variable 47 al 420 nt como el fragmento de referencia o estándar para el genotipo de las cepas de Newcastle (18, 21, 22).

En un estudio realizado en China en el que se aislaron 30 cepas de brotes desde 1996 hasta el 2005 en el que se compararon estas 3 regiones, los autores concluyen que la secuenciación del gen F completo sería la mejor opción para realizar análisis filogenéticos (21). Así mismo señalan, que la secuenciación del sitio de corte de la proteína F no es suficiente para caracterizar adecuadamente la patogenicidad de una cepa del virus de Newcastle, por lo que deben de realizarse además

ensayos "in vivo". Otro estudio también realizado en China comparó también 3 regiones del gen F que van del nt 47 al 420, 329 al 582, y del 47 I a1708, a diferencia del estudio anterior estos autores señalan que estas 3 regiones pueden ser usadas para realizar análisis filogenéticos; pero concuerdan en indicar que el sitio de corte no es suficiente para caracterizar con precisión la virulencia de la cepa (22, 23).

Según el manual de pruebas diagnósticas y vacunas para los animales terrestres de la OIE, en la definición de caso de enfermedad de Newcastle, dada la extrema variación de los signos clínicos y virulencia observada por las cepas de este virus se decidió que para reportar un brote de enfermedad de Newcastle, la cepa debe de cumplir con uno de los siguientes criterios de virulencia:

Un índice de patogenicidad intracerebral mayor o igual a 0.7 o cumplir con el patrón de aminoácidos descrito anteriormente para cepas mesogénicas o velogénicas, si dicho patrón no puede ser establecido debe recurrirse al índice (ICPI).

Un aspecto importante que se debe recalcar es que a diferencia de los estudios Chinos citados previamente en los que se señala la importancia de caracterizar los aislamientos con el uso de pruebas biológicas, los animales de donde provino la muestra 1002-2 eran aves de 15 semanas que no presentaban ningún tipo de signo clínico. En el estudio de Qin et al, las aves presentaron mortalidades que variaron de un 90% en animales jóvenes a menos de un 2% en aves de postura, en las que se observó una caída en la producción de huevos de un 90 a un 40% (21), en el segundo estudio de Tan et al, la mortalidad fue de 71% en palomas mensajeras, dos meses después se presentó un brote en pollos con una mortalidad de un 97% (22),

Con respecto a las pruebas biológicas en el estudio de Qin et al, (21) dos muestras caracterizadas por el ICPI y por la secuencia de aminoácidos como velogénicas, fueron catalogadas como lentogénicas por el IVPI (21), mientras que en un estudio realizado en Canadá durante un brote en Cormoranes, el ICPI clasificó 5 aislamientos como mesogénicos (0.7- < 1.60) y 6 velogénicos (> 1.60), mientras que el IVPI en estos mismos aislamientos fueron 9 lentogénicos (<1.40) y 2 velogénicos (> 1.60), (según la clasificación de ICPI e IVPI dada por Qin, (21) mientras que todos los 15 aislamientos aislados en el brote en Canadá presentaron la secuencia RRQKR*F correspondiente a cepas mesogénicas o velogénicas (24).

De estos resultados se desprende que estos índices tampoco presentan una buena correspondencia entre sí. Nosotros nos inclinamos por el índice MDT por lo práctico de la prueba ya que no requería lidiar con

los animales lo que representa: manejo adecuado e instalaciones con un mayor grado de bioseguridad, el resultado del MDT apoyó los resultados moleculares indicando que la cepa aislada correspondía a un virus lentogénico.

Un método *in vitro* que podría diferenciar entre cepas de velogénicas de lentogénicas es el uso de proteasas tales como tripsina la cual es fundamental para que se formen placas en cultivos celulares infectados con cepas lentogénicas, mientras que con cepas virulentas no es necesario el uso de tripsina para que se formen dichas placas, sin embargo; esta técnica también presenta sus excepciones (18) y no está avalada por la OIE. El uso de esta metodología como el de ICPI (sin el uso de controles de cepas velogénicas) podría ser implementada y evaluada en nuestro laboratorio, siempre y cuando las condiciones de infraestructura lo permitan, para realizar una mejor caracterización de cualquier otra cepa que se logre aislar en un futuro

Con respecto a la validez del tamaño del fragmento para realizar análisis de secuencias podemos señalar que en el presente estudio, el fragmento amplificado y secuenciado (320 pb) cubre un 73% de la región nt 47 al 420 y se extiende 37 nt mas hacia el extremo 3 prima. Otros autores han realizado estudios filogenéticos con fragmentos incluso más pequeños 252 pb del 282 nt al 535 nt (25).

