



Caracterización molecular y patogenicidad del virus de la enfermedad de Newcastle (ENC) aislado en cormoranes. Chile, 2007

Valentina Moreno, M.V.¹, valentina.moreno@sag.gob.cl

Alfonso García, M.V.¹, alfonso.garcia@sag.gob.cl

Christian Mathieu, M.V.¹, christian.mathieu@sag.gob.cl

Colaboradores

Marcela Aguilera, M.V.

Miriam Rojas, M.V.

Marcela Vásquez, T.L.

Resumen

En el año 2007 se reportaron diversos casos de morbilidad y mortandad en aves acuáticas en Chile, con presencia de signos neurológicos en cormoranes. Se realizó el aislamiento viral y detección viral por pruebas moleculares del virus de la enfermedad de Newcastle, provenientes de cormoranes.

Con el propósito de evaluar la virulencia de los aislamientos se analizó el índice de patogenicidad intracerebral. Los resultados indicaron que el virus aislado era mesogénico en pollos (IPIC: 1,16). Se amplificaron y secuenciaron las principales regiones funcionales del gen de la proteína de fusión F, para así realizar el análisis filogenético y determinar el patotipo. La secuencia del sitio de corte o clivaje de la proteína de fusión del virus aislado presentó múltiples aminoácidos básicos en las posiciones 112-116 KRQKR y fenilalanina en el residuo 117 del extremo N-terminal de la proteína F1 lo cual es característico de los aislamientos virulentos y velogénicos.

Además, se agrupó en la línea genética del genogrupo V, linaje 3, sublinaje 3c derivada de la panzootia de 1970 de origen de aves psitácidas de vida libre de América, cuyas ramas se dividen a virus en cormoranes de Norteamérica en 1990 y 1992. Presenta la sustitución R por G en la posición 110 lo que sería único y característico de los aislados del genotipo de cormoranes y en particular, posee mayor similitud con el virus Newcastle velogénico viscerotrópico cepa Trenque Lauquen aislado en Argentina durante un brote de 1970-1971, por lo cual la inferencia de su origen es un circulación endémica en Sudamérica en aves silvestres acuáticas desde los años 1970 a la fecha. Las diferencias de patogenicidad presentadas entre las pruebas *in vivo* para el modelo estándar de inoculación intracerebral en pollos, respecto a los signos neurológicos presentados en los cormoranes y los resultados de las pruebas moleculares del aislado, estarían determinadas por los factores asociados a la susceptibilidad o resistencia del huésped, el agente viral y factores ambientales. Sin embargo, a pesar de estas diferencias y definiciones, los aislados del virus de la enfermedad de Newcastle en estas especies de aves silvestres constituirían una potencial amenaza por el riesgo de transmisión y diseminación a la población avícola doméstica o comercial.

Palabras claves

Virus Newcastle, patotipo, Índice de Patogenicidad Intracerebral, proteína de fusión, RT-PCR, genotipo, filogenia.

¹ Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias, Unidad de Virología Pecuaria y Unidad de Biotecnología Agropecuaria. Lo Aguirre. Servicio Agrícola y Ganadero.

1. Introducción

La enfermedad de Newcastle (ENC) causa una de las enfermedades más graves en la avicultura comercial y está considerada como una enfermedad de la lista de la Organización Mundial de Salud Animal (OIE). El virus ha sido aislado desde una amplia variedad de especies de aves silvestres y domésticas en todo el mundo (Alexander, 1986; Seal, 1998). Las infecciones virales pueden variar desde signos inaparentes a severos dependiendo de factores del huésped y del virus. Es así, que puede dividirse en cinco patotipos basados en la severidad de la enfermedad en pollos y que según pruebas de patogenicidad se clasifican en altamente patógenas o virulentas de presentación velogénica viscerotrópica (Forma de Doyle) y velogénica neurotrópica (Forma de Beach, neuroencefalitis aviar); de moderada virulencia o mesogénicas (Forma Beaudette); apatógenas de baja virulencia, de presentación lentogénica o respiratoria (Forma de Hitchner) y asintomática-entérica (Alexander, 1997; Alexander 1998; Beard y Hanson, 1981).

