

CARACTERIZACION Y SECUENCIACION DEL SITIO DE CLIVAJE DEL GEN DE LA PROTEINA DE FUSION DEL VIRUS DE NEWCASTLE

*Claudia Marín M., M.V., MSc.; P. Villegas N., M.V., Ph.D.;
B. Seal, Ph.D.; J. Bennett, Ph.D.**

RESUMEN

Nueve cepas del virus de Newcastle obtenidas de Puerto Rico, Georgia, Alabama, Mississippi y Texas fueron analizadas para determinar patogenicidad *in vivo*, propiedades biológicas (hemoaglutinación de eritrocitos de diferentes especies) y secuenciamiento (aminoácidos y ADN). Cuatro cepas aglutinaron eritrocitos de bovino, mientras que ninguna aglutinó eritrocitos de equino. Para todas las cepas se obtuvieron índices de patogenicidad intracerebral entre 0 y 0.3 y un índice de patogenicidad intravenoso de cero. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa - transcriptasa reversa, todas las cepas presentaron una secuencia en el sitio de clivaje del gen de la proteína de fusión comparable con la reportada en la literatura para cepas lentogénicas de Newcastle. Sin embargo, la secuencia de los nucleótidos no fue 100% similar a las cepas B1 o La Sota, indicando la existencia de heterogeneidad genética entre las cepas de campo de esta enfermedad.

Palabras Claves Adicionales: Reacción en cadena de la polimerasa - transcriptasa reversa, secuencia.

* Programa de Sanidad Animal, ICA-CEISA. Av. Eldorado No. 42-42, Bogotá, D.C.; Poultry Disease Research Center, Univ. of Georgia, Athens, GA, USA; Southeastern Poultry Disease Center, USDA, Athens, GA, USA; Southeastern Poultry Disease Center, USDA, Athens, GA, USA.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION AND SEQUENCE OF THE FUSION PROTEIN GEN CLEAVAGE SITE OF NEWCASTLE VIRUS

Nine Newcastle disease virus (NDV) isolates obtained from Puerto Rico, Georgia, Alabama, Mississippi and Texas were analyzed for *in vivo* pathogenicity, biological properties (hemagglutination of mammalian erythrocytes), and for sequence variation (aminoacids and sense RNA of the fusion protein cleavage site). Intracerebral pathogenicity index values ranged from 0 to 0.3 were obtained, and the intravenous pathogenicity index for all isolates was zero. Four isolates hemagglutinated bovine erythrocytes, while no hemagglutination was observed using equine erythrocytes. By direct sequencing of reverse transcription polymerase chain reaction products, all the isolates had the predicted fusion cleavage sequence comparable to lentogenic NDV strains, indicating that genetic heterogeneity occurs among lentogenic field isolates of NDV.

Additional Index Words: Polimerase chain reaction-reverse transcriptase, sequence.

La enfermedad de Newcastle es una infección altamente contagiosa que ataca a muchas especies aviares. El virus de Newcastle produce una enfermedad que varía en severidad clínica y en transmisibilidad (Alexander, 1990). Las cepas lentogénicas, especialmente en pollos adultos pueden causar o no signos clínicos mínimos, mientras que la enfermedad producida por cepas mesogénicas puede ocasionar una mortalidad hasta del 25%, y las tasas de mortalidad por infección con virus velogénico son tan altas que pueden llegar al 100% (Fenner *et al.*, 1987). El virus de Newcastle es el prototipo del género Paramyxovirus (PMV), de la familia *Paramyxoviridae* y es clasificado como del serotipo aviar PMV-1. El genoma de este virus es de una sola banda de ARN, de polaridad negativa y tiene un peso molecular de 5.2-5.7 X 10⁶ daltons, lo cual es aproximadamente 15 kilobases de ARN genómico (Alexander, 1990; Fenner *et al.*, 1987; Peeples, 1988; Samson, 1988). El genoma codifica 6 proteínas que en el orden 3' -5' están colocadas de la siguiente manera: NP - proteína de la nucleocápside; P - proteína fosforilada asociada a la nucleocápside; M - proteína de la matriz; F - proteína de fusión; HN - proteína hemoaglutinina-neuraminidasa y la L - polimerasa RNA dirigida por RNA (Chambers *et al.*, 1986). La proteína de fusión está relacionada con la patogenicidad del virus de Newcastle.

Aun cuando existe un gran número de cepas de Newcastle, sólo se han detectado diferencias antigénicas menores con las pruebas serológicas de rutina. Estas diferencias no evitan que una cepa proporcione inmunidad protectora cruzada contra todas las cepas. Por esta razón, una vacuna desarrollada contra un patotipo usualmente protege contra virus heterólogo (Cosset *et al.*, 1991). La vacunación contra Newcastle ha sido utilizada satisfactoriamente desde 1940 (Beard y Hanson, 1984). Las vacunas más exitosas son preparadas con virus vivo a partir de cepas lentogénicas o mesogénicas seleccionadas y propagadas en huevos embrionados. Estas vacunas actúan bien cuando son administradas correctamente, pero surgen problemas en el campo cuando se presta insuficiente atención a factores tales como: edad de las aves, ruta de inoculación, cepa del virus y serología de seguimiento (Taylor *et al.*, 1990). Las cepas La Sota, B1, F y V4 son cepas lentogénicas que han sido desarrolladas como vacunas. De ellas, las más utilizadas son la B1 y La Sota. Ambas cepas se replican en el tracto respiratorio induciendo inmunidad tanto local como humoral. Las vacunas con la cepa La Sota generalmente son más virulentas e inducen una respuesta inmune más fuerte que las vacunas con la cepa B1.