El fragmento secuenciado aquí, pudo discriminar entre los diferentes genotipos del virus de Newcastle según los resultados obtenidos en la fig 3, indicando que la cepa aislada pertenece al genotipo II del virus de Newcastle y lo que es más importante fue capaz de diferenciar entre las cepas lentogénicas y velogénicas dentro de este genotipo; no obstante, no permitió diferenciar entre las cepas B1, la Sota, la secuencia EU239661 y la cepa aislada en el LANASEVE.

Comparando el fragmento que va del nt 47 al 146 del gen F (el cual no es abarcado por la región amplificada en este estudio), en estas mismas secuencias obtenidas del genbank, (excepto la 1002-2) la cepa B1 se diferencia de la Sota por 4 nucleotidos y la Sota presenta un nucleótido de diferencia cuando se compara con la secuencia EU23966 (datos no mostrados).

En conclusión debido al aislamiento de una cepa del virus de Newcastle a partir de hisopados cloacales realizada en el LANASEVE, se implementaron metodologías moleculares y biológicas como el índice MDT, para caracterizar esta cepa demostrándose que el aislamiento 1002-07 correspondió a una cepa lentogénica vacunal, ubicada dentro

del genotipo 2, y que dichas metodologías son herramientas valiosas para la caracterización de cepas de Newcastle en futuros estudios.

Agradecimientos.

A todas la personas que leyeron el borrador de este artículo y nos dieron sus sugerencias. En especial a la Sra. Esmeralda Vásquez y al Sr. Fabián Carbajal técnicos del Laboratorio de Seguridad quienes realizaron el aislamiento viral y la hemaglutinación, el índice MDT así como la extracción del ARN y a la Sra. Alejandra Ballesteros, quien realizó la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación.

Bibliografía

1. Mayo MA A summary of the changes recently approved by ICTV. Arch Virol. 2002, Vol. 147, p. 1655–1656
2. Curso Capacitación en Diagnóstico Básico para la Detección Temprana de Influenza Aviar Altamente Patógena en México y Centroamérica, 23 al 27 de abril de 2007, San José, Costa Rica.
3. Murphy, F.A., Gibas, E.P., Horzinek, M. C., Studder, M.J.,. *Veterinary Virology*. Academic Press 3 ed USA1999, vol. p 411 421.
4. Capua, I., and Alexander, D. J. Human Health Implications of Avian Influenza Viruses and Paramyxoviruses. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004, vol. Vol.23, p. 1-6
5. Wise, M G., Suarez, D.L., Seal, B.S., Pedersen, J.C., Senne, D.A., King, D. J., Kapczynski, D. R., and Spackman, E. Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for Detection of Newcastle Disease Virus RNA in Clinical Samples. J. Clin. Microbiol. 2004, vol. 42, p. 329–338.
6. Organización Mundial de Salud Animal. 2007. Newcastle disease. International Health Code, 10th ed. OIE, Paris, France. Disponible en:
URL: http://www.oie.int/esp/maladies/es_alpha.htm
7. Czeglédi, A., D., Ujvari, E., Somogyi, E., Wehmann, O., Werner, and. Lomniczi, B. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. Virus Res. 2006, vol. 120, p. 36–48.
8. Kim, M. L., King, D. J., Suarez, D.L., Wong, C. W., and Afonso, C. L. Characterization of Class I Newcastle Disease Virus Isolates from Hong Kong Live Bird Markets and Detection Using Real-Time. Reverse Transcription-PCR J. Clin. Microbiol 2007, vol. 45, p. 1310–1314