El virus Newcastle disease (VNC) o Paramyxovirus Aviar 1 (APMV-1) está clasificado como un miembro de la familia Paramyxoviridae, orden Mononegavirales (Murphy *et al.*, 1995) de la subfamilia Paramyxovirinae, género *Avulavirus* (Mayo, 2002 a, b) el genoma de RNA es de hebra simple de 15kb con sentido negativo y contiene 6 genes en el orden 3'-NP-P-M-F-HN-L-5', que codifican para 6 proteínas (nucleoproteína, fosfoproteína, proteína de la matriz, proteína de fusión, proteína hemoaglutinina-neuraminidasa, proteína-polimerasa respectivamente (Yusoff y Siang Tan, 2001). La proteína de fusión (F) es sintetizada como un precursor inactivo F₀ cuya ruptura proteolítica en los residuos 116 y 117 genera dos polipéptidos, F₁ y F₂. La composición de aminoácidos del sitio de clivaje de la proteína de fusión (F) es el mayor determinante de la virulencia del virus (Peeters *et al.*, 1999; Wakamatsu, 2006), además, el análisis filogenético de la secuencia de F permite llevar a cabo los estudios de epidemiología molecular, predicción del patotipo y genotipificación (Seal, 1995; Aldous, 2003; Wakamatsu, 2006).

La ENC se define como una enfermedad notificable por la OIE en el caso de que el agente causal reúna uno de los siguientes criterios: que el virus posea un índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) en pollos (*Gallus gallus*) mayor a 0.7; o, presente múltiples aminoácidos básicos en el extremo C-terminal de la proteína F2 y fenilalanina en el residuo 117, que es el extremo N-terminal de la proteína F1 (OIE, 2004).

Las aves silvestres, especialmente las especies acuáticas, son consideradas más resistentes a la enfermedad y representarían un reservorio de virus (Kaleta, 1988; Kelleher, 1985). Sin embargo, se han descrito altas mortalidades por APMV-1 velogénicos neurotrópicos en cormoranes de doble cresta en Canadá y Estados Unidos en 1990 y 1992 (Heckert, 1996; Glasser, 1999) y se han aislado virus velogénicos viscerotrópicos desde cormoranes del brote de California de 1970 de origen psitácido (Seal, 1996); aislamientos en Canadá Québec el año 1975, del año 1992 hasta el año 2000, y en Florida EEUU el año 2002 (Weingartl, 2003; Allison, 2005). Así, se describe que la mayoría de las cepas virulentas de APMV-I infectan tanto loros y a aves domésticas, y además se ha aislado de aves silvestres en diferentes lugares del mundo (Alexander, 1997).

Chile es libre de la enfermedad de Newcastle desde 1975 y mantiene una vigilancia y un plan sistemático de vacunación a las aves domésticas y ponedoras. El 28 de junio de 2007 se efectuó una denuncia de mortalidad de aves silvestres marinas, principalmente en cormoranes tipo guanay (*Phalacrocorax bougainvillii*), en la costa de la VII región, Constitución Chile, con presentación de signología nerviosa, postulándose que su origen epidemiológico fuera endémico



o de procedencia de Norteamérica.

Éste corresponde al primer foco descrito de la enfermedad de Newcastle en aves silvestres marinas en nuestro país, en el cual el Servicio Agrícola y Ganadero llevó a cabo la detección y el diagnóstico. El objetivo de este estudio fue caracterizar a nivel molecular y patotipificar el aislado viral de Newcastle de cormoranes de Constitución, Chile en el año 2007 mediante la prueba Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), secuenciación, análisis del sitio de clivaje de la proteína de fusión, análisis filogenético y pruebas biológicas *in vivo* de índice de patogenicidad, para así finalmente determinar el patotipo y genotipo.

2. Material y métodos

Reporte del caso. El día 28 de junio fueron enviadas al laboratorio oficial del SAG siete aves: un pelicano (*Pelecanus thagus*), cinco guanayes (*Phalacrocorax bougainvillii*) y un piquero (*Sula variegata*), que habían sido colectados del sector costero de Constitución Chile.