Recientemente, en los Estados Unidos se ha desarrollado una vacuna a partir de una cepa no-patógena, la VG/GA, aislada de pavos comerciales en el estado de Georgia, la cual se encontró que se replicaba tanto en el tracto respiratorio como en el tracto gastrointestinal de pollos. Produce una respuesta inmune similar a la inducida por la cepa B1, pero sin reacciones respiratorias reconocibles (Glisson y Kleven, 1993). Según estos autores, en la industria avícola la vacunación contra Newcastle es una práctica mundial común. Debido a que existen diferencias entre las cepas, manifestadas en su habilidad para causar enfermedad en pollos y de replicarse en diferentes tejidos, es de presumir que puede haber heterogeneidad entre las cepas. Por esta razón es importante determinar si existe esta heterogeneidad e identificar los tipos de cepas de donde se derivaron los aislamientos. El propósito de este trabajo fue determinar tanto la patogenicidad y la secuencia del sitio de clivaje del gen de la proteína de fusión de recientes aislamientos del virus de Newcastle, como la posible heterogeneidad en la secuencia de nucleótidos entre ellas, y compararlas con cepas vacunales conocidas.

MATERIALES Y METODOS

Cepas y Protocolos de Infección

Los aislamientos fueron obtenidos de muestras enviadas para aislamiento viral al Poultry Disease Research Center (PDRC) en la ciudad de Athens, Georgia, durante 1990 y 1992 (Tabla 1). Después de recibidas, las muestras se

inocularon en embriones de pollo del tipo Leghorn libres de patógenos específicos (SPF), obtenidos en Sunrise Farms (Catskill, NY) y se hicieron pruebas de hemoaglutinación rápida en placa con el fluido alantoideo (Beard y Wilkes, 1985; Villegas, 1993). Las muestras positivas se sometieron a la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, utilizando antisuero de referencia de Newcastle. La presencia viral fue confirmada mediante microscopía electrónica (Beard et al., 1984; Beard y Wilkes, 1985).

TABLA 1
Aislamientos de campo de la enfermedad de Newcastle utilizados.

Aislamiento	Tipo de explotación	Edad (días)
PMV1/ckn/GA/92/1111	Reproductoras	29
PMV1/ckn/GA/92/842	Pollos de engorde	50
PMV1/ckn/AL/92/492	Reproductoras	desconocido
PMV1/ckn/TX/92/856	Pollos de engorde	28
PMV1/ckn/GA/92/1183	Pollos de engorde	28
PMV1/ckn/PR/90/2095	Pollos de engorde	50
PMV1/ckn/PR/90/922	Pollos de engorde	50
PMV1/ckn/MS/90/440	Pollos de engorde	4
PMV1/ckn/GA/92/812	Pollos de engorde	47

Para la titulación de los diferentes aislamientos se inocularon diluciones dobles en base 10 en embriones SPF vía del saco corioalantoideo (CAS). Se descarta cualquier mortalidad ocurrida durante las primeras 24 horas. Luego de siete días de incubación, los embriones restantes fueron refrigerados a 4°C por varias horas antes de obtener el fluido alantoideo. La fórmula de Reed y Muench (1938) se utilizó para calcular la dilución final del 50% de cada aislamiento. Una prueba de hemoaglutinación rápida en placa se realizó con todos los fluidos alantoideos para confirmar la presencia del virus (Beard y Hanson, 1984; Villegas, 1993).

Como controles de los experimentos *in vivo* se utilizaron las cepas Kansas-Manhattan y el clon-30 de la cepa La Sota (Intervet America, Millsboro,

Delaware). Para las comparaciones de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se utilizaron las siguientes cepas vacunales de Newcastle: Uniblen (B1 tipo B1; Sanofi Animal Health, Overland Park, Kansas); Newblen (B1 tipo La Sota; Sanofi Animal Health, Overland Park, Kansas); Vineland B1 tipo B1 (Vineland Laboratories, Vineland, New Jersey); Vineland B1 tipo La Sota (Vineland Laboratories, Vineland, New Jersey); Select B1 tipo B1 (Select Laboratories, Gainesville, Georgia) e Intervet B1 tipo B1 (Intervet America; Millsboro, Delaware). Las secuencias de nucleótidos del gen de la proteína de fusión de varias cepas mesogénicas y velogénicas fueron tomadas de secuencias reportadas en la literatura: Texas GB, Kansas-Manhattan, Beaudette C., Italy Milano, Ulster, Australia Victoria y Hertz-33 (Toyoda *et al.*, 1987).

Identificación de los Aislamientos

Para la prueba de inhibición de la hemoaglutinación se empleó el método beta (β) de acuerdo con la técnica descrita por Beard y Wilkes (1985), utilizando concentraciones variables de suero y empleando 10 unidades hemoaglutinantes de antígeno. Paralelamente se examinaron sueros negativos y positivos conocidos, junto con un control de glóbulos rojos. La dilución del suero osciló entre 1:5 y 1:640.

Para la aglutinación de eritrocitos de mamíferos se utilizaron glóbulos rojos de bovino y equino. Estos fueron lavados y centrifugados tres veces utilizando PBS, y luego preparados a una concentración de 0.5% en el mismo diluyente. Posteriormente se llevaron a cabo las pruebas de hemoaglutinación estándar (Alexander, 1991; Villegas, 1993).