9. Nagai, Y., Klenk, H. D. & Rott, R. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 1976, vol. 72, p. 494–508.
10. Kawahara, N., Yang, X. Z., Sakaguchi, T., Kiyotani, K., Nagai, Y. and Yoshida, T. Distribution and substrate specificity of intracellular proteolytic processing enzyme(s) for paramyxovirus fusion glycoproteins. *J Gen Virol* 1992, vol. 73, p. 583–590.
11. Sakaguchi, T., Matsuda, Y., Kiyokage, R., Kawahara, N., Kiyotani, K., Katunuma, N., Nagai, Y. & Yoshida, T. Identification of endoprotease activity in the trans Golgi membranes of rat liver cells that specifically processes in vitro the fusion of virulent Newcastle disease virus. *Virology*. 1991, vol. 184, p. 504–512.
12. Panigrahy, B., and Schmitt, B. Preparation of Antibiotics to treat inoculums for virus isolation in embryonating eggs. USDA, NVSL. 2005: 1-4
13. . Senne, D..A. Manual de Procedimientos, AVPRO0800.04, Hemagglutination-Inhibition Test to Detect Serum Antibodies to Avian paramyxoviruses. USDA-APHIS, NVSL, National Veterinary Services Laboratories. 2005. p, 1–15.
14. Pang, .Y, Wang, H., Girshick, T., Xie, Z., Khan, .M. I. Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents. *Avian Dis*. 2002. Vol 46, p. 691-9.
15. Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999, vol. 41:95-98.
16. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007, vol. 24, p. 1596-1599.
17. Mase, M., Imai, K., Sanada, Y., Sanada, N., Yuasa, N., Imada, T., Tsukamoto, K. and Yamaguchi, S. *J. Clin. Microbiol.* 2003, vol. 40: 3826–3830 Erratum in: *J. Clin. Microbiol.* 41, p. 528–529.
18. Sakai, K., Sakabe, G., Tani, O., Watanabe, Y., Jahangir, A., Nakamura, M., and Takehara, K. Characterization of Newcastle Disease Virus Isolated from Northern Pintail (*Anas acuta*) in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2007, vol. 69, p. 1307–1311.
19. Charif T. Boletín Veterinario oficial, Subdepartamento de Vida Silvestre, División de Protección de los Recursos Naturales Renovables Servicio Agrícola y Ganadero, Qué hacen aquí esas gaviotas... qué hacen aquí, tan lejos de su lugar natal. Chile. Disponible en:
URL: http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_5_primer_semestre_2006/articulos/migraciones_aves.pdf
20. Caribbean Net news. Disponible en: URL:
<http://www.caribbeannetnews.com/news-2572--27-27--.html> 18

21. The poultry site. Disponible en:
URL: <http://www.thepoultrysite.com/poultrynews/16618/belize-hit-by-more-newcastle-disease>
22. Kou, Y.T., Chueh, L. L., and Wang, C.H. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the F Gene of Newcastle Disease Viruses Isolated from Chickens and an Owl in Taiwan. J. Vet. Med. Sci. 1999, vol. 61, p. 1191–1195.
23. Qin, Z. M., Tan, L. T., Xu, H.Y., Ma, B.C., Wang, Y.L., Yuan, X. Y., Liu, W. J. Pathotypical Characterization and Molecular Epidemiology of Newcastle Disease Virus Isolates from Different Hosts in China from 1996 to 2005. J. Clin. Microbiol. 2008, vol. 46, p. 601–6
24. Tan, L. T., Xu, H. Y., Wang, Y.L., Qin, Z. M., Sun, L., Liu, W. J., Cui, Z. Z. Molecular Characterization of Three New Virulent Newcastle Disease Virus Variants Isolated in China. J. Clin. Microbiol. 2008, vol. 46, p. 750–753.
25. Yu, L., Wang, Z., Jiang, Y., Chang, L., Kwang, J. Characterization of Newly Emerging Newcastle Disease Virus Isolates from the People's Republic of China and Taiwan. J. Clin. Microbiol. 2001, vol. 39, p. 3512–3519.
26. Weingartl, H. M., Riva, J., and Kumtheke, P. Molecular Characterization of Avian Paramyxovirus 1 Isolates Collected from Cormorants in Canada from 1995 to 2000. J. Clin. Microbiol. 2003, vol. 41, p. 1280–1284.
27. Berinstein A., Sellers H. S., King D. J., Seal, B. S. Use of a Heteroduplex Mobility Assay To Detect Differences in the Fusion Protein Cleavage Site Coding Sequence among Newcastle Disease Virus Isolates. J. Clin. Microbiol. 2001, vol. 39, p. 3171–3178.

REDVET: 2009 Vol. 10, Nº 11

Recibido 11.05.09 - Ref. prov. MAY050926 – Revisado 03.08.09 - Aceptado 30.10.09
Ref. def. 110905_RED VET - Publicado 15.11.09

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111109.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111109/110905.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://revista.veterinaria.org>