

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
UNIDAD DE POSGRADO

**Caracterización molecular del virus de la enfermedad
de Newcastle aislado de aves de diferentes regiones del
Perú**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Lidia Beatriz CONZA BLANCO

Lima – Perú

2012

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
I. INTRODUCCION	1
Objetivos específicos	2
II. ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO	3
Características del virus	3
Morfología	4
Replicación viral y susceptibilidad a agentes físicos y químicos	5
EPIDEMIOLOGIA: Distribución	6
HOSPEDEROS NATURALES Y EXPERIMENTALES	8
ENFERMEDAD DE NEWCASTLE	9
PATOGENICIDAD	9
CLASIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD NEWCASTLE	10
Virus ENC clase I	11
Virus ENC clase II	11
CLASIFICACION DE LA PATOGENICIDAD	12
DETERMINACION DE LA VIRULENCIA	14
PARAMIXOVIRUS AVIAR TIPO 1 DE PALOMA (PPMV-1)	17
DIAGNOSTICO DE LA ENC	18
Identificación del agente	18
• Aislamiento viral	18
• Anticuerpos monoclonales	18
• Técnicas moleculares	18
○ PCR convencional	19
○ Análisis con enzimas de restricción	19
○ PCR tiempo real	20
• Índices de Patogenicidad	21
• Estudios Filogenéticos	21
Pruebas serológicas	22

	DIAGNOSTICO DIFERENCIAL	23
III.	MATERIAL Y METODOS	24
	Muestras Biológicas	24
	Aislamiento viral	25
	Extracción ARN	25
	Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	26
	PCR convencional	26
	Análisis con enzimas de restricción	27
	PCR en tiempo real	28
	Secuenciamiento de ADN	31
IV.	RESULTADOS	33
	Pruebas biológicas	33
	Pruebas moleculares	33
	• PCR convencional	33
	• PCR tiempo real	36
	• Análisis del lugar de división de la proteína Fusión	37
	Análisis genético de secuencias	39
V.	DISCUSIÓN	46
	VI.CONCLUSIONES	51
	VII.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	52
VIII.	ANEXOS	64

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Tipo de muestra y procedencia de las aves con diagnóstico de vENC

Cuadro 2. Secuencia de cebadores y sondas de RT-PCR tiempo real para vENC

Cuadro 3a. Componentes de RT-PCR tiempo real PMVA-1 (gen matriz)

Cuadro 3b. Componentes de RT-PCR tiempo real ENC virulento (gen fusión)

Cuadro 4. Condiciones de ciclaje para cebadores y sondas del gen matriz y fusión

Cuadro 5. Interpretación de RT-PCR usando set de cebadores y sondas matriz y fusión vENC

Cuadro 6. Secuencias nucleotídicas del virus de la enfermedad de Newcastle obtenidas del Genbank usadas para el análisis filogenético.

Cuadro 7. Tipo de virus de la enfermedad de Newcastle según tipo de ave y procedencia mediante pruebas moleculares.

Cuadro 8. Cambio en secuencia nucleotídica aminoacídica de la proteína F0 según tipo de virus ENC.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Ubicación del gen F, dentro del genoma del virus Newcastle, se encuentra aproximadamente entre los nucleótidos 4500 y 6200.

FIGURA 2. Lugar de división de la proteína de fusión y secuencia de aminoácidos básicos de vENC virulentos y no virulentos.

FIGURA 3. Prueba de RT-PCR convencional y REA mostrando el gen fusión de cepas ENC virulentas.

FIGURA 4. Prueba de RT-PCR convencional y REA mostrando el lugar de restricción BgI de cepas ENC “no virulentas”.

FIGURA 5. Fluorograma de muestras positivas a vENC mediante PCR tiempo real gen matriz.

FIGURA 6. Fluorograma de muestras positivas a vENC virulento mediante PCR tiempo real gen fusión.

FIGURA 7. Alineamiento de la secuencia nucleotídica y aminoacídica parcial de la proteína fusión del virus Newcastle genotipo 2.VII con otras secuencias relacionadas.

FIGURA 8. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas parciales del gen fusión del virus Newcastle no virulento, genotipo 2.I con el programa ClustalX.

FIGURA 9. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas parciales del gen fusión del virus Newcastle no virulento, genotipo 2.II con el programa ClustalX.

FIGURA 10. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas parciales del gen fusión del virus Newcastle virulento, genotipo 2.VII con el programa ClustalX.

FIGURA 11. Árbol filogenético de Maximun Likelihood (ML), Maximun Parsimony (MP) y Neighbor Joining (NJ), mostrando las clases 1 y 2. Construido por comparación de las secuencias nucleotídicas parciales de los genes F de los Virus Newcastle, aislados en Perú.

FIGURA 12. Mapa de distribución genotípica del virus ENC en el Perú

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar a nivel molecular las cepas del virus de la Enfermedad de Newcastle (ENC) aislado de aves domésticas de diferentes regiones del Perú mediante la prueba de Transcripción Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) y secuenciación del gen de la proteína de fusión. Las muestras clínicas de aves de traspatio, riña y granjas avícolas comerciales procedentes de brotes de ENC ocurridos en el país, fueron recolectados entre los años 2009 al 2011. Las pruebas de RT-PCR detectaron la presencia del virus de la ENC en todas las muestras de aves, se determinó cepas ENC de alta patogenicidad en aves de traspatio y riña y de baja patogenicidad en aves de traspatio y granjas avícolas comerciales. Con el propósito de evaluar la virulencia de los aislamientos virales, se amplificó y secuenció la principal región funcional del gen de la proteína de fusión, para así realizar el análisis filogenético y determinar el patotipo. La secuenciación del gen de la proteína de fusión de los aislamientos virulentos, presentó la secuencia $_{113}RQKRF_{117}$ con aminoácidos básicos entre las posiciones 113 al 116 y una fenilalanina en la posición 117; lo cual es característico de los aislamientos virulentos velogénicos. Además, se agruparon en el genotipo VII y poseen mayor similitud con los virus Newcastle virulentos reportados en Perú y Malasia. La proteína fusión en las cepas de baja virulencia presentaron aminoácidos básicos en la posición 113 y 116 y una leucina en la posición 117, lo cual es característico de los virus ENC lentogénicos. Además se agruparon en los genotipos I y II, presentando ambos genotipos mayor similitud con los virus ENC de EEUU.

Palabras claves: Virus de la enfermedad de Newcastle, RT-PCR, paramyxovirus aviar, aves, análisis filogenético.

ABSTRACT

The aim of the present study was the molecular characterization of Newcastle disease virus (NDV) isolates from domestic poultry in different regions of Perú using reverse transcription chain reaction polymerase (RT-PCR) test and fusion protein sequencing. Clinical samples from fighting cock, backyard and commercial poultry were collected from outbreaks between 2009 to 2011 in Perú. The RT-PCR tests detected the Newcastle disease virus in whole clinical samples, the viruses were characterized as high pathogenic NDV strains in backyard and fighting cock; and low pathogenic NDV strains in backyard and commercial poultry. To assess the virulence of NDV isolated was amplified and sequenced the fusion protein cleavage site and was analyzed phylogenetically in order to determine the pathotype. The virulent viruses showed the sequence $_{113}\text{RQKRF}_{117}$ and phenylalanine at residue 117; which is characteristic of velogenic virulent strains, whereas low virulence strains showed basic amino acid at position 113-116 and leucine at residue 117; which is characteristic of lentogenic NDV strains. The virulent NDV strains belong to genotype VII and they are closely related with virulent NDV from Peru and Malaysia. The lentogenic NDV strains are grouped into genotypes I and II, both of them are very related with United States (U.S.) NDV strains.

Key words: Newcastle disease virus, RT-PCR, avian paramyxovirus, poultry, phylogenetic analysis.

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la enfermedad de Newcastle (ENC) es considerada una de las enfermedades más importantes en aves de corral y en otro tipo de aves; las tasas de mortalidad pueden alcanzar hasta 100 % con pérdidas económicas para la industria avícola, así mismo puede llevar a restricciones comerciales (Aldous y Alexander, 2001).

Debido al impacto económico de la ENC, la enfermedad debe ser notificado a la OIE- Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) debido a que está incluida en la lista única de enfermedades notificables de la OMSA-OIE (OIE 2009) y su control está legislado en muchas partes del mundo (Commission of the European Communities, 1992).

Existe una gran variabilidad genética entre cepas virales de la enfermedad de Newcastle (vENC). Además se ha descrito que las cepas virulentas tienen una evolución acelerada llegando a ser más patógenas, producen brotes en animales vacunados y se incrementa el rango de hospederos (Huang *et al*, 2003; Liu *et al*, 2008; Miller *et al*, 2009, 2010b; Wan *et al*; 2004).

Actualmente, Perú está reportando oficialmente a la Organización Mundial de Sanidad Animal-OIE, la ocurrencia de la Enfermedad de Newcastle en aves de traspatio y riña. Así, se han reportado 12 casos de ENC virulentos a la OIE durante el 2009 al 2011.

El propósito de este estudio fue caracterizar a nivel molecular los aislamientos del vENC de aves de diferentes departamentos del Perú de los brotes ocurridos entre el 2009 y el 2011 para determinar su patotipo mediante pruebas moleculares, secuenciación (composición aminoacídica de la proteína de fusión), análisis filogenético y pruebas biológicas.

Se utilizaron para el análisis molecular cepas de PMVA-1 almacenados en fluido alantoideo de un pool de hisopados y tejidos de aves en el Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal del SENASA- Lima. La caracterización genotípica de nuevos aislamientos y la identificación de cepas virales cercanos ayudarán a detectar y tomar medidas de control oportunas en caso de nuevos brotes (Susta *et al*, 2010).

Objetivos Específicos:

1. Detectar a nivel molecular el virus ENC mediante pruebas de RT-PCR en muestras de aves domésticas de diferentes regiones del Perú.
2. Caracterizar molecularmente y patotipificar los aislados virales de ENC mediante pruebas de RT-PCR, secuenciación, análisis filogenético y pruebas biológicas.
3. Realizar el análisis filogenético de los virus ENC aislados en base al gen de la proteína fusión.

II. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

El paramixovirus aviar (PMVA) forma parte del género *Avulavirus*, subfamilia *Paramyxovirinae*, familia *Paramyxoviridae*, orden *Mononegavirales* (Lamb *et al*, 2005). La subfamilia *Paramyxovirinae* está dividido en 5 géneros: *Respirovirus*, *Morbillivirus*, *Rubulavirus*, *Henipavirus* y *Avulavirus* (Lamb *et al*, 2007).

Los aislamientos de paramixovirus de especies aviares han sido clasificados por pruebas serológicas y análisis filogenético en 10 serotipos designados como PMVA-1 al PMVA-10 (Miller *et al*, 2010a), pero todos los aislados del virus de la enfermedad de Newcastle (vENC) pertenecen al serotipo 1 (PMVA-1) por tanto el vENC es sinónimo de PMVA-1.

CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

Los paramixovirus consisten de una molécula de cadena simple de ARN de aproximadamente 5×10^6 de peso molecular, lo que representa cerca del 0,5% del peso de la partícula viral (Alexander, 2003a).

El genoma vENC consiste de una molécula de RNA, de cadena simple, sentido negativo y de aproximadamente 15,2 kb de longitud (Alexander *et al*, 2008a), el cual codifica al menos seis proteínas (Alexander 2003a; Czeglédi *et al*, 2005): L, una ARN-polimerasa, HN, responsable de las actividades de la hemaglutinina y de la neuraminidasa y forma las proyecciones más largas (aproximadamente 8 η m) (Jordan 1990); F o proteína de fusión que forma las proyecciones más cortas en la superficie; NP o de nucleocapside; P o fosforilada, la cual está asociada a la nucleocápside; y M o de la matriz. El orden de los genes para estas proteínas en el genoma viral es 3'NP-P-M-F-HN-L5', al igual que en los otros paramixovirus aviares (Alexander 2003a).

La proteína hemaglutinina neuraminidasa (HN) es responsable de la unión de las partículas virales con los receptores de ácido siálico en la superficie celular y para activar la actividad de fusión de la proteína F durante la entrada del virus a la célula huésped. Además actúa como una neuraminidasa, removiendo ácido siálico de los viriones progenie para prevenir la autoagregación viral (Lamb *et al*, 2007).

Mientras que la virulencia del vENC depende de múltiples genes, el lugar de división de la proteína de fusión es crítico, responsable de los mayores cambios en la virulencia (de Leeuw *et al* 2005; Peeters *et al* 1999). El gen fusión se encuentra aproximadamente entre los nucleótidos 4500 y 6200 dentro del genoma del virus de la ENC.

Se ha demostrado que el gen P del vENC produce 3 proteínas con secuencias idénticas en el extremo N terminal, las proteínas P,V y W (Park *et al*, 2003). Poco se sabe sobre las funciones biológicas de las dos proteínas adicionales V y W (Huang *et al*, 2003). La proteína P es un componente esencial para la síntesis del ARN viral y que junto con la L forman un complejo de transcripción activo (Huang *et al*, 2003; Mebatsion *et al*, 2001).

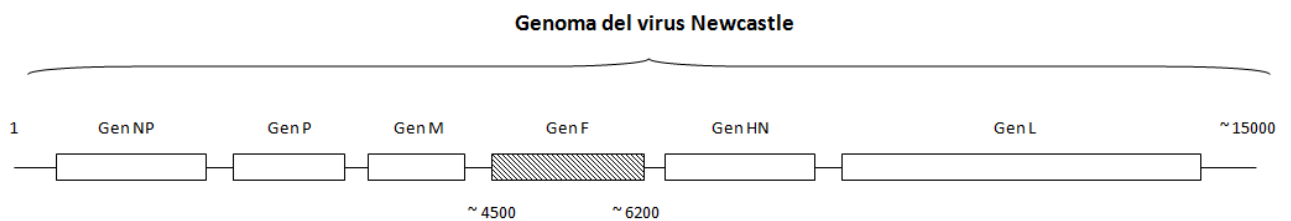


Figura 1. Ubicación del gen F del genoma del virus Newcastle, se encuentra aproximadamente entre los nucleótidos 4500 y 6200. Los productos de los genes son: NP, nucleoproteína; P, fosfoproteína; M, matrix; F, fusión; HN, hemaglutinina neuraminidasa; L, polimerasa.

Fuente: National Veterinary Services Laboratories-USDA

Morfología viral

Las partículas virales del virus de la Enfermedad de Newcastle (vENC) son bastante pleomórficas, generalmente redondeadas y miden entre 100 a 500 nm. de diámetro, aunque se pueden encontrar formas filamentosas de aproximadamente 100 nm. de longitudes variables (Jordan, 1990). La superficie de la partícula viral se encuentra cubierta con proyecciones de dos tamaños distintos. Al microscopio electrónico, se puede observar las nucleocápsides en forma de espina de pescado de aproximadamente 18 nm de ancho y un grado de inclinación de 5 nm (Jordan, 1990), las cuales muestran una simetría helicoidal, pudiendo ser conservadas libres o emergiendo de una partícula viral (Alexander, 2003a).

Replicación viral

La estrategia utilizada por el vENC para su replicación es la típica de los virus de sentido negativo (Alexander, 2003a). El paso inicial es la adhesión del virus a los receptores celulares, la cual está mediada por el polipéptido HN, luego se realiza la fusión de la membrana viral con la membrana celular por la acción de la proteína de fusión (proteína F), de esta manera, el complejo nucleocápside ingresa a la célula resultando en el efecto citopático característico de formación sincitial (Jordan, 1990).

La replicación intracelular se realiza por completo en el citoplasma. La ARN-polimerasa dirigida por el ARN viral produce transcriptasas complementarias de sentido positivo para que puedan actuar como ARN mensajeros y así poder utilizar el mecanismo celular, habilitando la traducción a proteínas y genomas virales. La proteína F es sintetizada como un precursor no funcional F0, que requiere ser cortada en F1 y F2 por medio de proteasas de la célula huésped. Además, la HN de algunas cepas del vENC pueden requerir división post-traducciona (Alexander, 2003a).

Las proteínas virales sintetizadas dentro de la célula infectada son transportadas a la membrana celular, alineadas en las cercanías de las regiones modificadas de la pared celular para finalmente las partículas virales ser eliminadas por gemación de la superficie celular (Alexander, 2003a); el envolvimiento del virus ocurre gracias a la membrana lipoproteica de la célula infectada (Jordan, 1990).

Susceptibilidad a Agentes Físicos y Químicos

La infectividad del vENC y otros paramixovirus puede ser destruido por tratamientos físicos y químicos tales como el calor, irradiación (incluyendo rayos y luz ultravioleta), procesos de oxidación, efectos de pH y varios compuestos químicos (Alexander, 2003a)

EPIDEMIOLOGÍA

Distribución

La enfermedad está extendida en Asia, África y América; solo países de Oceanía parecen estar relativamente libres de ella. En Europa en la década de los 80 ocurrieron brotes esporádicos, pero desde 1991 ha habido un incremento en la incidencia de la enfermedad con una serie de brotes afectando a aves de corral en Bélgica, Países Bajos, Luxemburgo, España, Francia, Malta y Alemania entre 1993 y 1994.

A través de la historia se han reconocido tres panzootias de la ENC, la primera, representada por el brote inicial de la enfermedad, ocurrió en el Sudeste de Asia y de ahí lentamente se diseminó a Europa en brotes aislados como el ocurrido en Inglaterra en 1926. Así, la enfermedad tardó 30 años en extenderse por todo el mundo (Alexander, 1997).

La segunda panzootia se inicia en Medio Oriente después de 1960, prolongándose hasta 1973. La rápida expansión se debió al explosivo desarrollo que experimentó la industria avícola y al aumento de la comercialización de aves, asociándose a la importación de aves de la orden psitaciformes, que constituye uno de los grupos de aves que se mantienen comúnmente como aves de compañía (Alexander, 1997; Gilardi *et al*, 1995)

Esto originó que se desarrollaran vacunas y regímenes de protección para las aves de corral, además de nuevas medidas de control para la importación de aves exóticas.

La tercera panzootia fue causada por palomas domésticas, generalmente ignoradas como una potencial fuente de vENC. La enfermedad, que es similar a la forma neurotrópica en pollos, pero sin signos respiratorios, aparentemente apareció en Medio Oriente posterior a 1970 y alrededor de 1981 alcanzó Europa extendiéndose rápidamente a todas partes del mundo, incluyendo Gran Bretaña, donde ocurrieron 20 brotes en pollos no vacunados, como resultado del consumo de alimentos contaminados por heces de palomas infectadas (Alexander, 1997).

La enfermedad de Newcastle Virulento se ha producido en al menos 6 de los 7 continentes en todo el mundo y es enzoótico en varios países representando una amenaza constante para las especies de aves de granja (Miller *et al*, 2010b). En el

2010, la infección por vENC fue confirmado en 80 países incluyendo infecciones en aves silvestres en Israel, Kenya, Mongolia, Alemania, Italia, Canadá y Estados Unidos (EEUU), así como infecciones en aves domésticas en países de Norte y Sudamérica, Europa, África y Asia (OIE OAH 2012).

La ENC fue diagnosticada por primera vez en California, Estados Unidos en 1950 en faisanes y otras aves importadas de Hong Kong. La enfermedad se diseminó a 5 criaderos comerciales de pollos, el brote se eliminó por destrucción de los pollos infectados. De 1971 a 1973 hubo un brote en granjas avícolas de California por importación de pericos de Sudamérica que se diseminó a criaderos comerciales del sur de California, de aquí se erradicó la enfermedad por sacrificio de las aves infectadas y cuarentena del lugar. En 1998 se volvió a introducir la enfermedad en una granja de aves de caza. Se sacrificaron todas las aves de la granja y se mantuvo la cuarentena en toda la granja (Animal Science, 2003)

Actualmente, los EEUU es considerado libre de cepas vENC virulentas por tanto es exótico o no existen en aves de granja en los EEUU (Wakamatsu *et al*, 2006); sin embargo han ocurrido introducciones ocasionales del virus probablemente a través de la importación ilegal de aves (Utterback and Schwartz 1973; Kinde *et al* 2005), resultando en pérdidas económicas significativas para la industria avícola. El último brote de la ENC en aves de granja en los EEUU, ocurrió en California durante el 2002 y 2003 probablemente como resultado de la importación ilegal de aves de pelea lo que resultó en una despoblación de más de 3 millones de aves y costos de contención de más de \$160 millones (Wakamatsu *et al* 2006).