Patotipificación

El índice de patogenicidad intracerebral (IPIIC) se determinó utilizando 11 grupos de 10 pollitos de un día de edad provenientes de huevos SPF. Los pollitos recibieron inoculación intracerebral con 0.05 mL de fluido alantoideo infectivo fresco de cada uno de los aislamientos y de la cepa Kansas-Manhattan. Un grupo fue inoculado con solución salina como grupo control. Las aves fueron observadas diariamente durante ocho días y su calificación fue promediada. En esta prueba un ave normal recibe una calificación de 0, mientras que para las aves enfermas la calificación es de 1, y de 2 para las aves muertas (Alexander, 1988 y 1989).

El índice de patogenicidad intravenoso (IPIV) se estableció inoculando, por vía intravenosa, 10 grupos de 10 pollos SPF de seis semanas, con 0.1 mL de fluido alantoideo infectivo no diluido de cada uno de los aislamientos y de la cepa Kansas-Manhattan; un grupo adicional fue inoculado con solución salina

como grupo control. Todos los grupos se mantuvieron en unidades de aislamiento bajo presión positiva y alimentados con una dieta estándar y agua a voluntad. Luego de la inoculación, las aves fueron observadas diariamente por espacio de 10 días y calificadas de la siguiente manera: aves sin signos, 0; aves enfermas, 1; aves paralizadas, 2 y aves muertas, 3 (Alexander, 1988 y 1989).

Al final de cada prueba, las aves vivas fueron sangradas y el suero utilizado para determinar los títulos de anticuerpos IH mediante la prueba ELISA en forma individual; luego se calcularon los promedios geométricos por grupo (GMT). La prueba ELISA se realizó con un kit comercial de IDEXX (Portland, Maine), diluyendo el suero a 1:500.

Purificación de ARN y Prueba de Transcriptasa Reversa-Reacción en cadena de la Polimerasa (TR-PCR)

De 1mL de fluido alantoideo infectivo se extrajo ARN utilizando un buffer que contenía 4M de Isotiocianato de Guanidina, 25mM de Citrato de Sodio, 50mM de 2-Mercaptoetanol y 0.5% de Sarkosil, y se procesó como lo describe la literatura consultada (Chomczynski y Sacchi, 1987). El ARN purificado fue resuspendido en 60µl de agua estéril libre de nucleasa y congelado a -70°C. Se utilizó aproximadamente 1µg de ARN purificado en cada reacción de TR-PCR.

Los iniciadores (primers) fueron diseñados (PRIMER2, Scientific and Educational Software, Stateline, Pennsylvania) con base en la comparación de secuencias publicadas en los nucleótidos de la proteína de fusión, como se indica a continuación:

Iniciador en sentido positivo F328-CCT TGG TGA ITC TAT CCG IAG G.

Iniciador en sentido negativo F581- CTG CCA CTG CTA GTT GIG ATA TAC C.

Las reacciones de TR-PCR en un solo tubo (Lewis et al., 1992) fueron realizadas en volúmenes de 50µl que contenían los siguientes componentes por muestra: 5µl 10Xbuffer II, 3µl MgCl₂, 4µl de dNTP, 0.25ml inhibidor de ARN, 0.25µl de taq polimerasa, 0.125µl de transcriptasa reversa, 0.5µg de ARN, 2µl de iniciador en sentido positivo y suficiente agua destilada para llevar el volumen a 50µl. Las reacciones de TR-PCR fueron incubadas para la síntesis de cADN a 45°C durante 60 min. y luego denaturadas a 95°C por 5 min. Se realizaron 25 ciclos de denaturación a 94°C por 1 min., hibridación del iniciador a 60°C por 1 min., extensión del iniciador a 72°C con una extensión final a 72°C por 10 min. la cual fue completada utilizando tres unidades de polimerasa Amplitaq (Perkin-Elmer, Norway, Connecticut) (Saiki et al., 1985).

Luego de la amplificación se detectó un producto de PCR de aproximadamente 254 pares de bases, mediante electroforesis en gel de agarosa.

Secuencia Directa de Nucleótidos del Producto Amplificado y Análisis de Secuencia

Se utilizó un secuenciador automático* (Prober *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1986) para el secuenciamiento directo de nucleótidos del producto obtenido mediante el PCR y el método dideoxy (Sanger *et al.*, 1977), utilizando los iniciadores de la TR-PCR. La edición de la secuencia de nucleótidos, el análisis y predicción de la secuencia de aminoácidos y la predicción de la estructura de proteínas fueron completados por computador utilizando el programa GeneWorks^{2,3} (Intelligenetics, Mountain View, CA). Las secuencias de nucleótidos fueron enviadas a GenBank donde se les asignaron los siguientes números de acceso: 842 como U13964; 856 como U13965; 922 como U13966; VG/GA como U13967; 1111 como U13968; 1183 como U13969; 2095 como U13970; 440 como U13971; 492 como U13972 y la 812 como U13973.

RESULTADOS Y DISCUSION

Titulación de los Aislamientos, Aglutinación de Eritrocitos de Mamíferos y Patotipificación

Los aislamientos de campo de Newcastle 492; 856; 922; 440 y la cepa vacunal La Sota aglutinaron eritrocitos de bovino, no así las cinco cepas restantes ni la cepa B1 (Tabla 2). Ninguno de los aislamientos aglutinó eritrocitos de equino, mientras que la cepa La Sota sí. Ninguno de los aislamientos de Georgia aglutinaron eritrocitos de bovino; situación similar ocurrió con el comportamiento de la cepa B1. Los títulos de diferentes aislamientos oscilaron entre $10^{7.8}$ y $10^{8.5}$ EID₅₀/mL, lo cual indica que los aislamientos se replicaban bien en huevos embrionados y que la falta de aglutinación en eritrocitos no se debía al bajo título del virus. Como se observa en la Tabla 2, el IPIC de todos los aislamientos osciló entre 0 y 0.3 y el IPIV obtenido para todos los aislamientos fue de 0. Los índices reportados en la literatura para las cepas vacunales La Sota, B1 (Alexander, 1988) y VG/GA (Pardo, 1991) fueron también de 0.