Aislamiento viral a partir de tómulas. El aislamiento viral se realizó desde muestras de tómulas cloacales y traqueales, mediante inoculación y propagación embriones de pollos SPF de 9-10 días según procedimientos de referencia OIE (OIE, 2004).

El líquido alantoideo de los embriones muertos fue analizado para la presencia de actividad hemoaglutinante con glóbulos rojos de pollo al 1% y posterior confirmación de la detección del VNC mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación usando un antisuero de referencia policlonal de pollo para VNC (OIE, 2004).

Pruebas de Índices de Patogenicidad. El aislado viral fue inoculado vía intracerebral en pollitos de 1 día de acuerdo a los [procedimientos estándares de la OIE](#) (2004).

Extracción de RNA y RT-PCR desde tómulas. Para la extracción de RNA desde tómulas se utilizó el agente Trizol LS reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) y posteriormente el RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) o MagMAX™ AI/ND Viral RNA Isolation Kits (Ambion). Para la RT-PCR en un paso se empleó el Kit Onestep RT-PCR kit (Qiagen) y los oligonucleótidos para la amplificación parcial del gen de la proteína de fusión y el sitio de clivaje según lo descrito por Seal (1995); 5'-CCTTGGTGAITCTATCCGIAG-3' (sentido) 5'-CTGCCACTGCTAGTTGIGATAATCC-3' (antisentido), la concentración para la RT-PCR de una reacción de 25µl en un solo paso fue de 320µM dNTP's, 1X Buffer 5X Qiagen, 1.25 mM MgCl₂, 13 U de Inhibidor de Rnasa, 10 pmol de cada partidor y 1 ul de Enzima Qiagen. Las condiciones de termociclado para la transcripción y hotstart fueron de 50°C por 30 minutos y 95°C por 15 minutos respectivamente, y para la PCR 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, y una extensión final de 72°C por 7 minutos.

Secuenciación directa del producto de RT-PCR del gen de la proteína de fusión. Los productos del RT-PCR fueron purificados con el MinElute PCR Purification Kit (Qiagen#28006) y cuantificados por espectrofotometría usando el equipo NanoDrop® y posteriormente fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación del Depto. de Ecología de la Pontificia Universidad Católica usando el BigDye Terminator 3.1 y el secuenciador automático ABI 3100.

Análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos. La edición, el análisis de la secuencia de nucleótidos, el análisis de la secuencia deducida de aminoácidos y alineamientos fueron llevadas a cabo usando el Programa Bioedit. La identidad de la secuencia fue confirmada mediante comparación con la base de datos publicadas en Genbank, con el National Center for Biotechnology Information BLAST network server (Altschul, *et al.*, 1990).

Análisis Filogenético. El fragmento de 253 nucleótidos del gen F, que incluye el sitio de clivaje fue analizado para determinar las relaciones filogenéticas y construcción del árbol filogenético y dendograma con otros aislados de VNC publicados en Genbank usando el programa MEGA con el algoritmo neighbor-joining (Kumar, 2004; Tamura, 2007). Las secuencias de nucleótidos de los aislados de VNC, genotipos y patotipos de referencia empleados en el estudio de filogenia están descritos por Weingartl (2003), Seal (1995) (Tabla 1), Liu (2007), Kim (2007). Para el aislado Trenque Lauquen del brote de Argentina 1970-1971 [AY734534](#) , [AF100299](#) (Berinstein, 1999).

Números de acceso de las secuencias de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión del aislado de cormoranes de Chile fue remitida al Genbank, cuyo número de acceso asignado fue EU101697 (Newcastle disease virus isolate 7304 fusion protein gene, partial cds).

3. Resultados y discusión

La prueba de RT-PCR usada como prueba de screening o tamizaje con tómulas traqueales y cloacales detectó la presencia del virus Newcastle en las aves del tipo guanay o cormorán (Nº de protocolo SAG 7304), amplificando un producto de 253 pares de bases para la secuencia parcial del gen de la proteína de fusión. No se obtuvo amplificación para las otras especies de aves enviadas o remitidas al laboratorio en el caso inicial reportado; sin embargo, en posteriores envíos de muestras se detectaron casos positivos en la especie piquero (*Sula variegata*). La virulencia asociada a la secuencia aminoacídica de la proteína de fusión y la prueba de RT-PCR en conjunto con el secuenciamiento de nucleótidos poseen la ventaja en reducir el tiempo de resultados respecto a la evaluación de la patogenicidad en aves vivas (Seal *et al.*, 1995).