En Argentina, el último foco de ENC fue producido por una cepa velogénica del virus, se registró en Octubre de 1987 en la Provincia de Entre Ríos. A partir de esa fecha se reportaron algunos episodios en los que se detectaron síntomas clínicos (respiratorios, digestivos o nerviosos) con muy baja o ninguna mortalidad, de los cuales se aislaron cepas lentogénicas vacunales. Estos casos se atribuyen a la combinación de factores ambientales, de manejo, de inmunosupresión o a la presencia de otros agentes como por ejemplo *Mycoplasma sp.*, capaces de complicar la acción de una cepa apatógena (Sanidad Animal, 2002). En 1997, la industria avícola de Argentina alcanzó la clasificación de libre de infecciones con el virus de la enfermedad de Newcastle. La vacunación y medidas de bioseguridad son activamente implementadas con la finalidad de mantener esta condición sanitaria privilegiada (Zanetti *et al* 2005).

En Chile, alrededor de 1972 se presentaron múltiples brotes causados por cepas velogénicas vicerotrópicas, observándose el último brote en 1977. Desde 1992 es reconocido libre de cepas mesogénicas y velogénicas. Sólo se encuentran en el país cepas lentogénicas usadas en vacunas (La Sota y B1), con la finalidad de mantener la inmunidad de masa (Hernández, 1996).

En Venezuela, recientemente un estudio de caracterización molecular y filogenia en aves demostraron que el virus ENC pertenece a la clase II, genotipo VII, representando el primer reporte de la presencia de este genotipo en Sudamérica (Perozo *et al*, 2012).

En el Perú, la enfermedad fue reportada por primera vez a mediados del siglo pasado (Philipps *et al*, 1951). A partir de 1994, se ha presentado brotes severos de ENC, hasta 1995, causados por cepas Velogénicas Vicerotrópicas en Lima y Arequipa, lo que sugirió que el virus se encontraba en reservorios no precisados, tales como aves de crianza casera y de riña. La diseminación del virus se debería a traslado por personas a los planteles comerciales (Chang *et al*, 1999; Carrión *et al*, 2000).

Actualmente, en el país se vienen presentando múltiples brotes de la enfermedad en aves de traspatio y riña desde el 2008 al 2011. El Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) ha reportado oficialmente a la OIE 14 notificaciones de la Enfermedad de Newcastle entre el 2008 y 2011 (OIE OAH 2012).

HOSPEDEROS NATURALES Y EXPERIMENTALES

Además de las especies aviares domésticas, se ha demostrado la infección natural y experimental de vENC en al menos 241 especies de 27 de las 50 órdenes de aves (Kaleta *et al*, 1988), que juegan un rol importante en la epidemiología de la enfermedad, sin embargo, el pollo sigue siendo el más susceptible y el huésped natural de mayor importancia de la enfermedad, pero los patos y gansos también pueden infectarse y presentar pocos o ningún signo clínico, incluso con cepas letales para los pollos (Alexander 2003a; Higgins, 1971)

La virulencia de las cepas del vENC varía considerablemente según el huésped y aparentemente es dependiente de los epítopes y el estatus enzimático del huésped (Gerlach, 1994). Las aves jóvenes son más susceptibles y desarrollan cuadros más drásticos, las pollitas de postura tienen mayores porcentajes de

mortalidad que los broilers, las más resistentes parecen ser las aves acuáticas y las más susceptibles aquellas criadas en confinamiento (Alexander 2003a; Alexander 1998).

ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

Definición

La enfermedad de Newcastle es causada por cepas virulentas de paramixovirus aviar serotipo 1 (PMVA-1). Los paramixovirus aislados de especies aviarias han sido clasificados por análisis serológico y filogenético en 10 subtipos denominados PMVA-1 hasta PMVA-10 (Miller *et al*, 2010a). Aunque todos los virus de ENC pertenecen a PMVA-1, los aislamientos difieren en virulencia en aves de corral, lo que se traduce en una amplia variedad de signos clínicos (Alexander, 2003a).

PATOGENICIDAD

Bases Moleculares

Se ha postulado que la secuencia de aminoácidos en el lugar de división de la proteína F es el mayor determinante de la virulencia (Peeters *et al*, 1999).

Durante la replicación del PMVA-1, la proteína de fusión es producida como una glicoproteína precursora F0, la cual tiene que dividirse en F1 y F2 para que las partículas virales progenie puedan ser infectivas. Esta división post-traducción es mediada por las proteasas de la célula huésped. Si la división fallara, se producirían partículas virales no infectivas (Alexander, 2003a). La tripsina puede dividir los F0 de todas las cepas del vENC, mientras que la molécula F0 de los virus virulentos puede ser dividida por proteasas del huésped o por proteasas encontradas en una amplia variedad de células y tejidos (Alexander 2003a, Brown y Alexander 2003). Adicionalmente, los vENC virulentos pueden ser diferenciados por su habilidad para replicarse mayormente en células de aves y mamíferos sin la adición de tripsina (Kaleta *et al*, 1980, King 1993, Nagai *et al*, 1976). Estos mecanismos determinan que los virus lentogénicos sólo se repliquen en células donde están presentes enzimas tipo tripsina como en el epitelio respiratorio y digestivo, mientras que los virus virulentos en células ubicadas en un amplio rango de tejidos y órganos, resultando en una infección sistémica mortal (Alexander, 2003a)

El estudio de la secuencia de aminoácidos del precursor F0, a partir de la secuenciación de nucleótidos del gen F de un número de cepas del vENC, permitieron la comparación de los virus lentogénicos con los mesogénicos o velogénicos. Para todos los virus el aminoácido en la posición 116, en el terminal C de la proteína F2 en el lugar de división, fue la arginina. Todos los virus de baja virulencia tenían leucina en la posición 117, en el amino terminal de la proteína F1 y otros aminoácidos básicos en el residuo 113. En contraste, todos los virus mesogénicos y velogénicos tenían fenilalanina en el residuo 117, con una excepción, aminoácidos básicos en los residuos 112 y 115 además de los del 113 y 116. La excepción fue el virus variante de palomas PMVP-1, que si bien es idéntico a los virus virulentos no posee un aminoácido básico en la posición 112. Estudios posteriores indicaron que esta variación es usual para el virus variante de paloma (PMVP-1) pero no tiene importancia en la variabilidad de la patogenicidad registrada en pollo (Alexander, 2003a). De este modo, parece ser que se requiere de al menos un par de aminoácidos básicos en los residuos 115 y 116 además de fenilalanina en el residuo 117 y un aminoácido básico (arginina) en el 113 para que el virus muestre patogenicidad en pollos (OIE, 2008)

CLASIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

Diferentes genotipos de PMVA-1 circulan en diferentes partes del mundo. Aunque todos los virus ENC pertenecen a PMVA-1 existe diversidad genética y antigénica (Aldous *et al*, 2003; Alexander *et al*, 1997; Kim *et al*, 2007a)

Actualmente se utiliza en todo el mundo dos sistemas diferentes para la clasificación del virus ENC y no hay un consenso sobre cuál de los dos es el más apropiado:

1. Un sistema sugerido por Aldous agrupa los virus ENC en 6 linajes y 13 sublinajes y luego 3 sublinajes más se incluyeron (Snoeck *et al*, 2009; Aldous *et al*, 2003).
2. Un segundo sistema clasifica al virus ENC en 2 grandes grupos: Clase I y Clase II, basado en el tamaño del genoma y secuencias de nucleótidos de su genoma (Miller *et al*, 2010b; Aldous *et al*, 2003; Miller *et al*, 2009).

Ambos sistemas de clasificación se basan en la información genómica similar por lo tanto las discrepancias entre los dos sistemas de clasificación son nominales (Miller *et al*, 2010b)

VIRUS ENC CLASE I

Los virus de la clase I tienen el genoma más largo de los PMVA-1 con 15,198 nucleótidos (Czegledi *et al*, 2006) y están divididos en 9 genotipos del 1 al 9, los cuales están distribuidos en todo el mundo en aves silvestres (Kim *et al*, 2007a) y han sido aislados principalmente de aves acuáticas y costeras, siendo la mayoría cepas avirulentas para los pollos (Kim *et al*, 2007b; Kim *et al*, 2008a).

VIRUS ENC CLASE II

Los virus de la clase II han sido divididos en 10 genotipos del I al IX y el XI (Miller *et al*, 2010b; Czegledi *et al*, 2006) los genotipos que se consideran "antiguos" (1930-1960) son del I al IV y el IX, tienen un genoma de 15,186 nucleótidos (Czegledi *et al*, 2006). Los virus que han surgido "recientemente" (después de 1960) son del V al VIII y el X y contienen 15,192 nucleótidos.

Todos los virus genotipo I, clase II son de baja virulencia, a excepción del vENC que produjo un brote ENC en Australia en 1998-2000 y algunos son utilizados como vacunas vivas.

Los virus genotipo II, Clase II son virus de baja virulencia y son utilizados como virus vacunales en todo el mundo, tales como cepas La sota, B1 y VG/GA, incluyendo la cepa virulenta chicken/U.S. (TX) GB71948 (TXGB) (Miller *et al*, 2010b).

Los genotipos V, VI, VII y VIII contienen solo virus virulentos y son los genotipos circulantes que predominan en todo el mundo (Miller *et al*, 2010b; Miller, 2009) siendo recuperados de aves de corral (gallinaceous birds), mascotas y aves silvestres (Kim *et al*, 2007a). Entre ellos, los virus del genotipo VII son particularmente importantes puesto que han sido asociados con muchos brotes recientes en Asia, África y Medio Oriente (Miller *et al*, 2010b; Wang *et al*, 2006; Miller *et al*, 2009; Yu *et al*, 2001; Liu *et al*, 2003).

Los virus genotipo VII inicialmente se dividieron en 2 sub-genotipos:

- a) Sub-genotipo VIIa, que representan virus que emergieron por 1990 en el lejano Oriente y se diseminó a Europa y Asia.
- b) Sub-genotipo VIIb, que representa virus que emergió en el lejano oriente y se diseminó a Sudáfrica (Aldous *et al*, 2003).

Los 2 sub-genotipos del genotipo VII se dividen en VIIc, d y e, los cuales representan aislamientos de China, Kazakhstan y Sudáfrica (Bogoyavlenski *et al*, 2009; Wang *et al*, 2006) y VIIf, g y h, los cuales representan aislamientos de África (Snoeck *et al*, 2009).

Las aves silvestres acuáticas son consideradas reservorios naturales del vENC de ambas clases, pero en su mayoría contienen cepas lentogénicas (Alexander, 2000; Kim *et al*, 2007a). Sin embargo tales cepas lentogénicas aparentemente tienen la capacidad de convertirse en velogénicas después de la transmisión y la circulación en poblaciones de pollos (Shengqing *et al*, 2002).

En los últimos años, existe un incremento en el descubrimiento de nuevos genotipos y algunos de los genotipos se han asociado con un incremento en la virulencia y en la cantidad de hospedadores (Liu *et al*, 2008, Wan *et al*, 2004, Zou *et al*, 2005).

CLASIFICACIÓN DE LA PATOGENICIDAD

Una de las propiedades más características de las diferentes cepas del vENC es su enorme variación respecto a la patogenicidad (OIE 2008).

La severidad de los signos clínicos no varía únicamente por la virulencia inherente del virus, sino también por algunos factores relacionados con el huésped. Estos factores son principalmente la edad, la vía de infección, el estado inmunológico (Abdul 1983, Alexander 1995, Alexander 2003b, Alexander y Senne 2008a, Kotani *et al*, 1987), cepa viral, especie de ave, coinfección con otros organismos, estrés ambiental o social, vía de exposición y dosis viral (Alexander 2003a; King 1999, Carter *et al*, 2005; Jordan, 1990).

Basado en la severidad de la enfermedad clínica, las cepas de ENC fueron originalmente clasificadas en 4 patotipos, conocidos como Doyle, Beach, Beaudette y Hitchner (Alexander *et al*, 1998). En la actualidad, se agrupan en 5 patotipos de acuerdo a los signos clínicos observados (OIE 2008)

Los 5 patotipos son:

1) VELOGÉNICO VISCEROTRÓPICO (VVENC, antes Doyle)

La forma velogénica viscerotrópica produce depresión, inapetencia, diarreas e incremento en la frecuencia respiratoria; todo esto seguido de un cuadro respiratorio severo manifestado por boqueo y tos (Carter *et al*, 2005; OIE, 2006); finalizando con postración y muerte.

Este tipo de virus puede ocasionar edema alrededor de los ojos, cabeza y barbillas (Alexander, 1998). Frecuentemente se observa diarrea verdosa en aves que no mueren en la infección temprana y antes de la muerte se pueden observar temores musculares, tortícolis, parálisis de las piernas, alas y opistótonos. En aves sin protección y totalmente susceptibles, la mortalidad alcanza el 100% (Alexander, 2003a).

2) VELOGÉNICO NEUROTRÓPICO (VNENC, antes Beach)

La morbilidad con VNENC alcanza el 100% y la mortalidad es usualmente 50% (pero puede alcanzar hasta 100% en pollos jóvenes). Se caracteriza por la aparición repentina de una enfermedad respiratoria pero el signo clínico más evidente es a nivel neurológico 1 o 2 días después y consiste en la contracción de la cabeza, temores, opistótonos (Alexander, 2003b; Brown *et al*, 1999; Terregino 2009), parálisis de patas y alas, torcimiento de la cabeza y cuello, andar en círculos, temblores y caminar hacia atrás (Carter *et al*, 2005; OIE 2006). La producción de huevos cae dramáticamente, pero la diarrea suele estar ausente. El curso de la enfermedad es más larga que VVENC y los signos neurológicos se observan claramente entre los días 5 y 10 post inoculación, que es mucho más que el tiempo de supervivencia que la mayoría de cepas, donde los animales suelen morir a los 4 o 5 días postinoculación.

3) MESOGÉNICO (antes Beaudette)

Los virus mesogénicos usualmente producen enfermedad respiratoria en infecciones de campo. También ha sido asociado la caída en la producción de huevos que puede durar por varias semanas y presencia de huevos deformes en brotes en campo. Puede producir signos nerviosos pero no es común. La mortalidad en aves es generalmente baja, excepto en aves muy jóvenes y susceptibles (Alexander 2003b). Las cepas mesogénicas o de virulencia media son la Roakin, Komarov, Meekteswar y H, que además han sido usadas ocasionalmente como cepas vacunales.

4) LENTOGÉNICO O RESPIRATORIO (antes Hitchner)

Los virus lentogénicos usualmente no causan enfermedad en aves adultas. Sin embargo las malas prácticas de manejo en aves jóvenes pueden ocasionar problemas respiratorios serios con mortalidad por las complicaciones bacterianas después de la vacunación con la cepa más patogénica La sota (Jordan, 1990). El grupo de las cepas lentogénicas (casi avirulentas), está integrado por las cepas Hitchner BI, Clona 30, La sota y F, que han sido ampliamente usadas como cepas vacunales. Además, las cepas ULSTER 2C, MCHIO y V4 aisladas recientemente, son estables al calor, se replican en la mucosa intestinal y se consideran cepas asintomáticas (Alexander 1991, Alexander 1989a) está asociado a una enfermedad subclínica marcada por una enfermedad respiratoria leve

5) ENTÉRICO ASINTOMÁTICO: Usualmente consiste de una infección entérica subclínica.

DETERMINACION DE LA VIRULENCIA DE vENC:

La Virulencia del PMVA-1 puede ser determinado en el laboratorio por pruebas *in vivo* por inoculación experimental en pollitos SPF de un día de edad (Índice de patogenicidad intracraneal (IPIC), índice de patogenicidad intravenosa (IPIV) en pollos de seis semanas de edad o puede predecirse molecularmente por el análisis de la secuencia de múltiples aminoácidos básicos en el lugar de división de la glicoproteína fusión (protein F) (Alexander, 2009).

Históricamente, las cepas vENC han sido clasificadas de acuerdo al tiempo medio de muerte (TMM) después de la inoculación en huevos embrionados, las cepas que producen muerte más rápido (y por lo tanto más virulentas) son llamadas “velogénicas” y cuando los embriones sobreviven por mucho más tiempo son llamados “lentogénicos”. Las cepas que se encuentran entre ambos son llamadas “mesogénicas” (Alexander, 2003a; OIE, 2008).

Aunque en la mayoría de casos el TMM y el IPIV pueden dar una indicación útil de la virulencia, son considerados imprecisos, particularmente cuando se evalúa cepas de otros hospederos diferentes a los pollos (Alexander *et al*, 1988; Pearson *et al*, 1987; Alexander *et al*, 2003). Por lo tanto, estos ensayos no son considerados lo suficientemente confiables para la caracterización de cepas de vENC en caso de sospecha de brotes (Alexander 2009; Terregino y Capua, 2009).

Actualmente, la clasificación de las diferentes cepas se realiza por 2 métodos reconocidos internacionalmente de la OIE para la patotipificación del PMVA-1 son:

a) **ÍNDICE DE PATOGENICIDAD INTRACRANEAL (IPIC):**

El virus debe tener un IPIC en polluelos de un día (*Gallus gallus*) de 0,7 o superior (OIE, 2008).

El IPIC es considerado la prueba “*in vivo*” más sensible (Terregino y Capua, 2009) y un valor de 0,7 o mayor clasifica la cepa como virulenta (mesogénica o velogénica) por tanto confirma un diagnóstico de ENC en hospederos infectados (OIE, 2008) y debe ser “notificado” a la comunidad internacional a través de la Organización Mundial de Sanidad Animal y cualquier cepa con un IPIC mayor a 1,5 es considerado velogénico (Alexander 1998; OIE, 2008).
y/o

b) **SECUENCIA DEL LUGAR DE DIVISION DE LA PROTEINA F:** Se debe demostrar en el virus la presencia de múltiples aminoácidos básicos (directamente o por deducción) en el extremo C-terminal de la proteína F2 y un residuo de fenilalanina en la posición 117, la cual está en el extremo N-terminal de la proteína F1; por ello se consideran como indicativo de virulencia y por lo tanto “notificable” (Glickman *et al*, 1988; Nagai *et al*, 1976; OIE, 2008)

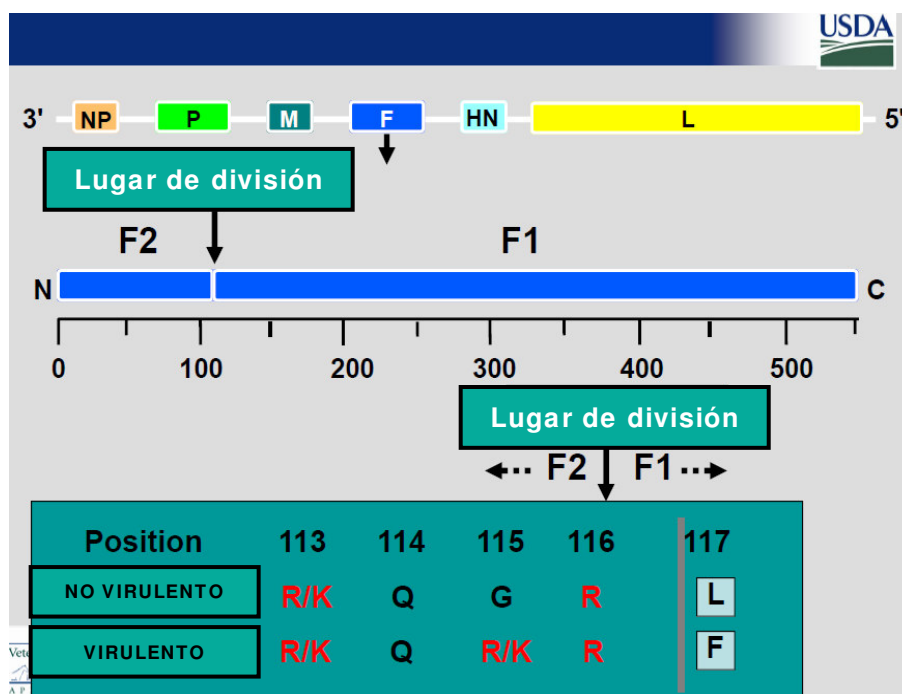
El término “múltiples aminoácidos básicos” se refiere a que existen al menos tres residuos de arginina (R) o lisina (K) entre las posiciones 113 y 116.