Los títulos de anticuerpos medidos por IH y ELISA se presentan en la Tabla 3. Los títulos obtenidos con la prueba IH en las aves inoculadas para hacer las pruebas

* Applied Biosystems Incorporated (ABI).

TABLA 2
Características biológicas de los aislamientos examinados.

Aislamiento	GRB ¹	GRE ²	EID ₅₀ /mL	IPIC	IPIV
1111	-	-	10 ^{7.9}	0.0	0
842	-	-	10 ^{8.2}	0.1	0
492	+	-	10 ^{8.2}	0.0	0
856	+	-	10 ^{8.5}	0.0	0
1183	-	-	10 ^{7.8}	0.2	0
2095	-	-	10 ^{8.2}	0.3	0
922	+	-	10 ^{8.3}	0.3	0
440	+	-	10 ^{8.0}	0.0	0
812	-	-	10 ^{7.8}	0.3	0
La Sota	+	-	10 ^{8.0}	0.4	0
B1	-	-	10 ^{8.0}	0.2	0
KM			10 ^{9.1}	2.0	2.9
VG/GA	-	-	10 ^{8.7}	-	0

1. Aglutinación de glóbulos rojos de bovino.
 2. Aglutinación de glóbulos rojos de equino.

de IPIC e IPIV fueron altos, excepto el grupo inoculado con la cepa 1111. Los títulos de anticuerpos medidos por ELISA resultaron bajos en los grupos inoculados para el IPIC, pero altos en los grupos inoculados para el IPIV.

TR-PCR, Secuencia de Nucleótidos y de Aminoácidos del Sitio de Clivaje de la Proteína de Fusión

Luego de la amplificación, un producto de PCR de aproximadamente 254 pares de bases fue detectado por electroforesis en gel de agarosa. Esta secuencia codifica para los residuos de aminoácidos en las posiciones 95 a 178 de la proteína de fusión. Todos los aislamientos tuvieron la secuencia predicha del sitio de clivaje de fusión¹⁰⁹ SGGGRQGRL¹¹⁷ comparable al de aquellas cepas lentogénicas indicadas en la literatura. Este dato contrasta con la secuencia de aminoácidos de la cepa velogénica Texas GB y la cepa mesogénica Kimber, la cual es¹⁰⁹ SGGRRQKRF¹¹⁷. Todos los aislamientos examinados mostraron la presencia de glicina (G) en las posiciones 114 y 115, mientras que las cepas virulentas en estas posiciones tenían una arginina (R) y una lisina (K) (Figura 1).

TABLA 3
Títulos de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle por IH y ELISA
de sueros de las aves infectadas con los aislamientos de campo de Newcastle.

Aislamiento	IH ^a	ELISA ^a	CV ^b	IH ^c	ELISA ^c	CV ^b
1111	6.96	2242	46.5	8.0	2704	64
842	59.3	464	94.6	168.9	11263	15
492	138.2	1072	71.1	222.9	20922	15
856	181.0	1834	60.4	137.2	12181	4.6
1183	128.0	349	113.0	181.0	19750	20.3
2095	210.0	731	60.8	186.8	10722	21.7
922	111.4	513	143.9	104.3	8891	33.4
440	181.0	867	74.5	no se hizo	no se hizo	no se hizo
812	138.2	398	99.6	104.0	18711	27.6
control neg.	<2	245	122.0	<2	38	144.3

a: Las aves tenían 10 días de edad cuando se hizo la serología. Los títulos se expresan en promedios geométricos.

b: Coeficiente de variación de los resultados de ELISA.

c: Las aves tenían 59 días de edad cuando se hizo la serología. Los títulos se expresan en promedios geométricos.

Varias diferencias fueron detectadas en otras partes de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión, pero no en el sitio de clivaje. Por ejemplo, la sustitución del ácido aspártico (D) por ácido glutámico (E) en la posición 99 en el aislamiento 440 es similar a las cepas B1 y Texas, mientras que el ácido glutámico (E) permanece constante en los otros aislamientos, similar a la secuencia de la cepa Kimber. La sustitución de valina (V) por glicina (G) en la posición 120 es único para el aislamiento 856, al igual que la sustitución en la posición 132 de ácido aspártico (D) por alanina (A) en el aislamiento 922 y el de prolina (P) por alanina (A) en la posición 137 en el aislamiento 842 (Figura 1).

Relaciones Filogenéticas entre Aislamientos

Tomando como base la comparación de las secuencias de aminoácidos, existen dos brazos mayores (Figura 2) que contienen todas las cepas lentogénicas y otro que contiene las cepas mesogénicas y velogénicas conocidas. También los aislamientos de campo forman un grupo con las cepas B1 y La

BIBLIOTECA AGRICOLA
DE COLOMBIA

Tex/48-PFC-transl seq	..D.....R..	K.F.....
KimberFC-transl seqR..	K.F.....
856FC-transl seqV..
922FC-transl seqD..
VGGAFc-transl seqK..
B1/47-PFC-transl seq	..D.....
440FC-transl seq	..D.....
2095FC-transl seq
492FC-transl seq
1183FC-transl seq
812FC-transl seq
1111FC-transl seqD
842FC-transl seqP..
Consensus	05	LGESIRRIQE	<u>SVTTSGGGRQ</u>	<u>GRLIGAIIGG</u>	VALGVATAAQ	ITAAAALIQA 144

FIGURA 1. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del sitio de clivaje del gen de la proteína de fusión de cepas conocidas y aislamientos de campo recientes. El sitio de clivaje se encuentra subrayado. Los puntos denotan similitudes, mientras que la diferencia en la secuencia de aminoácidos se presenta como su símbolo de una sola letra de IUPAC.