Adicionalmente, esta prueba es útil para determinar las relaciones epidemiológicas entre aislados. Usualmente, la prueba de RT-PCR es empleada en los virus amplificados en huevos embrionados de pollo, y puede ser realizada directamente en los tejidos de cormoranes (Kuiken, 1999) y en tómulas cloacales o traqueales, tal como lo demuestra el presente estudio.

El virus detectado por RT-PCR fue aislado en huevos embrionados de pollos SPF, con actividad hemoaglutinante y así fue confirmada su tipificación como Paramixovirus Aviar tipo I, aunque no en todas las muestras RT-PCR positivas se pudo aislar virus, dado que se consideró el criterio de aislamiento positivo con actividad hemoaglutinante. Es recomendable utilizar una prueba de tamizaje o screening que no esté basada o dependa sólo del aislamiento viral con actividad hemoaglutinante e inhibición de la hemoaglutinación, dado que se describe que algunos aislados de cormoranes pueden no presentar esta actividad o que el virus no pueda replicarse o esté inactivo (Kuiken, 1999). Además, la menor tasa de aislamiento viral puede subestimar la prevalencia de la infección, en algunos casos posiblemente debido a la interferencia de los anticuerpos con el aislamiento viral, o por el bajo título viral menor a los niveles detectables en las aves crónicamente afectadas que sobreviven (Wobeser *et al.*, 1993).

Los valores obtenidos para el IPIC fueron de 1.16 lo que corresponde a la clasificación de un cepa de patotipo mesogénico, o de virulencia moderada al ser inoculada en pollos (*Gallus gallus*). El método estándar internacional OIE clasifica como una cepa virulenta a los aislados con un valor IPIC en pollos mayor a 0,7. De acuerdo a la patotipificación molecular de Seal (1995), corresponde a un cepa velogénica virulenta, (Figura 1, pág. 7). Posee la secuencia de aminoácidos $_{109}\text{SRGKRQKR}/\text{FIG}_{119}$ en el sitio de clivaje de la proteína de fusión, con cuatro aminoácidos básicos, dos Lisinas (K_{112} , K_{115}) y dos Arginina (R_{113} , R_{116}) y fenilalanina (F_{117}).

En el alineamiento de las secuencias aminoacídicas (Figura 2, pág. 9) se observa que presenta la sustitución de R for G en la posición 110 que sería única para los aislados asociados a cormoranes desde 1990, pero su secuencia es similar a la secuencia de consenso $_{109}\text{SGGRRQKR}/\text{FIG}$ presente en la mayoría de los aislados NC velogénicos de los años 70, con la mayor similitud con el aislado de Trenque Lauquen de Argentina (1971). Además, no comparte la sustitución I por V en la posición 125 única para los aislados de cormoranes de Norteamérica de la epizootia de NC en cormoranes in 1990 and 1992 y anhuinga (Seal *et al.*, 1995; Heckert *et al.*, 1996) y no presenta la sustitución de V por I en residuo 118 común a los aislados de Norteamérica de cormoranes, de origen psitácido (Largo y Florida 80) y un aislado de pollo de un brote en California (Fontana), (Seal, 1996). Esto sugiere que el virus detectado en Chile en el año del 2007 de cormoranes ha estado circulando desde los años 70 en Sudamérica y que no se originaría de los linajes norteamericanos.

Así, los VNC emergentes desde los años 70 pertenecen a una población que se diseminó a nivel mundial de origen en aves de vida silvestre, y son los que están presentes en la actualidad. El análisis filogenético está graficado en las figuras 1 y 3 (pág. 7 y 10). El virus cormoran Chile 2007 se agrupa con los virus velogénicos del genotipo V, según la clasificación de Lomniczi (1998) y Czeglédi (2003), de origen de América Central y Sudamérica (Czeglédi, 2006). Los aislados de cormoranes de Norteamérica están en un subgrupo separado del subgrupo conformado por Trenque Lauquen y el aislado cormorán de Chile, por lo que sugerimos que el virus detectado en Chile podría representar un nuevo genotipo o un subtipo dentro del genotipo V derivado de la panzootia de 1970 junto con el virus Trenque Lauquen (Berinstein, 1999). (Figura 3, pág. 10).