La incapacidad de demostrar la presencia de los múltiples aminoácidos básicos requeriría la caracterización del virus aislado mediante la prueba IPIC (OIE, 2008).

La secuencia de aminoácidos en el lugar de división de la proteína fusión (F) es diferente entre cepas. Las cepas de ENC de baja virulencia tienen aminoácidos básicos en el lugar de división de la proteína F en las posiciones de aminoácidos 112-113 y 115-116 y una leucina (L) en la posición 117 (Glickman *et al*; 1988) y solo puede ser dividido por una enzima como la tripsina que se encuentra en el tracto respiratorio e intestinal, lo que restringe su replicación en estos sistemas (Rott, 1979). Por el contrario, los virus virulentos tienen múltiples aminoácidos básicos en el lugar de división de la proteína fusión: 112R-K/R-Q-K/R-R-F117 (Cuadro 1).

Usando técnicas genéticas reversas por tanto se ha demostrado que la fenilalanina en la posición 117 y aminoácidos básicos alrededor de Q114 son necesarios para la virulencia (de Leeuw et al 2003; Glickman et al 1988).

Tan solo el cambio de dos nucleótidos puede producir la aparición de una forma virulenta de la ENC a partir de un virus de baja virulencia; sin embargo, solo existen algunos casos documentados de esta ocurrencia (Alexander *et al*, 1991; Gould *et al*, 2001)



Fuente: National Veterinary Services Laboratories-USDA

Figura 2. Lugar de división de la proteína de fusión y secuencia de aminoácidos básicos de vENC virulentos y no virulentos.

PARAMIXOVIRUS AVIAR TIPO 1 DE PALOMA (PPMV-1)

Las aves del orden *Columbiformes*, el cual incluye palomas y tórtolas, pueden infectarse con vENC (Erickson *et al* 1980, Wakamatsu *et al* 2006), debido a virus específicos de paloma conocidos como paramyxovirus aviar tipo 1 de paloma (PMVP-1) para distinguirlo del resto de virus de PMVA-1. La variante de paloma (PPMV-1) ha demostrado estar muy estrechamente relacionada con el vENC pero difiere serológicamente, bioquímicamente y patológicamente (Gerlach, 1994). Esta cepa ha sido asignada al subgenotipo VIb y es responsable de la mayoría de los brotes en palomas y tórtolas alrededor del mundo desde la década de los 80s (Liu y Cao, 2005).

El primer brote de PMVP-1 fue reportado en el medio oriente durante la década de 1970, luego se diseminó a Europa durante los 80's (Lister *et al* 1986) y en la actualidad es considerado endémico en todo el mundo (Vindevogel 1988). En el Reino Unido, las palomas transmitieron el PPMV-1 a las granjas avícolas a través de la contaminación fecal del alimento. La ingestión del virus en las heces es la ruta más probable de infección en palomas (Barton *et al*, 1992).

Las columbiformes afectadas presentan signos clínicos las cuales incluyen polidipsia, poliúrea, anorexia, diarrea y vómitos. Estos signos agudos frecuentemente no reconocidos son seguidos por parálisis tónica clónica de las alas (más raramente de los miembros), temores de la cabeza y tortícolis. En contraste con la ENC, puede ocurrir paresia flácida y parálisis, probablemente como consecuencia de una neuropatía periférica. Otras lesiones menos frecuentes son blefaroedema unilateral, deformación de los huevos, mortalidad embrionaria y muda distrófica. No ocurre disnea, lo cual es común en ENC. La mortalidad es mayor en pichones. Aves mayores afectadas pueden recuperarse espontáneamente dentro de las tres a cuatro semanas al inicio de los signos clínicos (Gerlach, 1994).

DIAGNÓSTICO DE LA ENC

Identificación del agente

- **Aislamiento Viral**

Los vENC virulentos pueden ser propagados en muchos sistemas de cultivo celular y los de baja virulencia pueden ser inducidos a replicarse en algunas de ellas. Es posible utilizar cultivos primarios de células o incluso líneas celulares para el aislamiento de rutina de ENC. Sin embargo, los huevos embrionados de pollo representan un vehículo extremadamente sensible y conveniente para la propagación del vENC y es utilizada para el diagnóstico casi universalmente (Alexander 2003a).

- **Anticuerpos monoclonales**

Uno de los principales retos para mejorar el diagnóstico y diferenciación de virus ENC fue el uso de anticuerpos monoclonales (mAbs) para ayudar a la identificación y la epidemiología del virus. Usando técnicas serológicas convencionales, las cepas de ENC se consideraron que formaban un grupo antigénicamente homogéneo (Alexander 2003a).

Sin embargo, técnicas serológicas más exactas, recientemente desarrolladas y sobretodo el uso de anticuerpos monoclonales, han demostrado que existen variaciones antigénicas considerables entre diferentes cepas del vENC. Esta diferenciación ha sido de mucha ayuda en el entendimiento de la epidemiología de la ENC (Jordan 1990).

De los 10 serotipos, 06 de ellos fueron clasificados en la última década de los 70's, cuando la prueba más confiable para clasificar a los paramixovirus fue la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI). Sin embargo existen muchos problemas asociados con la serología, incluyendo la incapacidad de clasificar algunos PMVA al compararlos con los sueros de los 9 PMVA ya establecidos (Alexander 1980, Alexander *et al*, 1989b).

- **Técnicas Moleculares**

Se ha incrementado el uso de técnicas moleculares para detectar el vENC en muestras clínicas, para demostrar la presencia del virus e incluso su virulencia en forma muy rápida (Creelan *et al*, 2002; Nanthakumar *et al*, 2000). Desde 1991 se

registra el primer intento documentado para detectar PMVA-1 por transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en fluido alantoideo de huevos embrionados (Jestin *et al*, 1991).

Desde entonces se ha desarrollado y publicado una variedad de protocolos de laboratorio desde RT-PCR basado en gel hasta el PCR en tiempo real, procedimientos basados en enzimas de restricción y secuenciamientos rápidos (Cattoli *et al*, 2011).

PCR convencional

Inicialmente la prueba de RT-PCR para la detección de PMVA-1 fue utilizado para confirmar la presencia del virus en fluidos alantoideos de huevos embrionados de pollos siguiendo los procedimientos estandarizados. Por lo general, se han utilizado sistemas basados en RT-PCR para amplificar una parte específica del genoma por la amplificación de una parte del gen F que contiene el lugar de división F0 de modo que pueda ser utilizado para evaluar la virulencia (Creelan *et al*, 2002). Los principales inconvenientes de estos primeros procedimientos eran la baja sensibilidad y / o incapacidad para detectar todas las cepas. También se desarrolló el PCR anidado y mostró buena resolución, pero con esta técnica es propenso la contaminación de las muestras y la producción de falsos-positivos, por lo que no es ideal para laboratorios de diagnóstico donde analizan una alta cantidad de muestras (Kant *et al*, 1997).

Análisis con enzimas de Restricción

Un estudio el 2000 (Nanthakumar *et al*, 2000) reportó por primera vez la aplicación de una prueba RT-PCR en 2 pasos, seguida de análisis con enzimas de restricción directamente de muestras clínicas. El procedimiento tuvo una alta especificidad, y posteriores modificaciones permitieron la discriminación entre cepas lentogénicas, mesogénicas y velogénicas (Creelan *et al*, 2002; Nanthakumar *et al*, 2000).

Además, la prueba podía identificar infecciones duales (lentogénico y meso-y/o cepas velogénicas en la misma muestra) (Creelan *et al*, 2002). La alineación de más de 300 secuencias del gen F de PMVA-1, disponibles en Genbank y posterior determinación de la presencia del lugar de restricción

Bgl I demostró que pudo identificar correctamente la gran mayoría de virus circulantes secuenciados hasta la fecha (Cattoli y DeBattisti, personal communication).

PCR en tiempo real

La llegada del PCR tiempo-real usando sondas de hidrólisis fluorogénicos (Taqman) proporcionó procedimientos de análisis altamente sensibles y rápidos. El método Taqman representa una nueva tecnología que explota la actividad nucleasa 5'-3' de la *Taq* DNA polimerasa (Holland *et al*, 1991; Bassler *et al*, 1995; Heid *et al*, 1996; Batt, 1997; Ibrahim *et al*, 1998). La amplificación por PCR se logra con el uso de cebadores y una señal que se genera solo por la hibridización de la sonda fluorogénica interna acumulando el producto y posteriormente dividida por la *Taq* DNA polimerasa (Aldous *et al*, 2001).

Teniendo en cuenta que las variantes de los virus pueden emerger y circular en cualquier momento, pruebas moleculares basados en el gen F hipervariable puede no ser considerado completamente confiable para la detección, aunque si indispensable para la patotipificación. Otros genes supuestamente más conservados han sido considerados para el desarrollo de métodos de detección molecular de PMVA-1 (Cattoli *et al*, 2011).

Se encontró que el gen M tiene varias regiones conservadas, particularmente cerca del extremo 5' (Seal *et al*, 2000). Estas regiones fueron consideradas para el desarrollo de una prueba RT-PCR tiempo real Taqman de un solo paso para detectar la presencia de una amplia variedad de genomas PMVA-1 en muestras clínicas de aves comerciales (Wise *et al*, 2004).

Todos estos protocolos fueron sometidos a una validación exhaustiva y fueron aprobados por el USDA. Los protocolos fueron aplicados y evaluados en campo en los laboratorios de USDA-APHIS analizando aproximadamente 35,000 especímenes entre el 2004-2007 (Senne, comunicación personal, citado en Kim *et al*, 2008a). El método basado en el gen M conservado, es el más confiable y sensible; y es utilizado como prueba primaria o tamiz y la prueba del gen F se utiliza para la confirmación de virus virulentos y no-virulentos (Kim *et al*, 2006).

- **Índices de Patogenicidad**

La extrema variación en la virulencia de los diferentes aislamientos del vENC y el uso generalizado de vacunas vivas implica que la identificación de un aislamiento como PMVA-1 a partir de aves que muestren signos clínicos no confirma un diagnóstico de ENC, por lo que también se requiere una valoración de la virulencia del aislamiento. En el pasado han sido utilizados pruebas como el tiempo medio de muerte (TMM) en huevos embrionados, la prueba de patogenicidad intravenosa y las variaciones de estas pruebas (Alexander and Senne, 2008b), pero por acuerdo Internacional, se utiliza la prueba de Índice de Patogenicidad Intracerebral (IPIC) para la valoración de la virulencia del virus.

Aunque los índices de patogenicidad estándares pueden a menudo ofrecer una buena idea de la virulencia, no siempre se correlacionan exactamente con lo observado en experimentos animales (Susta *et al*, 2010; Wakamatsu *et al*, 2006). En otras palabras TMM y IPIC no siempre se correlacionan con los síntomas clínico-patológico, ni con la habilidad de cada cepa de “inducir enfermedad” (OIE, 2008).

La definición actual de la OIE también reconoce los avances en la comprensión de las bases moleculares de la patogenicidad y permite una confirmación de la virulencia, pero no la ausencia de la virulencia, mediante pruebas *in vitro* para determinar la secuencia de aminoácidos en el punto de división de la proteína F0 (OIE, 2008)

- **Estudios Filogenéticos**

En los últimos años el desarrollo de técnicas mejoradas para la secuenciación de nucleótidos, la disponibilidad de datos de la secuencia de más PMVA-1 en bases de datos informatizadas y la demostración de que incluso longitudes de secuencia relativamente cortas pueden dar resultados significativos en análisis filogenéticos, han conducido a un incremento considerable en tales estudios. Se ha detectado una diversidad genética, pero los virus que comparten parámetros temporales, geográficos, antigénicos o epidemiológicos tienden a encuadrarlos en linajes o grupos taxonómicos específicos, y se ha comprobado que esto es importante para valorar tanto la epidemiología global como la propagación local

de la ENC (Aldous *et al*, 2003; Cattoli *et al*, 2010; Czegledi *et al*, 2006; Kim *et al*, 2007a).

Aunque en el pasado los estudios filogenéticos han sido impracticables como herramienta rutinaria, en la actualidad la mayor disponibilidad y el incremento en la velocidad de obtención de resultados empleando kits sofisticados y disponibles comercialmente para la RT-PCR y secuenciadores automáticos permite que tales estudios se encuentren dentro de los equipamientos de muchos más laboratorios de diagnóstico y que puedan proporcionar resultados significativos que sean contemporáneos en lugar de retrospectivos (Miller *et al*, 2010b). La genotipificación de los aislamientos del vENC deberían formar parte de la caracterización diagnóstica del virus para los laboratorios de referencia mediante la producción de la secuencia de 375 nucleótidos del gen F, que incluye el punto de división del F0, de forma rutinaria para todos los virus y la comparación de las secuencias obtenidas con otros aislamientos y 18 virus representativos de los linajes y sublinajes reconocidos. Ese análisis permitiría una rápida valoración epidemiológica de los orígenes y la propagación de los virus responsables de los brotes de la ENC (Aldous *et al*, 2003).

Detección de Anticuerpos

Pruebas serológicas

El vENC puede emplearse como un antígeno en una amplia variedad de pruebas serológicas, permitiendo el uso de técnicas de neutralización o enzimoimmunoensayo (ELISA) e Inhibición de la Hemaglutinación (HI), para ser utilizados en la evaluación de los niveles de anticuerpos en las aves. En la actualidad, la prueba HI es la más ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos contra el PMVA-1 en las aves, mientras que el uso de kits comerciales ELISA es común para evaluar los niveles de anticuerpos después de la vacunación (OIE, 2008). En general, la neutralización del virus o los títulos de HI y ELISA correlacionan el nivel de la granja en vez del nivel individual de las aves. En los laboratorios de diagnóstico se utilizan pruebas serológicas para evaluar la respuesta de anticuerpos después de la vacunación, pero tienen un valor limitado en el diagnóstico y vigilancia de la enfermedad de Newcastle, debido al uso de vacunas,, casi universalmente , en las aves domésticas (Miller *et al*, 2010b).

Diagnóstico Diferencial

Clínicamente la ENC debe diferenciarse de otras enfermedades respiratorias de las aves tales como Bronquitis Infecciosa, Laringotraqueítis, Micoplasmosis, Coriza e Influenza aviar y de otras encefalopatías de las aves (Encefalomiелitis aviar y deficiencia de vitamina E).

Además, de toxemias como Botulismo. La combinación específica de signos respiratorios y nerviosos sugiere la Enfermedad de Newcastle, pero signos similares pueden presentarse en infecciones mixtas. (Hanson, 1975; Alexander *et al*, 1997).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRAS BIOLÓGICAS. Las muestras fueron recolectadas durante los brotes del vENC que afectaron a aves de pelea, traspatio y granjas comerciales, procedentes de los departamentos de Ayacucho, Ancash, Cajamarca, Tacna, La Libertad, Ucayali, Tumbes, Piura y Arequipa, durante el 2009 al 2011 (Cuadro 1).

Las muestras se procesaron en el Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal del SENASA-PERU, para el diagnóstico del vENC se realizó pruebas de PCR convencional, análisis con enzimas de restricción, PCR en tiempo real y aislamiento viral.

Cuadro 1. Tipo de muestra y procedencia de las aves con diagnóstico de vENC

Código Muestra	Tipo de muestras clínicas	Año de Aislamiento	Procedencia	Tipo de Ave
R1601	Órganos	2009	Tacna	Pelea
R1602	Órganos	2009	Ayacucho	Pelea
R1603	Órganos	2009	Ancash	Pelea
R1604	Órganos	2010	Cajamarca	Traspatio
R1605	Órganos	2010	Cajamarca	Pelea
R1606	Órganos	2010	La Libertad	Pelea
R1608	Hisopado traqueal	2010	Ucayali	Traspatio
R1609	Hisopado traqueal	2010	Ucayali	Traspatio
R1610	Hisopado traqueal	2010	Ucayali	Traspatio
R1611	Hisopado traqueal	2010	Ucayali	Traspatio
R1613	Hisopado traqueal	2011	Piura	Traspatio
R1615	Órganos	2011	Arequipa	Comerciales
R1619	Órganos	2011	Arequipa	Comerciales

Aislamiento Viral. Para la recuperación viral se trituraron 10 g de muestra de órganos en buffer y se utilizó 200 µL de hisopado traqueal.

Los hisopados (n=5) se centrifugaron a 1000 g (2500 rpm) por 10 min y el sobrenadante se separa a otro tubo, se agregó amoxicilina 100 mg/kg-peso-huevo a inocular (25 mg/ml inóculo). Se dejó en reposo por 60 min a 4 °C y se inoculó 0,2 ml del sobrenadante en 5 huevos embrionados libre de patógenos específicos (SPF) de 9 o 10 días de edad. Los huevos fueron colocados en una incubadora a 37 °C durante 7 días y observados diariamente, descartándose los huevos muertos en las primeras 24 horas. Los embriones que fueron muriendo se mantuvieron en refrigeración. A los 7 días postinoculación los sobrevivientes fueron examinados con el fin de determinar presencia viral, evaluando la actividad hemoaglutinante de los fluidos con una solución de glóbulos rojos al 0,75%.

La actividad hemoaglutinante del fluido puede deberse a uno de los 10 serotipos de PMVA-1 ó 16 subtipos de virus de Influenza aviar. Por ello, si el fluido produjo hemoaglutinación de los glóbulos rojos se confirmó con la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI) con un antisuero monoespecífico del virus de ENC.

Todas las muestras de órganos (n=8) se trabajaron en grupo (pool) por ave y fueron congeladas y descongeladas, cortadas en pedazos y trituradas en un mortero estéril, con el pool de órganos se preparó una suspensión al 20% en PBS estéril. Las suspensiones fueron procesadas de la misma manera que los hisopados.

Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó a partir de muestras de tejidos, hisopados y fluidos alantoideos. Se utilizó para las muestras de tejido el Kit comercial de extracción de ARN (RNeasy extraction Kit, QIAGEN, Alemania). Se utilizó 20 mg de muestras sólidas (órganos), se homogenizó la muestra con 200 µL de buffer RLT, luego se agregó etanol al 70%, todo el volumen se colocó en una columna spin RNeasy, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 s, se eliminó el contenido del tubo y la columna fue transferida a un tubo nuevo. Luego, se agregó el buffer RW1, se centrifugó a 10000 rpm por 15 s y la columna se transfirió a un tubo nuevo de colección. Después, se agregó buffer RPE, se centrifugó a 10000 rpm por 15 s, se

repitió este último paso 2 veces y finalmente, se eluyó el ARN con 50 µL de agua PCR libre de RNasa. El ARN se conservó a -20 °C hasta su uso (ver Anexo1)

La extracción de ARN de muestras líquidas a partir de hisopados y fluidos alantoideos se realizó usando el Kit comercial de extracción de ARN (QIAamp viral RNA mini kit, QUIAGEN, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, descrito en el Anexo 2. El ARN se conservó a -20 °C hasta su uso.

Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

PCR Convencional

Se realizó una transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa de un solo paso con un par de cebadores del gen de proteína de fusión específicos para identificar el virus de Newcastle, según lo descrito por Creelan *et al.* (2002):

NDV F (4829): 5'- GGT-GAG-TCT-ATC-CGG-ARG-ATA-CAA-G -3' (4893)

NDV R (5031): 5'- TCA-TTG-GTT-GCR-GCA-ATG-CTC-T -3' (5008)

El volumen final de la reacción fue de 50 µL, conteniendo la mezcla 2X de reacción (dNTP 0,4 mM de cada uno; MgSO₄ 2,4 mM), inhibidor de la RNasa 0.2 µL (40U/µL); cebadores 10 µM de cada uno, mezcla RT platinum *Taq* 1 µL (Invitrogen, USA), agua libre de nucleasas y ARN 5 µL.