Sota, separado de las cepas D26, Queensland y Ulster (datos no mostrados). Para extender las relaciones un poco más, las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron alineadas y sometidas a análisis filogenético. Se observa que los aislamientos de campo se separan como un grupo y que hay una clara demarcación entre el grupo de cepas lentogénicas y el grupo de cepas mesogénicas/velogénicas. Sin embargo, ninguno de los aislamientos de campo compartió el 100% de similitud de nucleótidos con las cepas vacunales B1 o La Sota, aun cuando los aislamientos 812; 492; 1183 y 2095 compartieron la misma secuencia de nucleótidos. No parece existir una relación entre la localización geográfica (Tabla 1) y la similitud entre los aislamientos (Figura 3).

Debe tenerse en cuenta que seis vacunas comerciales secuenciadas por estos métodos tenían un 98% de similitud con el virus de origen, ya fuese B1 o La Sota. Además, se hicieron árboles filogenéticos con topología similar a los ilustrados en las Figuras 2 y 3 (datos no mostrados).

Entre las cepas de campo estudiadas se hallaron diferencias en la hemaglutinación, las cuales no se correlacionaron estrictamente con la localización geográfica. Ninguno de los aislamientos aglutinó eritrocitos de equino, como sí lo hizo la cepa La Sota. Una posible razón explicativa es que esta cepa rara vez es utilizada para vacunar pollos de engorde en los Estados Unidos.

El IPIC y el IPIV de todos los aislamientos fueron similares a los índices reportados en la literatura para cepas lentogénicas. El índice de 0.3 para el IPIC de los aislamientos 2095, 922 y 812 se asemejó más al índice reportado para la cepa La Sota, mientras que los demás presentaron índices más similares a la cepa B1 (Alexander, 1988). El aislamiento 812 del estado de Georgia tuvo un IPIC más parecido a La Sota, aun cuando no aglutinó glóbulos rojos de bovino, como sí lo hizo esta cepa.

Los resultados obtenidos con las pruebas de IH y ELISA (Tabla 3) en los grupos inoculados para el IPIC y el IPIV revelaron que a una edad temprana la prueba de IH puede ser más eficiente en la detección de anticuerpos que la prueba de ELISA. Sin embargo, en aves mayores ambas pruebas detectaron altos niveles de anticuerpos. También se observó que el aislamiento 1111 presentó los títulos más bajos en ambas pruebas, pero sin otras diferencias significativas entre este aislamiento y los otros; así que fue considerado como un hallazgo normal.

Algún grado de heterogeneidad en propiedades biológicas parece ocurrir aun entre cepas lentogénicas. Debido a que la unión y la aglutinación son funciones de la proteína HN (Morrison y Portner, 1991), puede también haber