La amplificación del ADN se realizó en el termociclador BARNSTEAD, modelo DB80230-33. Las condiciones de ciclaje de la reacción fueron:

- a) Transcripción reversa a 45 °C por 30 min
 - b) Activación *Taq* polimerasa a 94 °C por 2 min
35 ciclos de:
 - c) Desnaturalización a 94 °C por 30 s
 - d) Hibridización a 55 °C por 1 min
 - e) Extensión a 68 °C por 1 min
- Ciclo final de extensión de 68 °C por 7 min

Se utilizó controles de ADN positivos y negativos a virus ENC. Después del ciclaje los productos de PCR fueron detectados por electroforesis en un gel de

agarosa al 2% y coloreados con bromuro de etidio. El tamaño del producto de PCR fue evaluado usando un marcador de peso molecular de 50 pb (QIAGEN). El gel fue fotografiado sobre un transiluminador UV para confirmar la amplificación del gen fusión del virus.

La visualización de la presencia de un fragmento de ADN de 202 pb en una muestra se consideró positiva al vENC. La ausencia, se consideró como negativa. Cada prueba de RT-PCR fue procesada con controles positivos (aislamiento del virus ENC lentogénico y velogénico analizado y tipificado por Laboratorio de Referencia OIE para la Enfermedad de Newcastle, Iowa, USA), un control negativo y un control de la mezcla de reacción (agua libre de DNAsas y RNAsas).

Análisis con Enzimas de Restricción

Después de la amplificación, se utilizó una alícuota de 7 μ L para analizarlo por electroforesis en gel de agarosa al 1,7%. Los productos de PCR fueron purificados usando el kit QIAquick (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La digestión con endonucleasas se realizó a la concentración final de 10U. La mezcla de reacción contenía lo siguiente: *Bgl* I 0,3 μ L, buffer *Bgl* I 2 μ L, H₂O PCR 7,7 μ L y producto de PCR 10 μ L. La digestión fue llevada a cabo a 37 °C por 4 h y los productos de RT-PCR digeridos se corrieron por electroforesis en gel de agarosa al 2%, coloreados con Bromuro de etidio. El tamaño del producto de PCR fue evaluado usando un marcador de peso molecular de 50 pb (QIAGEN). El gel fue fotografiado sobre un transiluminador UV para confirmar la presencia del sitio de restricción en la región de división FO después de la digestión con la enzima *Bgl* I.

Las cepas lentogénicas de PMVA-1 contienen un sitio de restricción *Bgl* I en la región de división FO. Este sitio *Bgl* I está ausente en las cepas velogénicas y mesogénicas.

La presencia de un fragmento de ADN de 202 pb se consideró como positiva al vENC “virulento” (meso/velogénico) y la presencia de 2 fragmentos de ADN de 135 y 67 pb se consideró como vENC “no virulento” o de “baja virulencia”. Cada prueba fue procesada con un control positivo vENC “no virulento” y “virulento” (aislamiento del virus ENC lentogénico y velogénico analizado y tipificado por Laboratorio de Referencia OIE para la Enfermedad de Newcastle, Iowa, USA).

PCR en tiempo real

Se realizó la prueba de PCR en tiempo real de acuerdo al protocolo del Laboratorio de Referencia para Newcastle- OIE (SOP-AV-1505.03), National Veterinary Services Laboratories, DVL-NVSL, USA. La prueba de PCR consta de 2 etapas:

- 1) PCR prueba matriz, detecta ARN del virus Paramixovirus aviar -1 (PMVA-1) virulento y no-virulento, tiene una sensibilidad de 96,7% y se utiliza como una prueba de selección.
- 2) PCR prueba Fusión, detecta la mayoría de cepas ENC virulentas (mesogénicas y velogénicas). Tiene una sensibilidad de 91,2%. Se utiliza para confirmar resultados de muestras positivas a PMVA-1 matriz.

Cebadores y Sondas

Para los ensayos se utilizaron los cebadores y sondas descritos en el protocolo SOP-AV-1505.03 - Laboratorio Referencia de Newcastle- DVL-NVSL, USA (Cuadro 2).

Cuadro 2. Secuencia de cebadores y sondas de RT-PCR tiempo real para vENC

Especificidad gen y tamaño del amplicón	Cebadores y sondas	Secuencia (5'-3')	Posición en el genoma
PMVA-1 Gen matriz 121 pb	M+ 4100 (cebador forward)	AGTGATGTGCTCGGACCTTC	4100-4119
	M+ 4169 (sonda matriz)	(FAM) TTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGC(BHQ)	4169-4192
	M-4220 (cebador reverso)	CCTGAGGAGAGGCATTTGCTA	4200-4220
vENC meso y velogénico - gen fusión 110 pb	F+ 4829 (cebador forward)	GGTGAGTCTATCCGGARGATAACAAG	4829-4853
	F+4894 Sonda fusión (virulento)	(FAM) AAGCGTTTCTGTCTCCTTCCTCCA(BHQ)	4894-4917
	F-4939 cebador reverso	AGCTGTTGCAACCCCAAG	4922-4939

FAM: 6' Carboxifluoreseina , BHQ: Black hole quencher

Los componentes y condiciones de ciclaje para la RT-PCR en tiempo real del gen matriz y fusión del vENC se muestran en los Cuadros 3a, 3b y 4.

Cuadro 3a. Componentes RT-PCR tiempo real PMVA-1 (gen matriz)

Componentes	Concentración final	Volumen (μl)
Buffer 2X	1X	10,00
<i>Taq</i> mix 5U/μL	2U	0,40
Cebador(F) (20 μM)	0,40 μM	0,40
Cebador(R) (20 μM)	0,40 μM	0,40
Sonda (6 μM)	0,24 μM	0,80
Inhibidor Rnasa (40U/uL)	0,266 U/uL	0,10
H2O PCR		2,90
RNA template 5ng/uL		5,00
Volumen total		20,00

Cuadro 3b. Componentes RT-PCR tiempo real ENC virulento (gen fusión)

Componentes	Concentración final	Volumen (μl)
Buffer 2X	1X	10,00
<i>Taq</i> mix 5 U/μL	2U	0,40
Cebador(F) (20 μM)	1,072 μM	1,10
Cebador(R) (20 μM)	0,536 μM	0,55
Sonda (6 μM)	0,18 μM	0,60
Inhibidor Rnasa (40 U/uL)	0,266 U/uL	0,10
H2O PCR		2,25
RNA template 5 ng/uL		5,00
Volumen total		20,00

Cuadro 4. Condiciones de ciclaje para cebadores y sondas del gen matriz y fusión

Cebador/sonda	Nº ciclos	Pasos	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
PMVA-1 Matriz	40	Desnaturalización	10	94
		Hibridación	30	56
		Extensión	10	72
vENC/VFP-1 Fusión	40	Desnaturalización	10	95
		Hibridación	30	58
		Extensión	10	72

PCR matriz. Esta prueba ha sido diseñada para detectar todos los linajes y patotipos de PMVA-1 incluyendo cepas vENC vacunales/lentogénicas y virulentas (cepas mesogénicas/velogénicas). Tiene una sensibilidad de 96,7 % y es utilizada como prueba screening o tamiz. Si la muestra es positiva a PMVA-1 se realiza la PCR fusión.

PCR fusión. Esta prueba detecta la mayoría de cepas vENC virulentas (mesogénicas/velogénicas), incluyendo las velogénicas de California 2002 y México 2000. Tiene una sensibilidad de 91,26%. Si ambas pruebas son positivas, entonces el vENC está presente en la muestra. En casos donde la muestra está en el límite de detección, un espécimen de vENC puede salir positivo con la prueba matriz (PMVA-1) y negativo con la prueba de vENC fusión. Muestras positivas a la prueba Matriz que no pueden ser confirmados por la prueba fusión deben ser considerados como sospechosos y analizarlo por aislamiento viral. Es posible que cepas vacunales o lentogénicas de ENC sean positivos a la prueba matriz y negativas a la prueba fusión. Las muestras que tengan un ciclo umbral (treshold) menor a 35 ($Ct < 35$), significa positivo, la confirmación de vacunas o aislamientos lentogénicos que son positivas a la prueba matriz y negativas a la fusión puede realizarse usando diferentes set de cebadores y sondas.

Las muestras de aves de corral con un $Ct = 35$ o superior se consideran “positivos sospechosos” y debería repetirse la prueba de RT-PCR. Si la muestra es positiva o sospechosa al repetir la prueba, las muestras deben ser transferidas a un Laboratorio de Referencia OIE para las pruebas complementarias.

Cuadro 5. Interpretación de RT-PCR usando set de cebadores y sondas Matriz y Fusión vENC

PCR Matriz	PCR Fusión (vENC Virulento)	RT-PCR vvENC
Positivo	Positivo	POSITIVO
Positivo	Negativo	Sospechoso (*)
Negativo	Positivo	Sospechoso (*)
Negativo	Negativo	Negativo

(*) Todas las muestras sospechosas deben ser re-evaluadas por amplificación y aislamiento viral del fluido alantoideo para una nueva prueba (re-prueba). Si el fluido alantoideo es positivo a ambas pruebas entonces la muestra es positiva al vENC virulento.

Muestras negativas

Las trazas fluorescentes del control negativo deben tener una línea base plana durante todo el ensayo. La traza de fluorescencia no debe tener una curva sigmoideal (indicativo de contaminación) o un aumento en la fluorescencia, el cual es un indicativo de una sonda inestable.

SECUENCIAMIENTO DE ADN

Un fragmento de ADN de 373 pb fue amplificado y secuenciado en el Institute Loeffler Friedler (FLI)- Laboratorio de Referencia OIE para Newcastle-Alemania, según lo descrito por Aldous *et al.* (2003).

Las secuencias nucleotídicas fueron confrontadas con las existentes en el GenBank a través del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), el cual está disponible en la página web del NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>. En el análisis filogenético y diferencias nucleotídicas, se utilizaron secuencias prototipo de cepas reportadas en el GenBank cuyos números de accesoión se muestran en el Cuadro 6.

A la vez, se tradujo las secuencias nucleotídicas a aminoácidos y se comparó con las bases de datos de libre acceso.

Cuadro 6. Secuencias nucleotídicas del virus Newcastle obtenidas del Genbank usadas para el análisis filogenético

Cepa de referencia	Clase	Genotipo	Número de acceso
HDKOS97190_Denmark	1	II	AY175733
1966.10/2003_Hong_Kong	1	III	EF027164
IECK90187_Taiwan	1	IV	AY135757
196/1998_US(AK)	1	V	EF027165
101250-2/2001_U.S.	1	VI	AY626268
HDKCK97192_Germany	1	VIII	AY175732
2686/2001_Rusia	2	I	AY965078
3658/2002_Rusia	2	I	AY965077
31003/92_USA	2	I	AY130861
CN36/2003_Ontairo	2	I	AY289194
D26/76	2	I	M24692
ULS/67	2	I	M24694
39AntarBR_Brazil	2	I	HM143849
126C.00_Argentina	2	I	AY727882
32C/T.98_Argentina	2	I	AY727881
BEA/45	2	II	M24697
TEX/48	2	II	M24698
Roakin/48_USA	2	II	AY289000
VGGA/89_USA	2	II	AY289002
37646/1996_Chile	2	II	JN942033
AUS/32/_Australia	2	III	M24700
MIY/51_Japan	2	III	M24701
Herts/33_USA	2	IV	AY741404
15/00_Honduras	2	V	AY288993
37821/96_Mexico	2	V	AY288999
43084/92_USA	2	V	AY289001
Mexico/456	2	V	EU518678
468/2001_Mexico	2	V	EU518685
IT-227/82_Italy	2	VI	AJ880277
139/90_Kenya	2	VI	AY288997
1083-Fontana_USA	2	VI	AY562988
02/08_Uruguay	2	VI	JF749831
SPVC_Karachi	2	VII	GU182334
28710/93_China	2	VII	AY288988
Y98_China	2	VII	AY390309
TW/95-9_Taiwan	2	VII	AF083966
DE-143/95	2	VII	AF109881
14698/90_Indonesia	2	VII	AY562985
MB076/05_Malaysia	2	VII	GQ901892
APECK92173_Peru	2	VII	AY135752
440620/06_Colombia	2	VII	JN872164
AF2240_Malaysia	2	VIII	AF048763
Trenque-L_Argentina	2	VIII	AY734534
Poultry/Peru/1918-03/2008	2	----	JN800306
Avian/Peru/1918-3/2008	2	----	JN872193
JS/1/97/Go_China	2	IX	AF456435
FJ-1/85_China	2	IX	AF458009

IV.RESULTADOS

En este estudio se presenta la caracterización de cepas del virus de la enfermedad de Newcastle aislados de 13 casos de aves domésticas de diferentes regiones del país, recolectados a partir de brotes de ENC ocurridos entre el 2009 y 2011.

Las 13 muestras clínicas fueron positivas al virus de la enfermedad de Newcastle (PMVA-1), mediante las siguientes pruebas:

Pruebas biológicas

Aislamiento viral. Se aisló el virus de ENC en huevos embrionados SPF de las muestras de órganos e hisopados procesados y todas fueron positivas a la prueba de hemaglutinación e inhibición de la aglutinación (Datos no mostrados).

Pruebas moleculares

PCR convencional. Se generó un amplicón de 202 pb en todas las muestras clínicas, siendo todas positivas al virus ENC. Después de la amplificación, los 13 productos de PCR fueron digeridos con enzima de restricción *Bgl I*, de los cuales fueron 11 positivas a vENC virulento (meso/velogénicas) y 2 no virulentas (Cuadro 7) (Figuras 3 y 4).

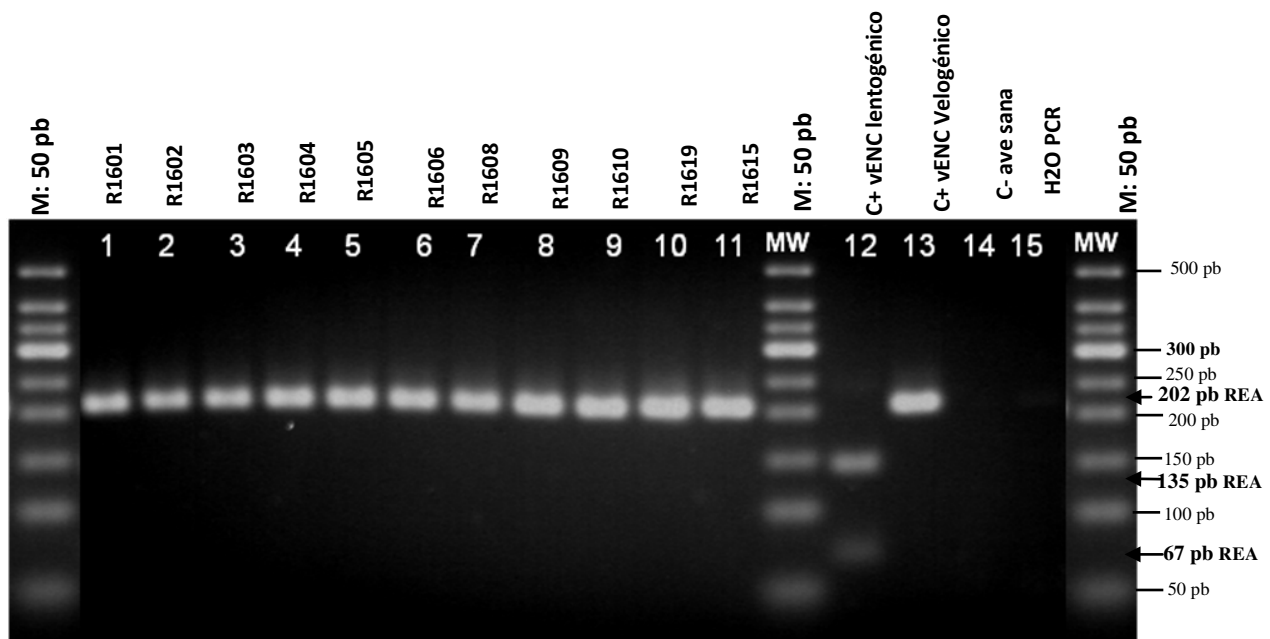


Figura 3. Prueba de RT-PCR convencional y REA mostrando el gen fusión de cepas ENC virulentas.

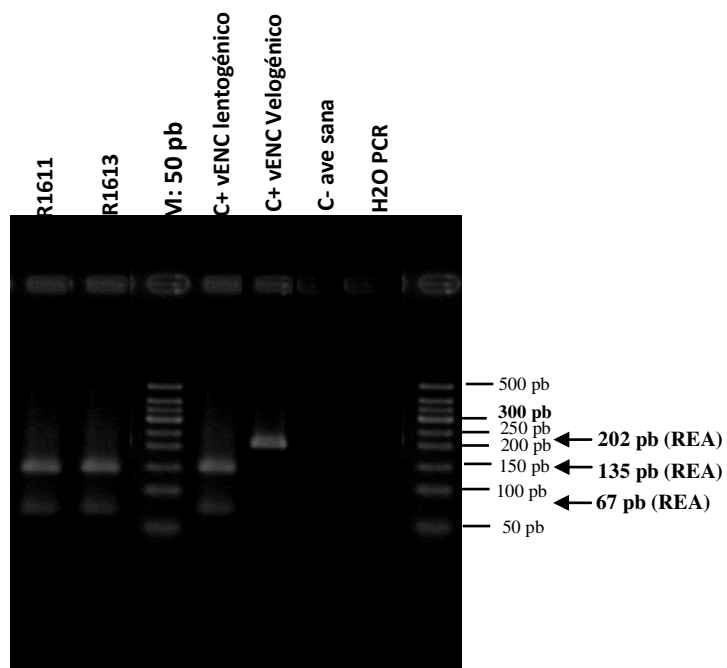


Figura 4. Prueba de RT-PCR convencional y REA mostrando el lugar de restricción *Bgl* I de cepas ENC “no virulentas”.

Cuadro 7. Tipo de virus de la Enfermedad de Newcastle según tipo de ave y procedencia mediante pruebas moleculares

Código muestra	Muestras (N°)	Procedencia	Tipo de ave	Aislamiento viral	Tipo de vENC (PCR-REA)	PCR tiempo real		Tipo de virus ENC
						Matriz	Fusion	
Perú R1601	1	Tacna	pelea	+	virulento	+	+	Virulento
Perú R1602	1	Ayacucho	pelea	+	virulento	+	+	Virulento
Perú R1603	1	Ancash	pelea	+	virulento	+	+	Virulento
Perú R1604	1	Cajamarca	traspatio	+	virulento	+	+	Virulento
Perú R1605	1	Cajamarca	pelea	+	virulento	+	+	Virulento
Perú R1606	1	La Libertad	pelea	+	virulento	+	+	Virulento
Perú R1608	1	Ucayali	traspatio	+	virulento	+	-	Lentogénico
Perú R1609	1	Ucayali	traspatio	+	virulento	+	-	Lentogénico
Perú R1610	1	Ucayali	traspatio	+	virulento	+	-	Lentogénico
Perú R1611	1	Ucayali	traspatio	+	No virulento	+	-	Lentogénico
Perú R1613	1	Piura	traspatio	+	No virulento	+	-	Lentogénico
Perú R1615	1	Arequipa	granja comercial	+	virulento	+	-	Lentogénico
Perú R1619	1	Arequipa	granja comercial	+	virulento	+	-	Lentogénico

vENC= virus de la enfermedad de Newcastle

PCR en Tiempo Real

La prueba matriz de RT-PCR tiempo real de un solo paso, usa como blanco el gen matriz (M) que es utilizada como prueba tamiz para la detección del virus ENC.

La prueba de RT-PCR tiempo real gen matriz detectó la presencia del virus ENC en 13/13 muestras de fluido alantoideo, siendo todas positivas al virus de la Enfermedad de Newcastle. Todas las muestras presentaron un ciclo umbral o threshold menor a 30 (Ct <30), (Figura 5).