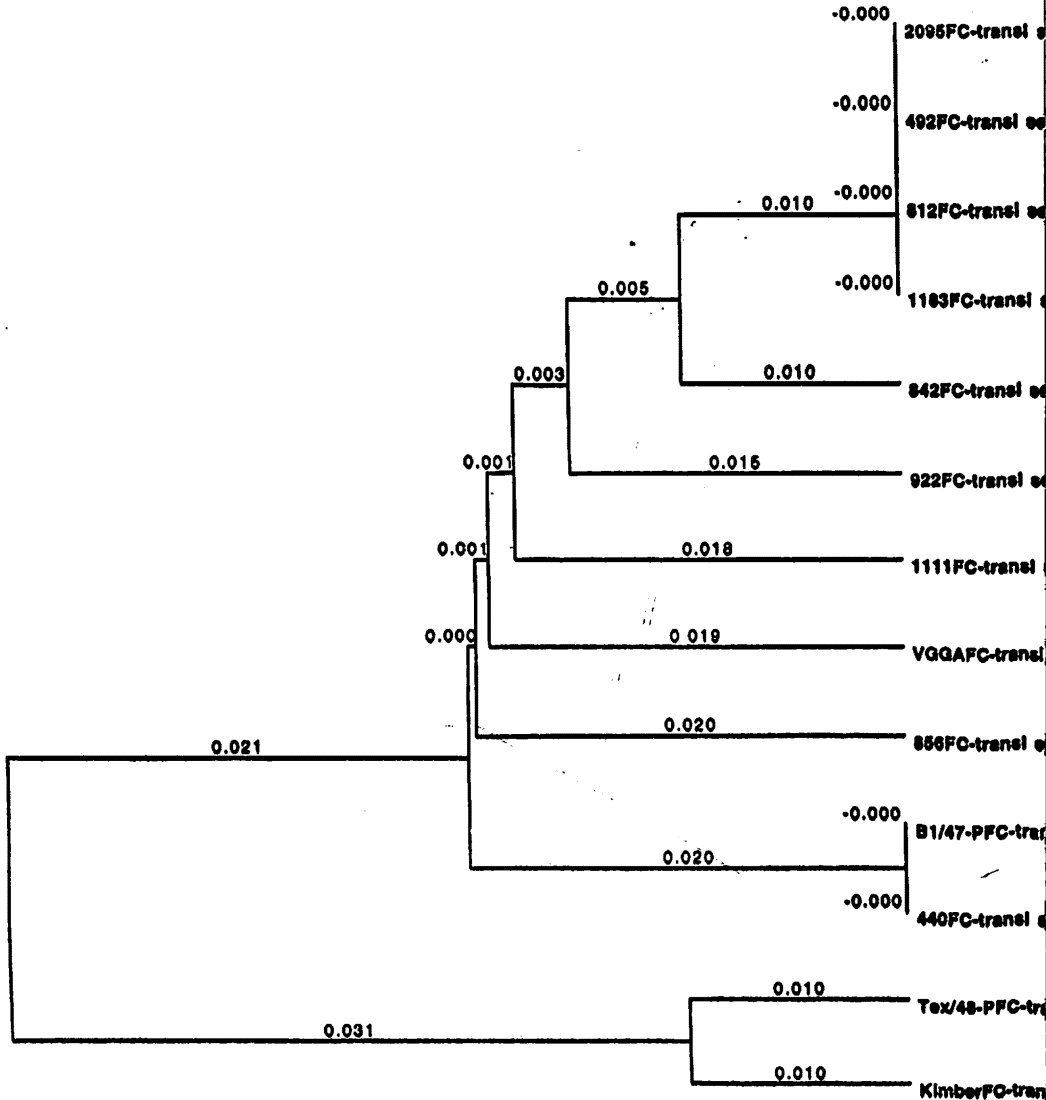


FIGURA 2. Relación filogenética de cepas conocidas de Newcastle y de los aislamientos de campo. El análisis se basa en la secuencia de aminoácidos en el sitio de clivaje de la proteína de fusión (FC). Los números representan el porcentaje de diferencia de aminoácidos que ocurren en una sola posición.

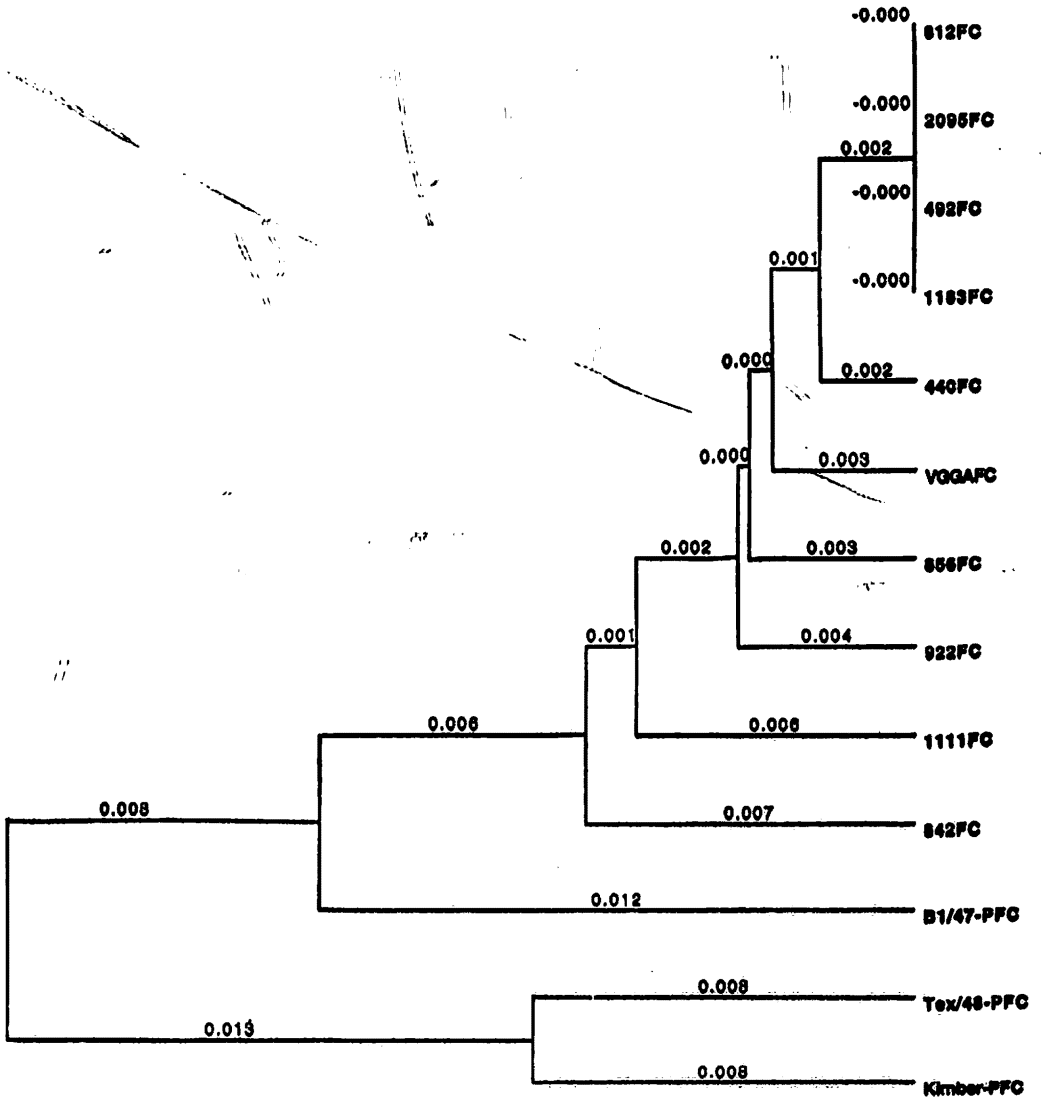


FIGURA 3. Relación filogenética de cepas conocidas de Newcastle y de los aislamientos de campo basada en la secuencia de nucleótidos de los productos amplificados del gen de la proteína de fusión. Los números representan el porcentaje de diferencia de aminoácidos que ocurren en una sola posición.

algo de heterogeneidad en la secuencia del gen de esta proteína y su proteína subsecuente.