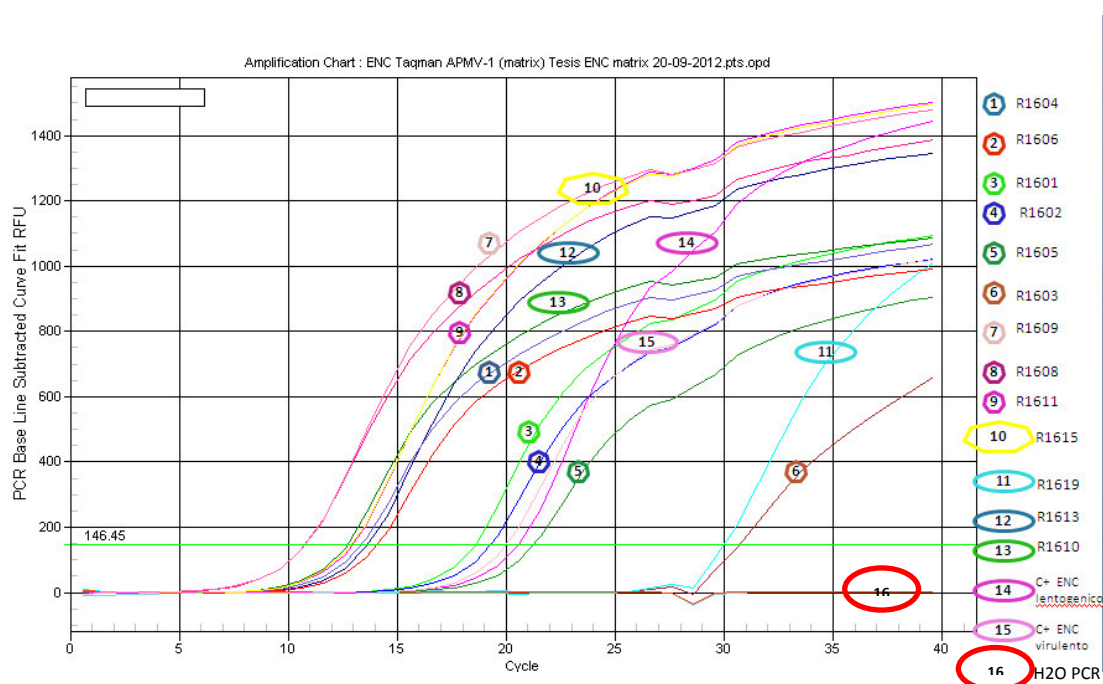


Figura 5. Fluorograma de muestras positivas a vENC mediante PCR tiempo real gen matriz

La prueba RT-PCR tiempo real gen fusión mostró 6/13 muestras positivas al virus de la Enfermedad de Newcastle virulento y 7/13 negativas o cepas ENC lentogénicas. Todas las muestras positivas a la prueba PCR gen fusión presentaron un ciclo umbral o threshold menor a 33 (Ct <33) (Figura 6).

Las cepas vENC virulentas fueron 5 de aves de riña y 1 de traspatio procedentes de Tacna, Ayacucho, Ancash, Cajamarca y La Libertad. Las cepas vENC no virulentos fueron 5 de aves de traspatio y 2 de granjas avícolas comerciales procedentes de Ucayali, Piura y Arequipa (Cuadro 7).

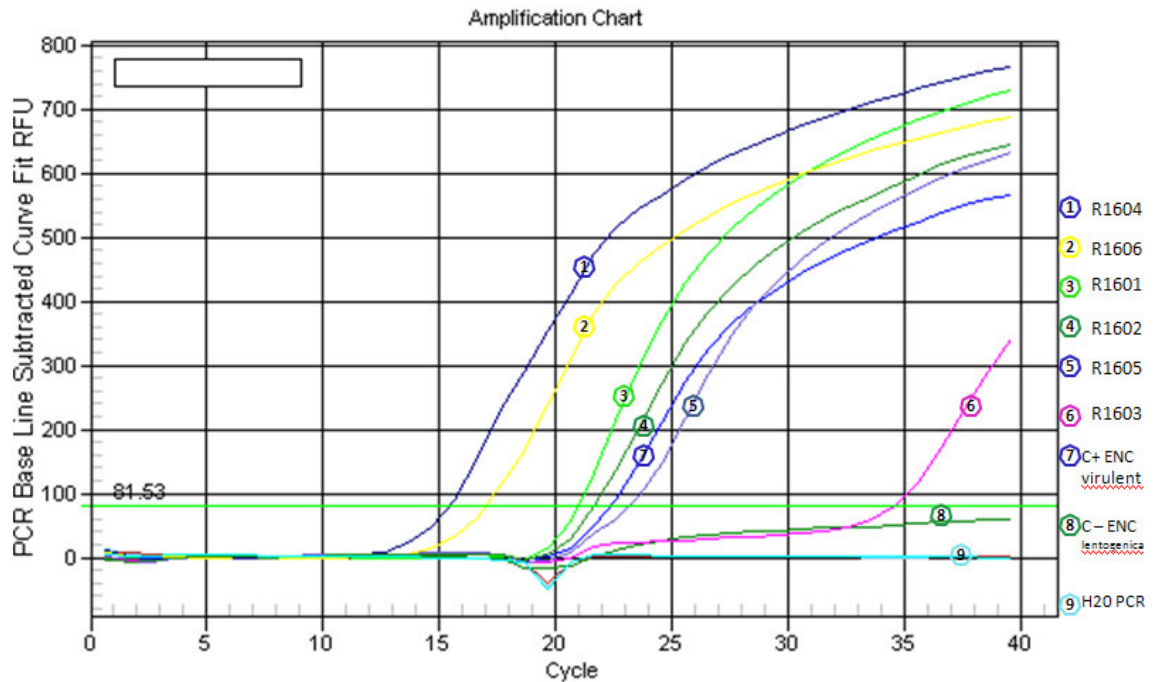


Figura 6. Fluorograma de muestras positivas a vENC virulento mediante PCR tiempo real gen fusión

Análisis del lugar de división de la proteína Fusión

Se analizó la secuencia del lugar de división de la proteína de fusión de todos los aislamientos del país, se encontraron 6 cepas virulentas procedentes de Tacna, Ayacucho, Ancash, Cajamarca y La Libertad. La presencia de la secuencia de aminoácidos básicos ${}_{113}\text{R-Q-K-R-F}_{117}$ y una fenilalanina en la posición 117 es característico de los aislamientos virulentos velogénicos (Cuadro 8, Fig 7a y 7b).

Las 7 cepas lentogénicas o de baja virulencia provenientes de Ucayali, Piura y Arequipa presentaron aminoácidos básicos en la proteína F, en las posiciones 113 y 116 y una leucina en la posición 117, presentando los siguientes motivos ${}^{112}\text{-G-K-Q-G-R-L-}^{117}$ ó ${}^{112}\text{-G-R-Q-G-R-L-}^{117}$ lo cual es característico del virus ENC lentogénico (Cuadro 8).

a)

```

          310      320      330      340      350      360      370
MB076/05 Malaysia      AGGATACAAAGGCTCTGTGCCACCTCTGGAGGAACAGACAGAAACGCTTTTAGGTGCGGTTATGGTAGTG
APECK92173 Peru       AGGATACAAAGGCTCTGTGCCACCTCTGGAGGAACAGACAGAAACGCTTTTAGGTGCGGTTATGGCAGTG
Y98 China              AAGATCCAAGGCTCTGTGCCACCTCTGGAGGAACAGACAAAACGCTTTTAGGTGCTGTTATGGCAGTG
TW/95-9 Taiwan        AAGATCCAAGGCTCTGTGCCACCTCTGGAGGAACAGACAGAAACGCTTTTAGGTGCGGTTATGGCAGTG
14698/90 Indonesia    AAGATCCAAGGCTCTGTGCCACCTCTGGAGGAACAGACAGAAACGCTTTTAGGTGCGGTTATGGCAGTG
DE-143/95             AAGATCCAAGGCTCTGTGCCACCTCTGGAGGAACAGACAGAAACGCTTTTAGGTGCTGTTATGGCAGTG
440620/06 Colombia    AAGATCCAAGGCTCTGTGCCACCTCTGGAGGAACAGACAAAACGCTTTTAGGTGCTGTTATGGCAGTG
Poultry/Peru/1918-03/2008 AGGATACAAAGGCTCTGTGCCACTTCTGGAGGAACAGGCAAAACGCTTTTAGGTGCTGTTATCGGTAGTG
SPVC Karachi         AGGATACAAAGGCTCTGTGCCACTTCTGGAGGAACAGACAGAAACGCTTTTAGGTGCCATTATGGCAGTG
28710/93 China        AGGATACAAAGGCTCTGTGCCACTTCTGGAGGAACAGGCAAAACGCTTTTAGGTGCCATTATGGCAGTG
Peru|R1605|11|FLI-VII AGGATACAAAGGCTCTGTGCCACTTCTGGAGGAACAGGCAAAACGCTTTTAGGTGCTGTTATCGGTAGTG
Peru|R1601|11|FLI-VII AGGATACAAAGGCTCTGTGCCACTTCTGGAGGAACAGGCAAAACGCTTTTAGGTGCTGTTATCGGTAGTG
Peru|R1604|11|FLI-VII AGGATACAAAGGCTCTGTGCCACTTCTGGAGGAACAGGCAAAACGCTTTTAGGTGCTGTTATCGGTAGTG
Avian/Peru/1918-3/2008 AGGATACAAAGGCTCTGTGCCACTTCTGGAGGAACAGGCAAAACGCTTTTAGGTGCTGTTATCGGTAGTG
Peru|R1606|11|FLI-VII AGGATACAAAGGCTCTGTGCCACTTCTGGAGGAACAGGCAAAACGCTTTTAGGTGCTGTTATCGGTAGTG
Peru|R1612|11|VI Ib   AGGATACAAAGGCTCTGTGCCACTTCTGGAGGAACAGGCAAAACGCTTTTAGGTGCTGTTATCGGTAGTG
Peru|R1607|11|FLI-VI Ib AGGATACAAAGGCTCTGTGCCACTTCTGGAGGAACAGGCAAAACGCTTTTAGGTGCTGTTATCGGTAGTG
Peru|R1603|11|FLI-VIIa AGGATACAAAGGCTCTGTGCCACTTCTGGAGGAACAGGCAAAACGCTTTTAGGTGCTGTTATCGGTAGTG
Peru|1602|11|FLI-VIIa AGGATACAAAGGCTCTGTGCCACTTCTGGAGGAACAGGCAAAACGCTTTTAGGTGCTGTTATCGGTAGTG
Clustal Consensus     * * * * *

```

b)

```

          110      120
MB076/05 Malaysia      RIQGSVSTSGG RQKRF GAVIGS
APECK92173 Peru       RIQGSVSTSGG RQKRF GAVIGS
Y98 China              KIQGSVSTSGG RQKRF GAVIGS
TW/95-9 Taiwan        KIQGSVSTSGG RQKRF GAVIGS
14698/90 Indonesia    KIQGSVSTSGG RQKRF GAVIGS
DE-143/95             KIQGSVSTSGG RQKRF GAVIGS
440620/06 Colombia    KIQGSVSTSGG RQKRF GAVIGS
Poultry/Peru/1918-03/2008 RIQGSVSTSGG RQKRF GAVIGS
SPVC Karachi         RIQGSVSTSGG RQKRF GAVIGS
28710/93 China        RIQSVTSSGG RQKRF GAVIGS
Peru|R1605|11|FLI-VII RIQGSASTSGG RQKRF GAVIGS
Peru|R1601|11|FLI-VII RIQGSVSTSGG RQKRF GAVIGS
Peru|R1604|11|FLI-VII RIQGSASTSGG RQKRF GAVIGS
Avian/Peru/1918-3/2008 RIQGSVSTSGG RQKRF GAVIGS
Peru|R1606|11|FLI-VII RIQGSASTSGG RQKRF GAVIGS
Peru|R1612|11|VI Ib   RIQGSASTSGG RQKRF GAVIGS
Peru|R1607|11|FLI-VI Ib RIQGSASTSGG RQKRF GAVIGS
Peru|R1603|11|FLI-VIIa RIQGSVSTSGG RQKRF GAVIGS
Peru|1602|11|FLI-VIIa RIQGSVSTSGG RQKRF GAVIGS

```

Figura 7. Alineamiento de la secuencia nucleotídica y aminoacídica parcial de la proteína fusión del virus Newcastle genotipo 2.VII con otras secuencias relacionadas. a) secuencia nucleotídica, b) secuencia aminoacídica. El recuadro representa la región sensible a mutación del gen y la proteína fusión.

Cuadro 8. Cambio en secuencia aminoacídica de la proteína F0 según tipo de virus ENC

Código de muestra	Diagnóstico	Posición aminoacídica del 110 al 117	Genotipo
Perú R1601	meso/velogénico	G GRRQKR *FIG	VII
Perú R1602	meso/ velogénico	G GRRQKR *FIG	VII
Perú R1603	meso/ velogénico	G GRRQKR *FIG	VII
Perú R1604	meso/ velogénico	G GRRQKR *FIG	VII
Perú R1605	meso/ velogénico	G GRRQKR *FIG	VII
Perú R1606	meso/ velogénico	G GRRQKR *FIG	VII
Perú R1608	Lentogénico	G GGKQGR *LIG	I
Perú R1609	Lentogénico	G GGKQGR *LIG	I
Perú R1610	Lentogénico	G GGKQGR *LIG	I
Perú R1611	Lentogénico	G GGKQGR *LIG	II
Perú R1613	Lentogénico	G GGRQGR *LIG	II
Perú R1615	Lentogénico	G GGKQGR *LIG	I
Perú R1619	Lentogénico	G GGRQGR *LIG	II

(*) representa el punto o lugar de división. Los aminoácidos básicos se muestran en negrita.

Los virus ENC virulentos tienen una fenilalanina (F) en la posición 117, F1 N-terminal, mientras que los lentogénicos una leucina.

Análisis Genético de Secuencias

Se analizó una región de 373 pares de bases del gen de la proteína de fusión en 13 cepas vENC aislados de aves de diferentes regiones del Perú. La secuencia nucleotídica se comparó con las secuencias correspondientes de 47 virus representativos de ENC disponibles en el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) que corresponden a 6 genotipos de la clase 1 (genotipos II, III, IV, V, VI y VIII) y 41 a la clase 2 (genotipos del I al VIII) (Cuadro 6).

Todas las secuencias a nivel de nucleótidos se alinearon y cortaron con el programa ClustalX 2.0.9. El alineamiento se realizó con 60 secuencias (13 secuencias de Perú

+ 47 secuencias no peruanas), posteriormente se corrigió el alineamiento con el programa BioEdit y se realizó la traducción de la región sensible a mutación de la proteína fusión (Clase 2, genotipo VII).

Los virus de baja virulencia de Ucayali (R1608, R1609 y R1610) y Arequipa (R1615) se agrupan con los virus ENC del genotipo I y están muy relacionados con las cepas 31003/92 USA (AY130861), 3658/2002 Rusia (AY965077), 2686/2001 Rusia, ULS/67 (M24694), 39AntarBR Brazil (HM143849), CN36/2003 Ontario (AY289194), 126C.00 Argentina (AY727882) y 32C/T.98 Argentina (AY727881) (Figura 8).

Los virus de baja virulencia de Ucayali (R1611), Piura (R1613) y Arequipa (R1619) se agrupan con los virus ENC del genotipo II y están cercanamente relacionados con las cepas VGGA/89 USA (AY289002), TEX/48 (M24698), Roakin/48 USA (AY289000), BEA/45 (M24697) y 37646/1996 Chile (JN942033) (Figura 9).

Las cepas ENC virulentas de Perú, Tacna (R1601), Ayacucho (R1602), Ancash (R1603), Cajamarca (R1604 y R1605) y La Libertad (R1606) se agruparon con los virus ENC del genotipo VII y están muy relacionados con las cepas Poultry/Perú/1918-03/2008 (JN800306), Avian/Perú/1918-3/2008 (JN872193), APECK92173_Perú, 1992 (AY135752) y la cepa MB076/05_Malasia (GQ901892), aislado en Asia. Los 09 aislamientos reportados en el Genbank como genotipo 2.VII mostraron una alta similitud de secuencias con las 06 cepas peruanas (Figura 10).

En base al análisis de esta región, los 13 virus aislados en Perú entre 2009 y 2011 corresponden al clado clase II, 3, 4 y 6 cepas ENC pertenecen a los genotipos II, I y VII respectivamente y están filogenéticamente distantes de los virus de clase I (Figura 11).

Los árboles filogenéticos generados se elaboraron por tres metodologías: Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP) y Neighbor-Joining (NJ). En el árbol de ML se utilizó un bootstrap de 100 replicaciones, Nearest-Neighbor-Interchange (NNI) como método heurístico y no se tomaron en cuenta los gaps o datos perdidos. En el árbol de MP y NJ se empleó un bootstrap de 1000 replicaciones y no se analizaron los datos perdidos. En el caso del árbol NJ, el modelo de sustitución nucleotídica fue Kimura 2-parámetros y se incluyó las transiciones y transversiones.

```

126C_00_Argentina
32C/T_98_Argentina
2686/2001_Rusia
3658/2002_Rusia
Peru|R1615|11|FLI-I
Peru|R1610|11|FLI-Ia
D26/76
Peru|R1609|11|FLI-Ia
CN36/2003_Ontario
31003/92_USA
Peru|R1608|11|FLI-Ia
ULS/67
39AntarBR_Brazil
Clustal Consensus
.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100
ATGGGCTCCGGATCTTCTACCAAGATCCGATACCTCTGATGCTGACCGTCCGGTCCGACTGGCACTAAGTTGCCCGCTCTGGCAAGCTCTCTTGATG
ATGGGCTCCGGATCTTCTACCAAGATCCGATACCTCTGATGCTGACCGTCCGGTCCGACTGGCACTAAGTTGCCCGCTCTGGCAAGCTCTCTTGATG
ATGGGCTCCGGATCTTCTACCAAGATCCGATACCTCTGATGCTGACCGTCCGGTCCGACTGGCACTAAGTTGCCCGCTCTGGCAAGCTCTCTTGATG
ATGGGCTCCAGATCTTCTACCAAGATCCGATACCTCTGATGCTGACCGTCCGGTCCGACTGGCACTAAGTTGCCCGCTCTGGCAAGCTCTCTTGATG
ATGGGCTCCAGATCTTCTACCAAGATCCGATACCTCTGATGCTGACCGTCCGGTCCGACTGGCACTAAGTTGCCCGCTCTGGCAAGCTCTCTTGATG
ATGGGCTCCAGATCTTCTACCAAGATCCGATACCTCTGATGCTGACCGTCCGGTCCGACTGGCACTAAGTTGCCCGCTCTGGCAAGCTCTCTTGATG
ATGGGCTCCAGATCTTCTACCAAGATCCGATACCTCTGATGCTGACCGTCCGGTCCGACTGGCACTAAGTTGCCCGCTCTGGCAAGCTCTCTTGATG
ATGGGCTCCAGATCTTCTACCAAGATCCGATACCTCTGATGCTGACCGTCCGGTCCGACTGGCACTAAGTTGCCCGCTCTGGCAAGCTCTCTTGATG
ATGGGCTCCAGATCTTCTACCAAGATCCGATACCTCTGATGCTGACCGTCCGGTCCGACTGGCACTAAGTTGCCCGCTCTGGCAAGCTCTCTTGATG
ATGGGCTCCAGATCTTCTACCAAGATCCGATACCTCTGATGCTGACCGTCCGGTCCGACTGGCACTAAGTTGCCCGCTCTGGCAAGCTCTCTTGATG
*****

.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200
CGAGGCCTCTGCGCGTCCGGGAAATTGGTACACAGGAGACAAGGCAGTCAACATATATACCTCATCTCAGACTGGGTCATATAGTCAAGTACTCC
CGAGGCCTCTGCGCGTCCGGGAAATTGGTACACAGGAGACAAGGCAGTCAACATATATACCTCATCTCAGACTGGGTCATATAGTCAAGTACTCC
CGAGGCCTCTGCGCGTCCGGGAAATTGGTACACAGGAGACAAGGCAGTCAACATATATACCTCATCTCAGACTGGGTCATATAGTCAAGTACTCC
CGAGGCCTCTGCGCGTCCGGGAAATTGGTACACAGGAGACAAGGCAGTCAACATATACACCTCATCTCAGACTGGGTCATATAGTCAAGTACTCC
CGAGGCCTCTGCGCGTCCGGGAAATTGGTACACAGGAGACAAGGCAGTCAACATATACACCTCATCTCAGACTGGGTCATATAGTCAAGTACTCC
CGAGGCCTCTGCGCGTCCGGGAAATTGGTACACAGGAGACAAGGCAGTCAACATATACACCTCATCTCAGACTGGGTCATATAGTCAAGTACTCC
CGAGGCCTCTGCGCGTCCGGGAAATTGGTACACAGGAGACAAGGCAGTCAACATATACACCTCATCTCAGACTGGGTCATATAGTCAAGTACTCC
CGAGGCCTCTGCGCGTCCGGGAAATTGGTACACAGGAGACAAGGCAGTCAACATATACACCTCATCTCAGACTGGGTCATATAGTCAAGTACTCC
CGAGGCCTCTGCGCGTCCGGGAAATTGGTACACAGGAGACAAGGCAGTCAACATATACACCTCATCTCAGACTGGGTCATATAGTCAAGTACTCC
CGAGGCCTCTGCGCGTCCGGGAAATTGGTACACAGGAGACAAGGCAGTCAACATATACACCTCATCTCAGACTGGGTCATATAGTCAAGTACTCC
*****

.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300
GAATATGCCCAAGGATAAAGAGGCGTGTGCAAAAGCCCCCTTAGAGGCATACAACAGGACATGACACTTTGCTCACCCTTTGGTATTCATTTCAT
GAATATGCCCAAGGATAAAGAGGCGTGTGCAAAAGCCCCCTTAGAGGCATACAACAGGACATGACACTTTGCTCACCCTTTGGTATTCATTTCAT
CAATATGCCCAAGGATAAAGAGGCGTGTGCAAAAGCCCCCTTAGAGGCATACAACAGGACATGACACTTTGCTCACCCTTTGGTATTCATTTCAT
CAATATGCCCAAGGATAAAGAGGCGTGTGCAAAAGCCCCCTTAGAGGCATACAACAGGACATGACACTTTGCTCACCCTTTGGTATTCATTTCAT
AAATATGCCCAAGGATAAAGAGGCGTGTGCAAAAGCCCCCTTAGAGGCATACAACAGGACATGACACTTTGCTCACCCTTTGGTATTCATTTCAT
AAATATGCCCAAGGATAAAGAGGCGTGTGCAAAAGCCCCCTTAGAGGCATACAACAGGACATGACACTTTGCTCACCCTTTGGTATTCATTTCAT
AAATATGCCCAAGGATAAAGAGGCGTGTGCAAAAGCCCCCTTAGAGGCATACAACAGGACATGACACTTTGCTCACCCTTTGGTATTCATTTCAT
AAATATGCCCAAGGATAAAGAGGCGTGTGCAAAAGCCCCCTTAGAGGCATACAACAGGACATGACACTTTGCTCACCCTTTGGTATTCATTTCAT
AAATATGCCCAAGGATAAAGAGGCGTGTGCAAAAGCCCCCTTAGAGGCATACAACAGGACATGACACTTTGCTCACCCTTTGGTATTCATTTCAT
*****

.....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370
AGGATACAGAGTCTGTGACCACTCTGGAGGAGGGAACAGGGACGCCTGATAGGCTATTATGGCGGTG
AGGATACAGAGTCTGTGACCACTCTGGAGGAGGGAACAGGGACGCCTGATAGGCTATTATGGCGGTG
AGGATACAGAGTCTGTGACCACTCTGGAGGAGGGAACAGGGACGCCTGATAGGCTATTATGGCGGTG
AGGATACAGAGTCTGTGACCACTCTGGAGGAGGGAACAGGGACGCCTGATAGGCTATTATGGCGGTG
AGGATACAGAGTCTGTGACCACTCTGGAGGAGGGAACAGGGACGCCTGATAGGCTATTATGGCGGTG
AGGATACAGAGTCTGTGACCACTCTGGAGGAGGGAACAGGGACGCCTGATAGGCTATTATGGCGGTG
AGGATACAGAGTCTGTGACCACTCTGGAGGAGGGAACAGGGACGCCTGATAGGCTATTATGGCGGTG
AGGATACAGAGTCTGTGACCACTCTGGAGGAGGGAACAGGGACGCCTGATAGGCTATTATGGCGGTG
AGGATACAGAGTCTGTGACCACTCTGGAGGAGGGAACAGGGACGCCTGATAGGCTATTATGGCGGTG
AGGATACAGAGTCTGTGACCACTCTGGAGGAGGGAACAGGGACGCCTGATAGGCTATTATGGCGGTG
*****

```

Figura 8. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas parciales del gen fusión del virus Newcastle no virulento, genotipo 2.I, con el programa ClustalX. El tamaño de las secuencias es de 373 nucleótidos; (*), indica sitio conservado en todas las secuencias analizadas.

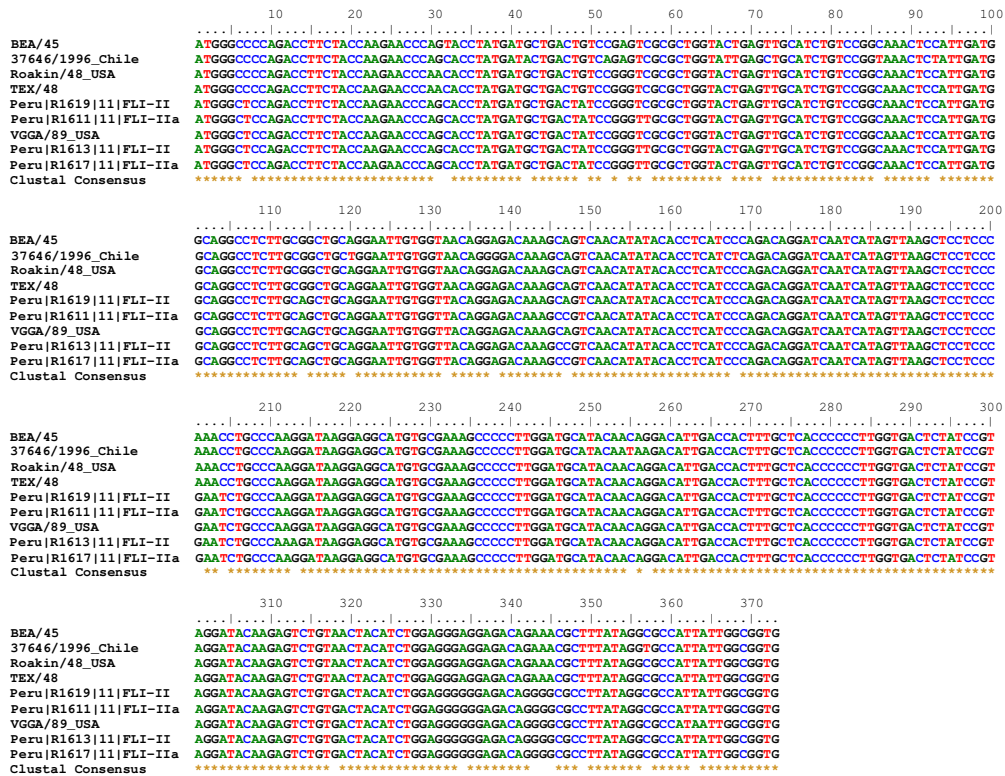


Figura 9. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas parciales del gen fusión del virus Newcastle no virulento, genotipo 2.II, con el programa ClustalX. El tamaño de las secuencias es de 373 nucleótidos; (*), indica sitio conservado en todas las secuencias analizadas.

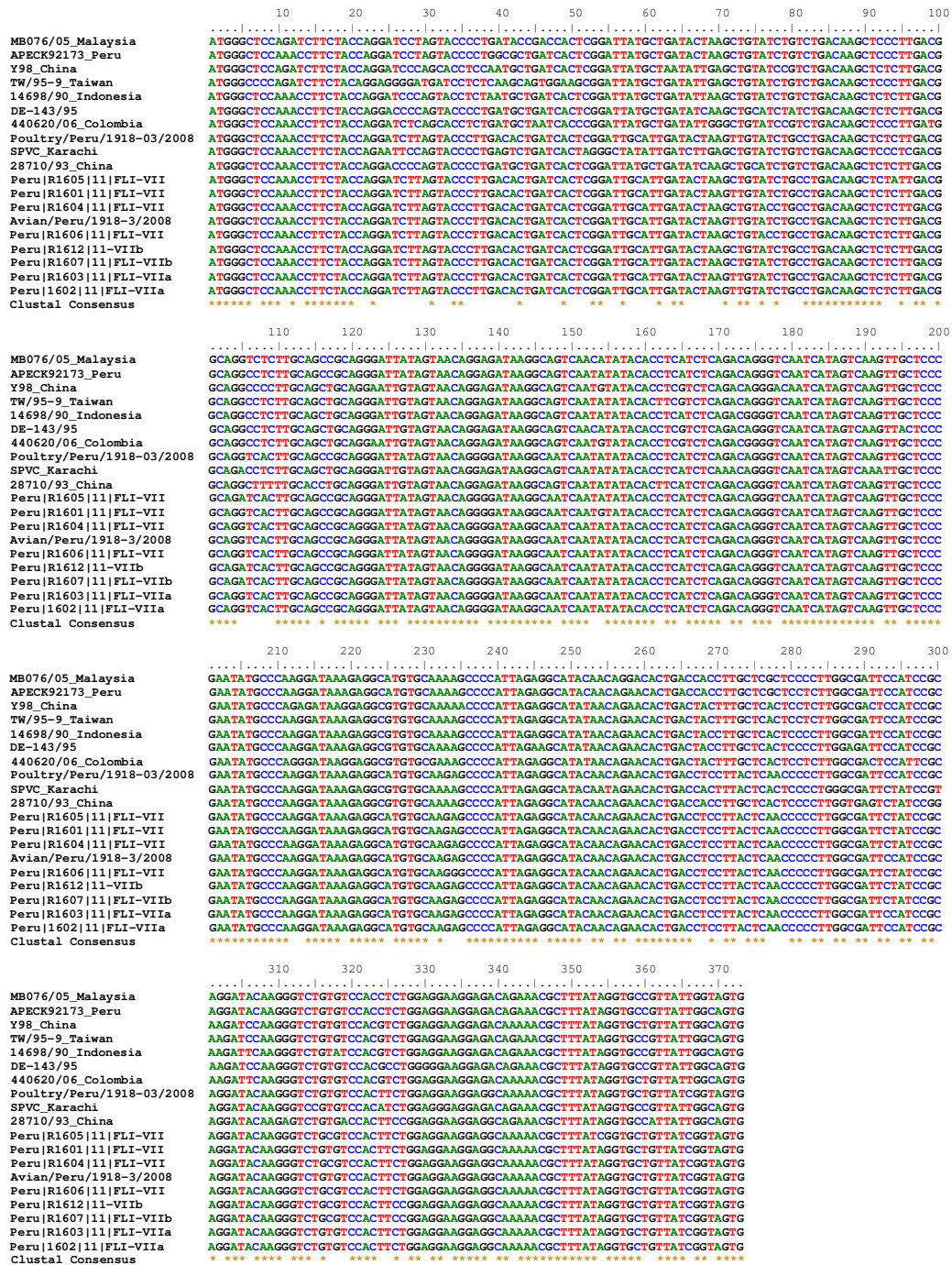


Figura 10. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas parciales del gen fusión, del virus Newcastle virulento genotipo 2.VII, con el programa ClustalX; (*), indica sitio conservado en todas las secuencias analizadas.

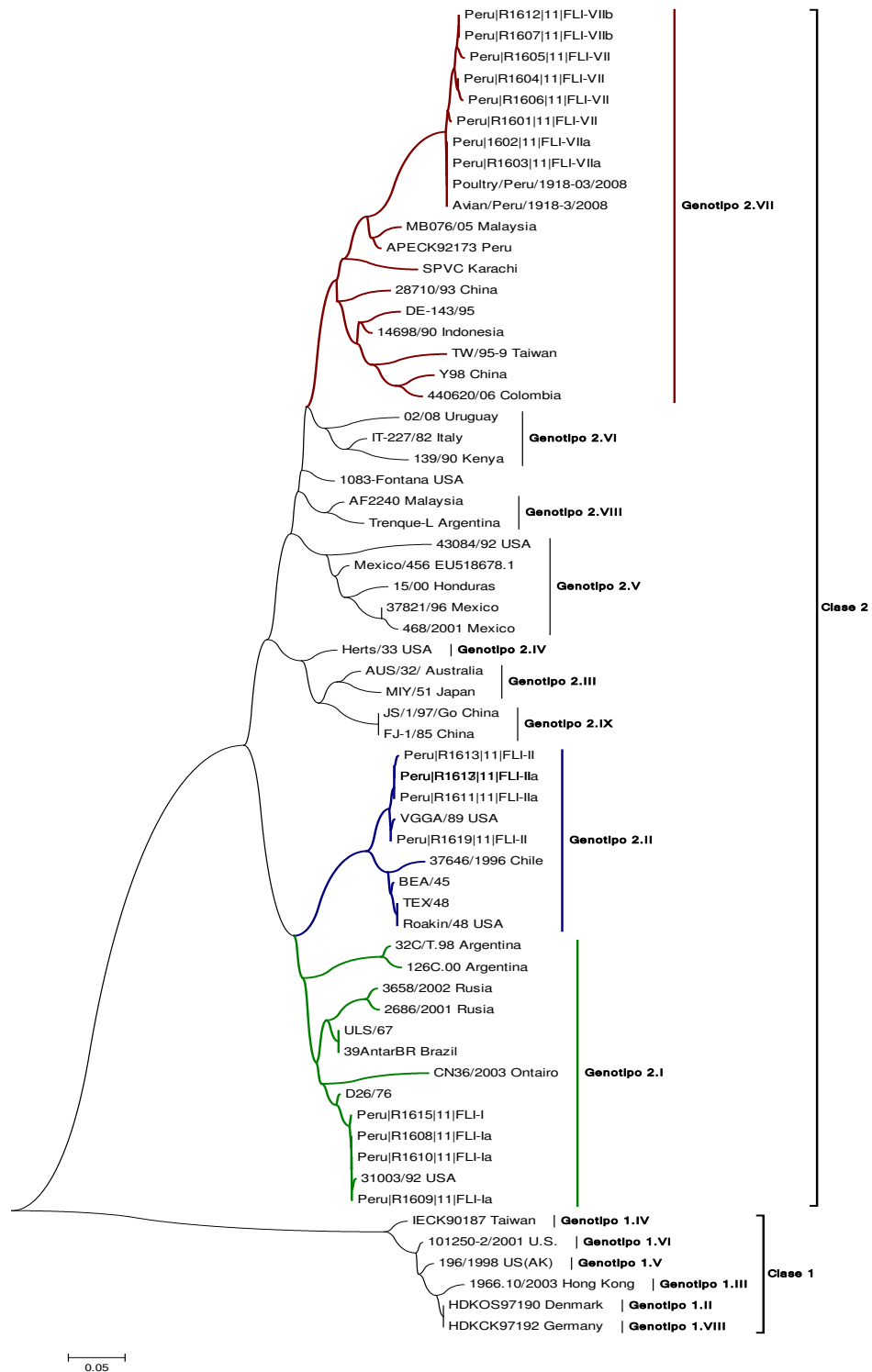


Figura 11. Árbol filogenético de Maximun Likelihood (ML), Maximun Parsimony (MP) y Neighbor Joining (NJ), mostrando las clases 1 y 2. Construido por comparación de las secuencias nucleotídicas parciales de los genes F de los Virus Newcastle, aislados en Perú. Escala de 0.05 sustituciones por nucleótido. Valor de bootstrap de 100 replicaciones para ML y 1000 replicaciones para MP y NJ.

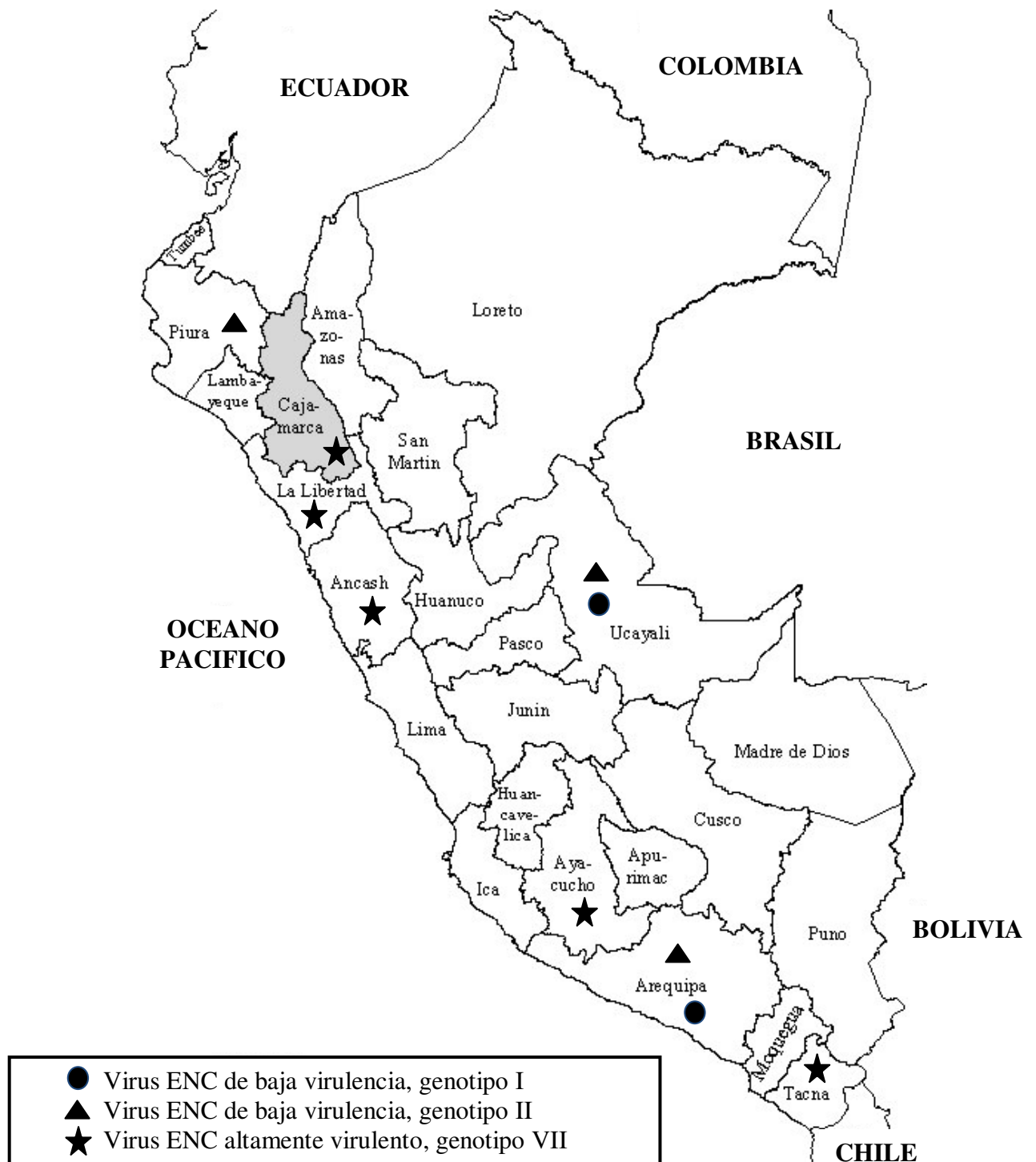


Figura 12. Mapa de distribución genotípica del virus ENC en el Perú

V. DISCUSIÓN

Actualmente, la enfermedad de Newcastle es una de las enfermedades virales altamente contagiosas que afectan a más de 250 especies de aves y causan grandes pérdidas económicas en la industria avícola en todo el mundo (Alexander *et al.*, 1997).

La detección del agente viral ENC por técnicas convencionales de diagnóstico logran una limitada caracterización viral y brindan escasa información para estudios epidemiológicos (Alexander, 2003a).