Luego de completadas las pruebas de patogenicidad y la secuencia del sitio de clivaje de la proteína de fusión en los aislamientos examinados en este estudio, se demostró que todos eran lentogénicos. Sin embargo, los aislamientos examinados no compartieron 100% de similitud en su secuencia de nucleótidos con las cepas vacunales B1 o La Sota, indicando que existe heterogeneidad genética entre cepas de campo del virus de Newcastle. Esto hace muy difícil poder determinar la cepa específica de procedencia, y si ésta es una cepa vacunal o no.

La proteína de fusión se relaciona con la patogenicidad del virus de Newcastle y su función es fusionar las membranas viral y celular, y penetrar la partícula viral. Además, es sintetizada como un precursor no funcional (Fo) y requiere de clivaje por proteasas del huésped para poder funcionar (Morrison y Portner, 1991; Nagai *et al.*, 1976).

La susceptibilidad de la Fo a una proteasa en los tejidos del ave, y por ende su virulencia, ha sido relacionada con la presencia de dos pares de aminoácidos básicos en los cinco que preceden al sitio de clivaje y el carbón terminal del polipéptido F2, y a una fenilalanina en el nitrógeno terminal de la F1 (Alexander, 1990; Nagai *et al.*, 1976). Las cepas lentogénicas tienen dos aminoácidos básicos solos en la región correspondiente a la F2 y una leucina en el nitrógeno terminal de la F1 (Collins *et al.*, 1993).

Las cepas virulentas pueden distinguirse de cepas de baja virulencia y de cepas avirulentas determinando la secuencia en los sitios de clivaje de sus proteínas Fo (Glickman *et al.*, 1988; Hodder *et al.*, 1993 y 1994; Lewis *et al.*, 1992; Toyoda *et al.*, 1987). Las diferencias entre los aislamientos de campo y las cepas lentogénicas consistieron en cambios en algunos de los aminoácidos que rodean el sitio de clivaje de la proteína de fusión, pero presentaron la conformación característica de todas las cepas lentogénicas. Las cepas de baja virulencia poseen una sola arginina (R) en la posición 116, donde ocurre el clivaje y una R o lisina (K) en la posición 113, mientras que las virulentas todas poseen una R en la posición 115 y una R en las posiciones 112 y 113. Los virus de baja virulencia poseen una leucina (L) en la posición 117, mientras que los virulentos poseen en este sitio una fenilalanina (F) (Alexander, 1988). Todos los aislamientos presentaron una L en la posición 117, una R en la posición 116 y otra R en la posición 113 (Collins *et al.*, 1993; Millar *et al.*, 1988). Los datos confirmaron la observación de que todas las cepas lentogénicas poseen una F en la posición 117, el nitrógeno terminal de la F1, mientras que los virus

de baja virulencia tienen en este sitio una L (Collins *et al.*, 1993; Millar y Emmerson, 1988; Morrison *et al.*, 1993; Toyoda *et al.*, 1987).

El análisis filogenético de la secuencia de aminoácidos del sitio de clivaje de la proteína de fusión demostró una alta relación entre los nueve aislamientos y las cepas B1 y La Sota. Los aislamientos de campo tal como fueron alineados en la Figura 1 y organizados filogenéticamente en la Figura 2, demostraron que existe heterogeneidad a nivel de la secuencia de aminoácidos al ser comparados entre ellos y con las cepas vacunales.

Aun cuando todos los aislamientos examinados tenían un sitio de clivaje de la proteína de fusión indicativo de cepas lentogénicas, hubo heterogeneidad en la secuencia de nucleótidos en el gen de la proteína de fusión de los virus. Esto quiere decir que ninguno de los aislamientos de campo tenía una secuencia de nucleótidos exactamente similar a las cepas vacunales B1 o a La Sota, contrario a los resultados obtenidos de virus vacunales comerciales. Por otra parte, la heterogeneidad genética surge entre cepas de campo de Newcastle presumiblemente como resultado de virus vacunales que se replican en aves infectadas en forma persistente o por infecciones recurrentes entre las aves de un lote determinado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alexander, D. J. 1988. Newcastle disease diagnosis. *In*: Newcastle Disease. D. J. Alexander, ed. Kluwer Academic Press. pp. 147-160.
2. Alexander, D. J. 1989. Newcastle disease. *In*: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 3rd ed. H. G. Purchase, L. H. Arp, C. H. Domermuth y J. E. Pearson, eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. pp. 114-120.
3. Alexander, D. J. 1990. Avian paramyxoviridae - Recent developments. *Vet. Microbiol.* 23: 103-114.
4. Alexander, D. J. 1991. Newcastle disease and other Paramyxovirus. *In*: Diseases of poultry. 9th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, W. M. Reid y H. W. Yoder, Jr., eds. Iowa State University Press. Ames, Iowa. pp. 496-519.
5. Beard, C. W.; Hanson, R. P. 1984. Newcastle disease. *In*: Diseases of poultry. 8th ed. M. S. Hofstad; H. J. Barnes; B. W. Calnek; W. M. Reid y H. W. Yoder, eds. Iowa State University Press. Ames, Iowa. pp. 452-470.

6. **Beard, C. W.; Wilkes, W. J.** 1986. A comparison of Newcastle disease hemagglutination-inhibition test results from diagnostic laboratories in the Southeastern United States. *Avian Dis.* **29**: 1048-1056.
7. **Chambers, P.; Millar, N.; Emmerson, P.** 1986. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* **67**: 2685-2694.
8. **Chomczynski, P.; Sacchi, N.** 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
9. **Collins, M. S.; Bashiruddin, J. B.; Alexander, D. J.** 1993. Deduced aminoacid sequence at the fusion cleavage site of Newcastle disease virus showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Arch. of Virol.* **128**: 363-370.
10. **Cosset, F.; Bouquet, P. A.; Drynda, A.; Chebloune, Y.; Rey-Senelonge, A.; Kohen, G.; Nigon, V.; Desmettre, P.; Verdier, G.** 1991. NDV vaccine based on immunization with avian cells expressing the NDV hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. *Virology* **185**: 862-866.
11. **Fenner, F.; Bachman, P. A.; Gibbs, E. P.; Murphy, F. A.; Studdert, M. J.; White, D. O.** 1987. Paramyxoviridae. *In: Veterinary virology.* Academic Press. pp. 485-496.
12. **Glickman, R.; Syddall, R.; Uorio, R.; Sheehan, J.; Bratt, M.** 1988. Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *J. Virol.* **62**: 354-356.
13. **Glisson, J. R.; Kleven, S. H.** 1993. Poultry vaccines. *In: Vaccines for veterinary applications.* A. R. Peters, ed. pp. 165-173.
14. **Hodder, A.; Selleck, P.; White, J.; Gorman, J.** 1993. Analysis of pathotype-specific structural features and cleavage activation of Newcastle disease virus membrane glycoproteins using antipeptide antibodies. *J. Gen. Virol.* **74**: 1081-1091.
15. **Hodder, A.; Liu, Z. J.; Selleck, P. W.; Corino, J. L.; Shiell, B. J.; Grix, D. J.; Morrow, C. J.; Gorman, J. J.** 1994. Characterization of field isolates of Newcastle disease virus using antipeptide antibodies. *Avian Dis.* **38**: 103-118.

16. Lewis, J. G.; Chang, G. J.; Lanciotti, R. S.; Trent, D. W. 1992. Direct sequencing of large flavivirus PCR products for analysis of genome variation and molecular epidemiological investigations. *J. Virol. Methods* **38**: 11-24.
17. Millar, N. S.; Chambers, P.; Emmerson, P. 1988. Nucleotide sequence of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein genes of Newcastle disease virus, strain Ulster: molecular basis for variations in pathogenicity between strains. *J. Gen. Virol.* **69**: 613-620.
18. Millar, N. S.; Emmerson, P. 1988. Molecular cloning and nucleotide sequencing of Newcastle disease virus. *In*: Newcastle disease. D. J. Alexander, ed. Kluwer Academic Publishers. pp. 79-97.
19. Morrison, T.; McQuain, C.; Sergel, T.; McGinnes, L.; Reitter, J. 1993. The role of the amino terminus of F1 of the Newcastle disease virus fusion protein in cleavage and fusion. *Virology* **193**: 997-1000.
20. Morrison, T.; Portner, A. 1991. Structure, function and intracellular processing of the glycoproteins of Paramyxoviridae. *In*: The Paramyxoviruses. D. W. Kingsbury, ed. Plenum Press, New York. pp. 348-382.
21. Nagai, Y.; Klenk, H.; Rott, R. 1976. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of NDV. *Virology* **72**: 494-508.
22. Pardo, M. C. 1991. Characterization of the lentogenic Newcastle disease virus strain VG/GA. master's Thesis. The Univ. of Georgia.
23. Peeples, M. 1988. Newcastle disease virus replication. *In*: Newcastle disease. D. J. Alexander, ed. Kluwer Academic Publishers. pp. 45-78.
24. Prober, J. M.; Trainor, G. L.; Dan, R. J.; Hobbs, F. W.; Robertson, C. W.; Zaqursky, R. J.; Cocuzza, A. J.; Jensen, M. A.; Burmeister, K. 1987. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* **238**: 336-341.
25. Reed, L. J.; Muench, H. 1938. A simple method for estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**: 493-496.
26. Saiki, R. K.; Scharf, F.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.

27. Samson, A. C. R. 1988. Virus structure. *In*: Newcastle disease. D. J. Alexander, ed. Kluwer Academic Publishers. pp. 23-44.
28. Sanger, F.; Nickles, S.; Carlson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467.
29. Smith, L.; Sanders, J.; Kaisers, R.; Hughes, P.; Dodd, C.; Conell, C.; Heiner, C.; Kent, S.; Hood, L. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**: 674-678.
30. Taylor, J.; Edbauer, C.; Rey-Senelonge, A.; Bouquet, J.; Norton, E.; Goebel, S.; Desmettre, P.; Paoletti, E. 1990. Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. *J. Virol.* **64**: 1441-1450.
31. Toyoda, T.; Sakaguchi, T.; Imai, K.; Inocencio, N.; Gotoh, B.; Hagamuchi, M.; Nagai, Y. 1987. Structural comparison of the cleavage activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of NDV. *Virology* **158**: 242-247.
32. Villegas, P. 1993. Laboratory manual. Avian virus diseases. College of Vet. Med. The Univ. of Georgia. pp. 10-15.