Los métodos moleculares basados en RT-PCR, permiten determinar la virulencia de una cepa, son utilizados como métodos de rutina para el diagnóstico en muchos laboratorios de países desarrollados, ya que han demostrado tener sensibilidad igual o mayor al aislamiento viral convencional (Brown *et al.*, 2003; Hung *et al.*, 2004).

La prueba RT-PCR convencional y REA detectaron 11 cepas ENC virulentas y 2 no virulentos, sin embargo 5 de las cepas virulentas por PCR- REA fueron tipificadas como lentogénicas por PCR tiempo real y secuenciamiento. Las desventajas, como sucede con los cebadores primarios destinados a identificar el patotipo, son debido a que los vENC muestran variaciones considerables en el lugar de división y es poco probable que las pruebas diseñadas reconozcan a todos los vENC (Alexander 2003a). Las pruebas de RT-PCR tiempo real, secuenciamiento de nucleótidos y la secuencia aminoacídica de la proteína fusión, en cambio, vienen siendo utilizadas para determinar la virulencia de aislamientos y su filogenia (Marin *et al.*, 1996; Seal 2004 y 2005; OIE 2006).

Las pruebas de RT-PCR tiempo real usando como blanco el gen M, son utilizadas como pruebas tamiz a partir de hisopados, órganos y fluidos alantoideos. La prueba gen M utiliza cebadores y sondas que fueron diseñadas para detectar el gen matriz del vENC altamente conservado, pero no determina el patotipo (Kim *et al.*, 2007a).

La prueba de PCR tiempo real gen matriz permitió detectar la presencia del virus de la enfermedad de Newcastle en 13 muestras de aves de pelea, traspatio y granjas avícolas comerciales.

La prueba de PCR tiempo real gen fusión detectó 6/13 muestras positivas a vENC virulento de aves de traspatio y pelea. Las 7/13 muestras que fueron negativas a PCR gen fusión se confirmaron de baja virulencia o lentogénicas mediante secuenciamiento.

Para determinar la virulencia de los aislamientos se amplificó y secuenció la principal región funcional del gen de la proteína de fusión y se realizó el análisis filogenético para determinar el patotipo. La secuencia del lugar de división de la proteína de fusión de todos los aislamientos virulentos provenientes de Tacna, Ayacucho, Ancash, Cajamarca y La Libertad presentaron la secuencia $_{113}R-Q-K-R-F_{117}$ con aminoácidos básicos entre las posiciones 113 al 116 y una fenilalanina en la posición 117 lo cual es característico de los aislamientos virulentos velogénicos (Figura 6 y Cuadro 8).

Por otro lado, los aislamientos virulentos de Perú se agruparon en el genotipo VII y en particular, poseen mayor similitud con los virus Newcastle virulentos aislados en 1992 y 2008 en Perú y el de Malasia. El genotipo VII apareció después de 1960, contiene solo virus virulentos y es el genotipo más frecuentemente asociado con brotes de ENC en todo el mundo, principalmente en África, Asia y Medio Oriente (Miller *et al*, 2010b, Miller *et al*, 2009, Susta *et al*, 2010). Este genotipo es motivo de vigilancia permanente debido a que algunas cepas han mostrado un incremento de la virulencia en aves de granja, mientras que otros han ampliado su rango de hospederos y ahora son capaces de producir enfermedad en gansos (Liu *et al*, 2003, Huang *et al*, 2004). Además, el primer reporte de un virus genotipo VII recientemente aislado en aves de granja en Sudamérica indica que este genotipo está diseminándose a otras partes del mundo (Perozo *et al.*, 2010).

Los virus ENC virulentos de Perú, genotipo VII, difieren con los aislados virulentos clase II, genotipo V, circulantes en México entre los años 1998 y 2006, con una relación epidemiológica cercana con los virus responsables de los brotes de ENC reportados en los Estados Unidos (Perozo *et al*, 2008). El genotipo V apareció en 1970 y son frecuentemente aislados de Sudamérica y Centroamérica de aves de corral y en Norteamérica en gaviotas y cormoranes (Rue *et al*, 2010).

En Sudamérica, se han realizado pocos estudios de ENC, entre ellos un estudio de epidemiología molecular y filogenia en pollos publicado en Argentina, donde encontraron un solo tipo de virus identificado como vENC lentogénico (Berinstein *et al*, 1999) y un estudio de caracterización molecular del vENC en aves silvestres en Chile donde aislaron un vENC mesogénico perteneciente al genotipo V (Moreno *et al*, 2009). Recientemente, un estudio de caracterización molecular y filogenia en aves de Venezuela demostraron la presencia de un virus ENC virulento, perteneciente a la clase II, genotipo VII, un genotipo frecuentemente de Asia y África (Perozo *et al*, 2012).

Las cepas de baja virulencia de Ucayali, Piura y Arequipa presentaron aminoácidos básicos en la proteína F, en las posiciones 113 al 116; y una leucina en la posición 117, lo cual es característico del virus ENC lentogénico. Además se agruparon en el genotipo I los aislados de Ucayali y Arequipa; y genotipo II de Ucayali, Piura y Arequipa, presentando mayor similitud con los aislados de EEUU para ambos genotipos. Los genotipos I y II son virus de baja virulencia aislados comúnmente de aves domésticas y silvestres. Las cepas del genotipo II han sido utilizadas como vacunas vivas contra el virus ENC por más de 40 años y hay pruebas de que antes de la década de 1970, el genotipo II fue predominante en Norteamérica (Czegledi *et al*, 2002; Czegledi *et al*, 2006; Huovilainen *et al*, 2001; Jorgensen *et al*, 1999; King and Seal 1997; Locke *et al*, 2000; Marin *et al*, 1996; Miller *et al*, 2010b; Rosenberger *et al*, 1975; Seal *et al*, 2005; Takakuwa *et al*, 1998).

De acuerdo a los estudios de epidemiología molecular de Aldous (2003), las cepas virales R1608, R1609, R1610 de Ucayali y R1615 de Arequipa se agrupan en el linaje 1. Los virus del linaje 1 son aislados frecuentemente de aves silvestres acuáticas distribuidas en todo el mundo. Los virus R1619 de Arequipa, R1613 de Piura y R1611 de Ucayali, se agrupan en el linaje 2 y son virus que se originaron principalmente en Norteamérica y son utilizados como vacunas vivas en todo el mundo, principalmente cepas B1/47 y La Sota/47 (Aldous *et al*, 2003). Los virus de Ayacucho (R1612), Ancash ((R1603), Tacna (R1601), Cajamarca (R1604 y 1605) y La Libertad ((R1606) se agrupan en el linaje 5. Este linaje forma a la vez 5 sublinajes y es particularmente heterogéneo pues provienen de aislamientos de origen Europeo, Asiático, Sudafricano y Americano (Aldous *et al*, 2003).

En el Perú, generalmente se han realizado estudios sobre prevalencia de anticuerpos contra Paramyxovirus aviar tipo I (PMVA-1) en pavos de crianza

familiar en varias provincias de Lima, donde detectaron anticuerpos contra PMVA-1 en 38/388 muestras, determinando una prevalencia de 8,2 +/- 2,7 % (Santa Cruz 2010). Estos resultados son similares a los reportados en Lima el 2001, en donde se encontró una prevalencia de 9,9 +/- 3,2% en aves de crianza no tecnificada tales como los de riña y crianza casera; y 1,8 +/- 1,3% en aves de crianza tecnificada como pollos de carne, ponedoras comerciales y reproductoras (Ferrer, 2005). Asimismo se han realizado monitoreos en aves silvestres para la detección del virus ENC; así, en el 2006 se logró aislar el paramyxovirus aviar tipo I en 3/297 muestras de aves silvestres, reportando una prevalencia de 1,32% donde sugieren que es producido por cepas vENC de tipo lentogénico (Gherzi 2011).

En un estudio realizado en 860 aves silvestres en Lima, no se detectó anticuerpos contra el virus ENC, aun cuando no se encontró evidencia serológica de infección; si se aisló el virus ENC en 3/298 muestras de heces procedentes de aves silvestres costeras, sugiriendo ser un virus de baja patogenicidad (Icochea 2007).

En Perú se han reportado brotes principalmente en aves de pelea y traspatio producido por cepas de NC altamente virulentas, con tasas de morbilidad y mortalidad hasta 96,88% y tasa de letalidad hasta 100% (OIE, 2008). Tales indicadores han sido descritos por virus altamente virulentas del genotipo VII que circulan en África, Asia y Medio Oriente (Susta, 2010).

En el país, dentro del grupo de aves de crianza no tecnificada, las aves de riña representan el mayor grupo de riesgo para la diseminación de la enfermedad por su constante movilización, contacto con otras aves en coliseos, práctica de intercambio entre criadores y por falta de vacunación o presentar una inadecuada inmunización, deficiente a nula bioseguridad, animales de diferentes edades; y crianza de diferentes especies. Por ello, probablemente estas aves de pelea son no solo el principal reservorio, sino también el principal diseminador del virus (Icochea, 2007).

Este trabajo sugiere que los virus ENC virulentos de Perú aislados entre 2009 y 2011 de aves de traspatio y pelea han estado circulando aproximadamente 20 años, pues estos aislados presentan 98% similitud de secuencia con la cepa APECK92173 aislado en Perú en 1992 (Figura 10).

Todos los aislamientos del virus ENC virulentos en el país, proceden principalmente de aves de traspatio y pelea, lo cual representa una constante amenaza para las industria avícola, siendo necesario mantener estrictas medidas de bioseguridad y programas de vacunación, tanto en la industria avícola como en aves

de traspatio y pelea. Asimismo, es necesario tomar medidas oportunas de prevención y control de la enfermedad.

A pesar del gran potencial de los datos de las secuencias evaluadas en las investigaciones epizootiológicas, la información de la distribución geográfica de los genotipos epizoóticos es extremadamente escasa e inadecuada para elaborar un estudio epidemiológico (Lomniczi *et al*, 1998).

La caracterización constante de cepas que circulan en Perú permitirá evaluar alguna variación eventual en cuanto a la patogenicidad para las aves domésticas y así evaluar los cambios en campo, anticiparnos a nuevos brotes y desarrollar medidas adecuadas de prevención y control.

La evaluación de la evolución de los virus de Perú y otros países vecinos ayudará en los esfuerzos de vigilancia y detección temprana del virus ENC de alta patogenicidad, sin embargo, debido a la escasa información sobre estudios de la ENC en los países de la región dificulta y limita los análisis que entreguen antecedentes del origen y evolución del virus en poblaciones aviares de la región.

El presente estudio constituye la base para seguir estudios epidemiológicos del virus ENC utilizando técnicas de biología molecular y bioinformática. Este tipo de estudios permitirán tomar medidas oportunas y una mejor vigilancia epidemiológica.

VI. CONCLUSIONES

1. Las cepas del virus ENC detectadas por RT-PCR provienen de Ayacucho, Ancash, Arequipa, Cajamarca, La Libertad, Piura, Tacna y Ucayali.
2. Todos los virus ENC de Perú pertenecen a la clase II y a los genotipos I, II y VII. Los virus ENC virulentos pertenecen al genotipo VII y las cepas de baja virulencia corresponden al genotipo I y II.
3. Todos los aislamientos del virus ENC virulentos del país proceden de aves de traspatio y riña y los de baja virulencia proceden de aves de traspatio y granjas comerciales.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abdul-Aziz TA, Arp LH. Pathology of the trachea in turkeys exposed by aerosol to lentogenic strains of Newcastle disease virus. *Avian Dis* 1983; 27:1002-1011.
2. Aldous EW & Alexander DJ. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathology* 2001;30:117-128.
3. Aldous EW, Mynn JK, Banks J, Alexander DJ. 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* 2003; 32: 239-256.
4. Alexander DJ. Avian paramyxoviruses. 1980. *Vet. Bull.* 50:737-752
5. Alexander DJ: Newcastle disease diagnosis. In *Newcastle Disease*. Edited by Alexander DJ. Boston:Kluwer Academic Publishers; 1988:147-160.
6. Alexander, DJ. Newcastle Disease In: *A Laboratory Manual for the Isolation of Avian Pathogens*. 3rd ed. H.G. Purchase, L.H. Arp., C.H. Domermuth and I.E. Pearson, eds. The American Association of Avian Pathologists, Collage Station, Texas, pp. 114-120, 1989a.
7. Alexander DJ, Manvell RJ, Collins MS, Brockman SJ, Westbury HA, I. Morgan y FJ Austin. Characterization of paramyxoviruses isolated from penguins in Antarctica and Sub-Antarctica during 1976-1979. 1989b. *Arch. Virol.* 109: 135-143.
8. Alexander, DJ. Newcastle Disease and other Paramyxovirus Infection In: *Diseases of poultry*, 9th ed. Chap. 19. B.W. Calneak, H.J. Barnes, W.M. Reid, And H.W. Yoder, Jr. Eds. The Iowa State University Press, Ames, Iowa. 1991. Pp. 496-512.
9. Alexander DJ. Newcastle disease in countries of the European Union. *Avian Pathol* 1995; 24: 3-10.
10. Alexander DJ, Manvell RJ, Lowings JP, Frost KM, Collins MS, Russell PH, Smith JE. Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathol* 1997; 26: 399- 418

11. Alexander DJ. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses. In: A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens, ed. Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, et al, 4th ed., pp. 156-163. 1998. American Association of Avian Pathologists, Kenneth Square, IA.
12. Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*. 2000. 19:443-462.
13. Alexander DJ, Gough RE: Newcastle disease, other avian paramyxoviruses and pneumovirus infections. In *Diseases of Poultry*. 11th edition. Edited by Saif YM, Barnes HJ, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Swayne DE: Iowa State University Press USA;2003a:63-569.
14. Alexander DJ. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses and pneumovirus infection. In: *Disease of poultry*, ed. Shaif YM, Barnes HJ, Glisson JR, et al, 12th ed. 2003b. pp 75-100. Blackwell, Oxford, UK.
15. Alexander, DJ & Senne DA. Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections. In: Saif YM, Fadly Am, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE (Eds), *Diseases of Poultry*. Iowa State University Press, Ames, 2008a:p.75-141
16. Alexander DJ & Senne DA. Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviruses. In: *A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*, Dofour-Zavala L. (Editor in Chief) Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E., Reed W.M. Woolcock P.R., 4th ed., American Association of Avian Pathologists, Athens, G.A, 2008b. 135-141.
17. Alexander DJ: Newcastle disease. Chapter 2.3.1.4. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris, France: OIE, the World Organisation for Animal Health; 2009:576-589.
18. Alexander DJ. Ecology and epidemiology of Newcastle disease. In: Capua I, Alexander DJ (Eds.), *Avian Influenza and Newcastle Disease, a Field and Laboratory Manual*. Springer-Verlag, Italy 2009, pp 19-26
19. Animal Science. 2003. Enfermedad de Newcastle virulenta. Disponible en: <http://animalscience.ucdavis.edu/Avian/CDFANewcastlespanish.pdf>.

20. Barton JT, Bickford AA, Cooper GL, Charlton BR & Cardona CJ. Avian Paramyxovirus type 1 infections in racing pigeons in California. I. Clinical Signs, Pathology and Serology. *Avian Disease*. 1992. 36:463-468.
21. Bassler HA, Flood SJA, Livak KJ, Marmaro J, Knorr R, Batt CA. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. 61(10),3724-3728.
22. Batt CA. Molecular diagnostic for dairy-borne pathogens symposium: molecular probes – theory and application. *J. Dairy Sci.* 1997. 80,220-229.
23. Berinstein A, Seal BS, Zanetti F, Kaloghlian A,G. Segade and E. Carrillo. Newcastle disease virus surveillance in Argentina: use of reverse transcription- polymerase chain reaction and sequencing for molecular typification. *Avian Diseases*, 1999. 43(4):792-797.
24. Bogoyavlenskiy A, Berezin V, Prilipov A, Usachev E, Lyapina O, Korotetskiy I, Zaitceva I, Asanova S, Kydyrmanov A, Daulbaeva K, et al. Newcastle disease outbreaks in Kazakhstan and Kyrgyzstan during 1998, 2000,2001, 2003,2004 y 2005 were caused by viruses of the genotypes VIIb and VIIId. *Virus Genes* 2009. 39, 94-101.
25. Brown C, King DJ, Seal BS. Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. *Vet Pathol* 1999. 36:125-132.
26. Brown, I; Alexander D. Newcastle disease. En: II Seminario Internacional Influenza Aviar y Enfermedad de Newcastle “Estandarización de criterios sanitarios para el comercio” ALA-OIE. 2003. 13-15 Agosto. Lima-Perú
27. Carrión A, Icochea E, Falcón N. Seroprevalencia del virus de la Enfermedad de Newcastle en aves silvestres del orden *Columbiformes* en Baños de Boza, distrito de Aucallama, provincia de Huaraz. *Rev. Inv. Vet. Perú* 2000. 11(1):88-91.
28. Carter GR, Wise DJ, Flores EF. Paramyxoviridae. En: A Concise Review of Veterinary Virology. International Veterinary Information Services, Ithaca, Nueva York 2005. (www.ivis.org Documento N° A2418.0905)
29. Cattoli G, Fusaro A, Monne I, Molia S, LE Menach A, Maregeya B, Nhare A, Bangana I, Maina AG, Kofei JN, Thiam H, Bezeid OE, Salviato A, Nisi R, Terregino C. & Capua I. Emergence of a new genetic lineage of Newcastle

- disease virus in West and Central Africa- Implications for diagnosis and control. *Vet. Microbiol.* 2010. 142, 168-176.
30. Cattoli G, Susta L, C. Terregino and Corrie Brown. Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *Journal of veterinary Diagnostic Investigation* 2011. 23(4) 637-656.
 31. Chang P, Icochea E; Alba M. Detección de anticuerpos contra el virus de la Enfermedad de Newcastle en aves silvestres *Paseriformes* y *Columbiformes* en la provincia de Chancay. *Rev.Inv.Vet. Perú* 1999. 10(2): 79-81.
 32. Commission of the European Communities. Council directive 92/66/EEC of 14th July 1992 introducing Community measures for the control of Newcastle disease. *Official Journal of the European Communities.* 1992. L260, 1-20.
 33. Creelan JL, Graham DA y SJ Mccullough. Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. 2002. *Avian Pathol.*, 31 (5), 493-499.
 34. Czegledi A, Herczeg J, Hadjiev G, Doumanova L, Wehmann E, Lomniczi B. The occurrence of five major Newcastle disease virus genotypes (II,IV,V,VI and VIIb) in Bulgaria between 1959 and 1996. *Epidemiol.Infect.*2002. 129,679-688.
 35. Czegledi A, Kovacs G, Lomniczi B. Phylodinamics of Newcastle disease virus genotypes. En: 14^o World Veterinary Poultry Cobgress 22-26 August. Istanbul-Turkey 2005; 365.
 36. Czegledi A, Ujvari D, Somogyi E, Wehmann E, Werner O y B Lomniczi. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. 2006. *Virus Res.* 120,36-48.
 37. de Leeuw OS, Hartog L, Koch G, Peeters BP. Effect of fusión protein cleavage site mutations on virulence of Newcastle disease virus: non-virulent cleavage site mutants revert to virulence after one passage in chicken brain. *J. Gen. Virol.* 2003. 84, 475-484.
 38. de Leeuw OS, Koch G, Hartog L, Ravenshorst, Peeters BP. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein. *J.Gen.Virol.* 2005. 86, 1759-1769.

39. Erickson GA, Brugh M, Beard CW. Viscerotropic velogenic Newcastle-disease in pigeons-clinical disease and immunization. *Avian Dis* 1980. 24:257-267.
40. Gerlach, H. Disease etiologies: Viruses. En: *Avian Medicine: Principles and applications*. Section five. B.W. Ritchie; G.J. Harrison; L. R. Harrison (eds.). Florida, Wingers Publishing Inc. 1994. p. 920-929.
41. Ghersi B. 2011. Presencia del virus de la enfermedad de Newcastle en la aves silvestres de los humedales de puerto viejo. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Fac. Medicina Veterinaria.- Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima- Perú.
42. Gilardi K, Lowenstine LJ, Gilardi JD. A survey for selected viral chlamydial and parasitic diseases in wild dusky-headed parakeets (*Aratinga weddelli*) and tui parakeets (*Brotogeris sanctihomae*) in Perú. *Journal of Wildlife Disease*. 1995. 31(4):523-528.
43. Glickman RL, Sydall RJ, Iorio RM, Sheehan JP, Bratt MA. Quantitative basic residue requirements in the cleavage –activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *J.Virol*. 1988. 62 (1): 354-356.
44. Gould AR, Kattenbeldt JA, Selleck P., Hansson E., A.J. Della-Porta and H.A. Westbury. Virulent Newcastle disease in Australia: Molecular analysis of viruses isolated prior to and during the outbreak of 1998-2000. *Virus Res*. 2001.
45. Hanson RP. Newcastle Disease. En: S.B. Hitchner, CH Domermuth, HG Purchase, JE Williams. *Isolation and identification of avian pathogens*. Am. Assoc. Avian Pathol, Kennett Square. 1975. Pp. 160-173.
46. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996. 6,986-994.
47. Hernández, O. Caracterización del patotipo de dos aislados de la Enfermedad de Newcastle. Tesis, M.V. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile. 1996.
48. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA*.1991. 88,7276-7280.

49. Huang Y, et al. Genomic sequence of an isolate of Newcastle disease virus isolated from an outbreak in geese: a novel six nucleotide insertion in the non-coding region of the nucleoprotein gene. Brief Report. Archives of virology, 2004. 149 (7):p. 1445-1457.
50. Huang Z; Krishnamurthy S, Panda A; Samal S. Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. Journal of Virology, August 2003. 2003. p 8673-8685.vol 77, N°16.
51. Hung A, Medrano G, Vallenás G. Diagnóstico Molecular de Newcastle mediante RT-PCR y RFLP. Mundo avícola y porcino. 2004, 50:7-9.
52. Huovilainen A, Ek-Kommone C, Manvell R, Kinnunen L. Phylogenetic analysis of avian paramyxovirus 1 strains isolated in Finland. 2001. Arch. Virol. 146, 1775-1785.
53. Ibrahim MS, Lofts RS, Jahrling PB, Henchal EA, Weedn vW, Northrup MA, Belgrader P. Real-time microchip PCR for detecting single-base differences in viral and human DNA. Anal.Chem. 1998. 70, 2012-2017.
54. Icochea E. 2007. Interrelación entre aves silvestres y enfermedad de Newcastle. Tesis para optar el grado de Magister en Sanidad Animal. Fac. Medicina Veterinaria.- Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
55. Jestin V, Jestin A. Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by in vitro enzymatic amplification (PCR). 1991. Arch Virol 118:151-161.
56. Jordan F.T.W. Paramyxoviridae (Newcastle disease and Others). En: Poultry Diseases 1990. 121-136. 3rd Edition. Bailliere Tindal: Londres
57. Jorgensen PH, Handberg KJ, Ahrens P, Jansen HC, Manvell RJ, Alexander DJ. An Outbreak of Newcastle disease in free—living pheasants (*Phasianus colchicus*). J.Vet.B, Infect.Dis.Vet.Public Health 46, 1999. 381-387.
58. Kaleta EF and C. Baldauf. Newcastle disease in free-living and pet birds. In DJ Alexander (ed.). Newcastle Disease. Kluwer Academic Publishers: Boston, MA, 1988. 197-246.
59. Kaleta E F, Siegmann O, R Jank Ladwig & G. Glunder. Isolation and biological properties of virulent subpopulations from lentogenic Newcastle disease virus strains. Comp. IMM. Microbiol. Infect. Dis.1980. 2:485-496

60. Kant A, Koch G, Van Roozelaar DJ, et al. Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. *Avian Pathol* 1997. 26:837-849.
61. Kim LM, Afonso CL, Suarez DL. Effect of probe-site mismatches on detection of virulent Newcastle disease viruses using a fusión-gene real-time reverse transcription polymerase chain reaction test. *J Vet Diagn Invest* 2006. 18:519-528.
62. Kim LM, King DJ, Curry PE, Suarez DL, Swayne DE, Stallknecht DE, Slemmons RD, Pedersen JC, Senne DA, Winker K., et al. Phylogenetic diversity among low virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to poultry- origin isolates. *J. Virol* 2007a; 81: 12641-12653
63. Kim LM, et al; 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*, 2007b. 45(4):p. 1310-4.
64. Kim LM, Suarez DL, Afonso CL. Detection of a broad range of class I and II Newcastle disease viruses using multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J Vet Diagn Invest*, 2008a. 20(4):p. 414-425.
65. Kinde H, Hullinger PJ, Charlton B. The isolation of exotic Newcastle Disease (END) virus from nonpoultry avian species associated with the epidemic of END in chickens in southern California: 2002-2003. *Avian Dis*, 2005. 49 (2): p. 195-8.
66. King D J. Newcastle Disease virus passage in MDBK cells as an aid in detection of a virulent subpopulation. *Avian Dis*.1993;37:961-969
67. King D. Enfermedad de Newcastle en : XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura por la Alimentación del Futuro. APA-ALA del 21-24 de Setiembre, Lima, Perú 1999; Pgs 56-61
68. King DJ, Seal BS. Biological and molecular characterization of Newcastle disease virus isolates from surveillance of live bird markets in the northeastern United States, *Avian Dis*. 1997; 41:683-689.
69. Kotani T, Odagiri Y, Nakamura J, Horiuchi T. Pathological changes of tracheal mucosa in chickens infected with lentogenic Newcastle disease virus. *Avian Dis* 1987; 31:-:491-497.

70. Lamb R, Collins PL, Kolakofsky D, et al. The negative sense single stranded RNA viruses. En: Virus taxonomy, ed. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al., pp. 607-738. 2005. Elsevier Academic, San Diego, CA.
71. Lamb RA, Parks GD. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. En Fields Virology. 5th edition. Edited by Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. Philadelphia, PA:Lippincott Williams & Wilkins 2007;1449-1496.
72. Lister SA, Alexander DJ, Hogg RA. Evidence for the presence of avian paramyxovirus type 1 in feral pigeons in England and Wales. *Vet Rec* 1986; 118:476-479.
73. Liu XF, et al. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001. *Arch Virol*, 2003; 148 (7):p.1387-1403.
74. Liu, X; Cao, Y. Newcastle disease virus evolution: multiple genetic lineages and virulence variation with adaptation in different host species. En: 14th World Veterinary Poultry Congress. 22-26 August. Istanbul-Turkey; 2005; Pgs: 150-151.
75. Liu H, Wang Z, Wang Y, et al. Characterization of Newcastle disease virus isolated from waterfowl in China. *Avian Dis.* 2008; 52:150-155
76. Locke DP, Sellers HS, Crawford JM, Schultz-Cherry S, King DJ, Meinersmann RJ, Seal BS. Newcastle disease virus phosphoprotein gene analysis and transcriptional editing in avian cells. *Virus Res* 2000. 69, 55-68.
77. Lomniczi B, Wehmann E, Herczeg J, Ballagi Pordany A, Kaleta EF, Werner O, Meulemans G, Jorgensen PH, Mante AP, Gielkens AL, Capua I & Damoser J. Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Archives of Virology*, 1998, 143, 49-64.
78. Marin MC, Villegas P, Bennett JD, Seal BS. Virus characterization and sequence of the fusion protein gene cleavage site of recent Newcastle disease virus field isolates from the southeastern United States and Puerto Rico. *Avian Dis.* 1996; 40:382-390
79. Mebatsion T; Verstegen S; De Vaan L; Romer-Oberdorfer A; Schrier C. A. A recombinant Newcastle disease virus with low-level V protein expression is

- immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos. *Journal of Virology* 2001; 75(1):420-428.
80. Miller PJ, Afonso CL, Spackman E, Scott MA, Pedersen JC, Senne DA, Brown JD, Fuller CM, Uhart MM, Karesh WB, Brown IH, Alexander DJ y Swayne DE. Evidence for a New Avian Paramyxovirus Serotype 10 detected in Rockhopper penguins from the Falkland Islands. *J. Virol.*, 2010a ;84 (21), 11496-11504.
 81. Miller PJ, Decanini EL, Afonso CL. Newcastle Disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infect Genet Evol* 2010b; 10(1): 26-35
 82. Miller PJ, et al. Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus. *Virology* 2009; 391(1): 64-72
 83. Moreno V, García A, Mathieu C. Caracterización molecular y patogenicidad del virus de la enfermedad de Newcastle (ENC) aislado en cormoranes. Chile, 2007. *Boletín Veterinario Oficial*, BVO N°9, 2009.
 84. Nagai Y, H D Klenk & R Rott. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 1976. 72:494-509
 85. Nanthakumar T, Kataria AK, Tiwari AK, Butchaiah G y JM Kataria. Pathotyping of Newcastle disease viruses by RT-PCR and restriction enzyme analysis. *Vet. Res. Commun.*, 2000, 24, 275-286.
 86. National Veterinary Services Laboratories. Real time RT-PCR for detection of virulent Newcastle disease virus in clinical samples. United State Department of Agriculture (USDA)- Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS). SOP-AV-1505.03
 87. OIE, 2006. Newcastle disease. In *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Chapter 2.1.15. World Organization for Animal Health, ed., Paris, France.
 88. OIE, 2008. Newcastle disease. In *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 6th ed., pp.576-589. OIE, Paris, France.
 89. OIE, 2009. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: mammals, birds and bees*. Biological Standards Commission Volume, 576-589 .
 90. OIE, 2012. *Information O.A.H. Disease timelines: Newcastle disease*.

91. Park M, García-Sastre A, Cros J, Basler C, Palese P. Newcastle disease virus V protein is a determinant of host range restriction. *Journal of Virology*. 2003; 77(17):9522-9532.
92. Pearson JE, Senne DA, Alexander DJ, Taylor WD, Peterson LA, Russell PH: Characterization of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus-1) isolated from pigeons. *Avian Dis* 1987; 31:105-111.
93. Peeters B, De Leeuw O, Koch G, Gielkens A. Rescue of Newcastle disease virus from cloned c DNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *Journal of Virology* 1999; 73(6): 5001-5009.
94. Perozo F, Merino R, Afonso CL, P. Villegas & N. Calderón. Biological and phylogenetic characterization of virulent Newcastle disease virus circulating in Mexico. *Avian disease* 52:472-479, 2008.
95. Perozo RM, Afonso CL, R. Fernández and F. Rojo. *Genotype VII velogenic viscerotropic Venezuelan Newcastle disease virus isolate: Live (AvinewR) and killed (Gallimune NDR) vaccination. In AVMA.2010. Atlanta, GA.*
96. Perozo F, Marcano R, Afonso CL. Biological and phylogenetic characterization of a genotype VII Newcastle disease virus from Venezuela: efficacy of field vaccination. *J Clin Microbiol*. 2012, 50(4):1204-8.
97. Philipps L, Navaes O, Fernández L. La neumoencefalitis aviar en el Perú. *Rev Inst Nac Biol Animal*. 1951; 2:31-51.
98. Rosenberger JK, Klopp S, Krauss WC. Characterization of Newcastle disease viruses isolated from migratory waterfowl in the Atlantic flyway. *Avian Dis*. 1975, 19:142-149.
99. Rott R. Molecular basis of infectivity and pathogenicity of myxoviruses. *Arch Virol* 59:285-298. 1979.
100. Rue, CA, et al. Evolutionary Changes Affecting Rapid Diagnostic of 2008 Newcastle Disease Viruses Isolated from Double-Crested Cormorants. *J Clin Microbiology*. 2010.
101. Sanidad Animal, Argentina 2002. Argentina, el último foco de enfermedad de newcastle fue registrado en octubre de 1987. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/sanidad/new.htm>.
102. Santa Cruz F. 2010. Prevalencia de anticuerpos contra paramyxovirus aviar tipo 1 en pavos de crianza familiar de las provincias de Lima, Huaral, Huaura

- y Barranca". Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario. Fac. Medicina Veterinaria.- Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima- Perú.
103. Seal BS, King DJ, Meinersmann RJ. Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Virus Res* 2000; 66:1-11.
 104. Seal, B.S. *Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates. Phylogenetic relationships among the Paramyxovirinae based on attachment glycoprotein sequences.* *Functional and Integrative Genomics* 2004;4:p.246-257.
 105. Seal BS, Wise MG, Pedersen JC, Senne DA, Alvarez R, Scott MS, King DJ, Yu Q, Kapczynski DR. Genomic sequences of low-virulence avian paramyxovirus-1 (Newcastle disease virus) isolates obtained from live-bird markets in North America not related to commonly utilized commercial vaccine strains. *Vet. Microbiol.* 2005, 106: 7-16.
 106. Shengqing Y, Kishida N, Ito H, Kida K, Otsuki Y, Kawaoka and T. Ito. Generation of velogenic Newcastle disease viruses from a nonpathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens. *Virology* 2002;301: 206-211.
 107. Snoeck CJ, Ducatez MF, Owoade AA, Faleke OO, Alkali BR, Tahita MC, Tarnagda Z, Ouedraogo JB, Maikano I, Mbah PO, et al. Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms. *Arch. Virol.* 2009; 154, 47-54.
 108. Susta L, Miller PJ, CL Afonso & CC Brown. Clinicopathological Characterization in Poultry of Three strains of Newcastle disease virus isolated from recent outbreak. *Vet Pathol.* 2010; 48(2) 349-360.
 109. Takakuwa H, Ito T, Takada A, Okazaki K, Kida H. Potentially virulent Newcastle disease viruses are maintained in migratory waterfowl populations. *Jpn. J.Vet. Res.* 1998; 45:207-215.
 110. Terregino C, Capua I: Conventional diagnosis of Newcastle disease virus infection. In *avian Influenza and Newcastle Disease*. Edited by Capua I, Alexander DJ. Milan:vSpringer-Verlag 2009;123-125.

111. Utterback, W.W. and J.H. Schwartz, Epizootiology of velogenic viscerotropic Newcastle disease in southern California, 1971-1973. *J Am Vet Med Assoc* 1973; 163(9): p.1080-8.
112. Vindevogel HaJPD. Panzootic Newcastle disease virus in pigeon. In: Newcastle disease, ed. Alexander DJ. Kluwer Academic, Boston, MA 1988; pp.184-196
113. Wakamatsu N, et al. Experimental pathogenesis for chickens, turkeys and pigeons of exotic Newcastle disease virus from an outbreak in California during 2002-2003. *Vet Pathol* 2006; 43(6): p. 925-33.
114. Wang Z, et al. Genotyping of Newcastle disease viruses isolated from 2002 to 2004 in China. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1081: p. 228-39.
115. Wan H, Chen L, Wu L, Liu X. Newcastle disease in geese: natural occurrence and experimental infection. *Avian Pathol* 2004; 33:216-221
116. Wise MG, Suarez DL, Seal BS et al. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2004; 42:329-338.
117. Yu L, et al. Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39 (10):p.3512-3519.
118. Zanetti F, Berinstein A, Pereda A, O. Taboga and E. Carrillo. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Newcastle Disease virus isolates from healthy wild birds. *Avian diseases* 2005;49:546-550
119. Zou J, Shan S, Yao N, Gong Z. Complete genome sequence and biological characterization of a novel goose paramyxovirus-SF02 isolated in China. *Virus Genes* 2005; 30:13-21

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. RELACIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDOS Y FLUIDOS PARA DIAGNOSTICO DE VENC

Código Muestra	Tipo de muestra	Año de Aislamiento	Procedencia	Tipo de explotación
R1601	Tráquea, pulmón, fluido alantoideo	2009	Tacna	pelea
R1602	Tráquea, Fluido alantoideo	2009	Ayacucho	pelea
R1603	proventrículo, fluido alantoideo	2009	Ancash	pelea
R1604	Tonsilas cecales, Fluido alantoideo	2010	Cajamarca	traspatio
R1605	Proventrículo, fluido alantoideo	2010	Cajamarca	pelea
R1606	Pulmón, Fluido alantoideo	2010	La Libertad	pelea
R1608	Hisopado traqueal, Fluido alantoideo	2010	Ucayali	traspatio
R1609	Hisopado traqueal, Fluido alantoideo	2010	Ucayali	traspatio
R1610	Hisopado traqueal, Fluido alantoideo	2010	Ucayali	traspatio
R1611	Hisopado traqueal, Fluido alantoideo	2010	Ucayali	traspatio
R1613	Hisopado traqueal, fluido alantoideo	2011	Piura	traspatio
R1615	Pulmón, Fluido alantoideo	2011	Arequipa	granja comercial
R1619	Tráquea, fluido alantoideo	2011	Arequipa	granja comercial

ANEXO 2: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ARN DE MUESTRAS DE TEJIDOS

(RNeasy Mini Kit, QIAGEN)

1. Colocar hasta 20 mg del tejido y/u órgano en un tubo de micro centrífuga.
2. Agregar 350 μ L de Buffer RLT y 3.5 μ L de 2-Mercaptoetanol, asegurándose de que el tejido este completamente inmerso en el buffer, y desintegrar el tejido con ayuda de una varilla homogenizadora. Homogenizar en vortex durante 30 seg.
3. Centrifugar la mezcla a 14 000 rpm durante 1 minuto y luego transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifuga.
4. Agregar 350 μ L de etanol 70% y mezclar por pipeteo.
5. Transferir hasta 700 μ L de la muestra, incluyendo algún precipitado que pueda haberse formado, a una columna spin y centrifugar a 10 000 rpm durante 15 segundos. Descartar el contenido del tubo y reusar el tubo de colección.
6. Agregar 700 μ L de Buffer RW1a la columna spin y centrifugar a 10 000 rpm durante 15 segundos. Descartar el contenido del tubo y reusar el tubo de colección.
7. Agregar 500 μ L de Buffer RPE a la columna spin y centrifugar a 10 000 rpm durante 15 segundos. Descartar el contenido del tubo y reusar el tubo de colección.
8. Agregar 500 μ L de Buffer RPE a la columna spin y centrifugar a 10 000 rpm durante 2 minutos.
9. **Opcional:** Descartar el tubo de colección y colocar la columna spin en un nuevo tubo de colección (proveído en el kit). Centrifugar a 14 000 rpm durante 1 minuto.
10. Descartar el tubo de colección y colocar la columna spin en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL (proveído en el kit).
11. Agregar 30-50 μ L de Agua PCR libre de RNasa directamente a la membrana de la columna spin. Centrifugar a 10 000 rpm durante 1 minuto para eluir el ARN.
12. Eliminar la columna spin y almacenar el ARN colectado a -20°C.

ANEXO 3: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ARN DE MUESTRAS LÍQUIDAS

(QIAamp Viral RNA Mini Kit -QIAGEN)

1. Agregar 560 μ L de Buffer AVL y 5.6 μ L (Carrier RNA+ AVE) a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL.
2. Agregar 140 μ L de plasma, suero, sobrenadante de cultivo de células ó fluido corporal libre de células al tubo microcentrifuga conteniendo los buffers.
3. Mezclar en vortex durante 15 seg e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
4. Agregar 500 μ L de etanol (96-100%) a la muestra y mezclar con vortex durante 15 seg.
5. Transferir 630 μ L de lisado a la columna spin y centrifugar a 8 000 rpm durante 1 minuto. Descartar el tubo de colección y colocar la columna spin en uno nuevo proveído en el kit.
6. Repetir paso 5.
7. Agregar 500 μ L de Buffer AW1 a la columna spin y centrifugar a 8 000 rpm durante 1 minuto. Descartar el tubo de colección y colocar la columna spin en uno nuevo proveído en el Kit.
8. Agregar 500 μ L de Buffer AW2 a la columna y centrifugar a máxima velocidad (14 000 rpm) durante 3 minutos.
9. **Opcional:** Descartar el tubo de colección y colocar la columna spin en uno nuevo tubo de colección (proveído en el kit). Centrifugar a 14 000 rpm durante 1 minuto.
10. Descartar el tubo de colección y colocar la columna spin en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL (No proveído en el kit).
11. Agregar 30 μ L de Buffer AVE a la columna spin, incubar durante 1 minuto a temperatura de ambiente y centrifugar a 8 000 rpm durante 1 minuto.
12. Repetir paso 11.
13. Eliminar la columna spin y almacenar el ARN colectado entre -20° C y -70° C.