De acuerdo a los estudios de epidemiología molecular de Aldous (2003), se agrupa en el linaje 3, sublinaje 3c compuesto por aislados derivados de la segunda panzootia ocurrida en 1970 (Alexander, 2001), el cual fue determinado por el comercio de aves exóticas. En la raíz de este grupo están dos aislados de origen psitácido obtenido en Estados Unidos en el año 1970-1971 (NY 70181/70 y CA1085/71) radiando de este punto hay tres ramas, una constituida por los virus de cormoranes aislados entre 1975 y 1997, una segunda de origen europeo y la tercera rama que contiene patos de Tanzania. (Aldous, 2003). La estructura de ramificación del dendograma permite la reconstrucción de las relaciones evolutivas y la dinámica de transmisión, que es confirmada por las sustituciones de aminoácidos que es interpretada como caracteres derivados compartidos (Lomniczi, 1998) (Figura 2 y 3, pág. 9 y 10).

Las diferencias de patogenicidad presentadas entre las pruebas *in vivo* o modelo estándar de inoculación intracerebral en pollos, con la presentación clínica neurológica en los cormoranes en Chile y las pruebas moleculares del aislado estarían determinadas por los factores asociados a la susceptibilidad o resistencia del huésped, el agente viral y los factores ambientales. Los signos clínicos neurológicos han sido también descritos en los brotes en cormoranes de Norteamérica con aislados considerados neurotrópicos, velogénicos, o mesogénicos (Banerjee, 1994, Clavijo, 2001, Glaser, 1999, Heckert, 1996, Kuiken, 1998, Kuiken, 1999, Meteyer, 1997). También se ha sugerido que los virus aislados de huéspedes diferentes a los de la avicultura comercial pueden necesitar alguna adaptación del huésped a

pollos antes de que puedan expresar su completa virulencia (Collins, 1994). Así, cualquier variación presentada en la patotipificación por diversas fuentes (huésped, virus, ambiente) pueden complicar la evaluación de la virulencia (King, 1996). Además, existen limitantes y no es posible realizar las pruebas de patogenicidad *in vivo* en estas aves silvestres.

Sin embargo, a pesar de estas diferencias y definiciones, los aislados del virus de la enfermedad de Newcastle en estas especies de aves silvestres constituyen una potencial amenaza por el riesgo de transmisión y diseminación a la población avícola doméstica o comercial.

Este trabajo sugiere que el virus circulante en las colonias de cormoranes en Chile, año 2007, podría representar un genotipo endémico o endógeno presente en las poblaciones de aves silvestres acuáticas de Sudamérica, y que causarían alta mortalidad o morbilidad en los cormoranes y otras especies silvestres que compartan el mismo hábitat, dado que en este brote se reportaron casos en otras especies como en piquero, pelícanos y pingüinos del mismo nicho ecológico.

Es fundamental disponer de las medidas de bioseguridad en la avicultura comercial que minimice el riesgo de diseminación del virus, para evitar que se presenten brotes como el ocurrido en Estados Unidos el año 1992 en pavos, donde el virus aislado era idéntico al aislado de cormoranes de Minnesota (Heckert, 1996). 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 constituir un estudio epidemiológico (Lomniczi, 1998). Más aún para Sudamérica, donde se han realizado pocos estudios de la ENC y menos en aves silvestres, la mayoría basados en serología o detección de anticuerpos, entre ellos en Perú (Caballero, 2005), y un estudio de epidemiología molecular y filogenia en pollos como el publicado en Argentina (Berinstein, 1999), lo cual dificulta y limita los análisis que entreguen antecedentes del origen y la evolución del virus en las poblaciones de aves silvestres de la región hasta la actualidad.

El presente estudio, por lo tanto, constituye las bases para comenzar a dilucidar la epidemiología molecular y la filogenia del virus Newcastle en aves silvestres de Sudamérica.

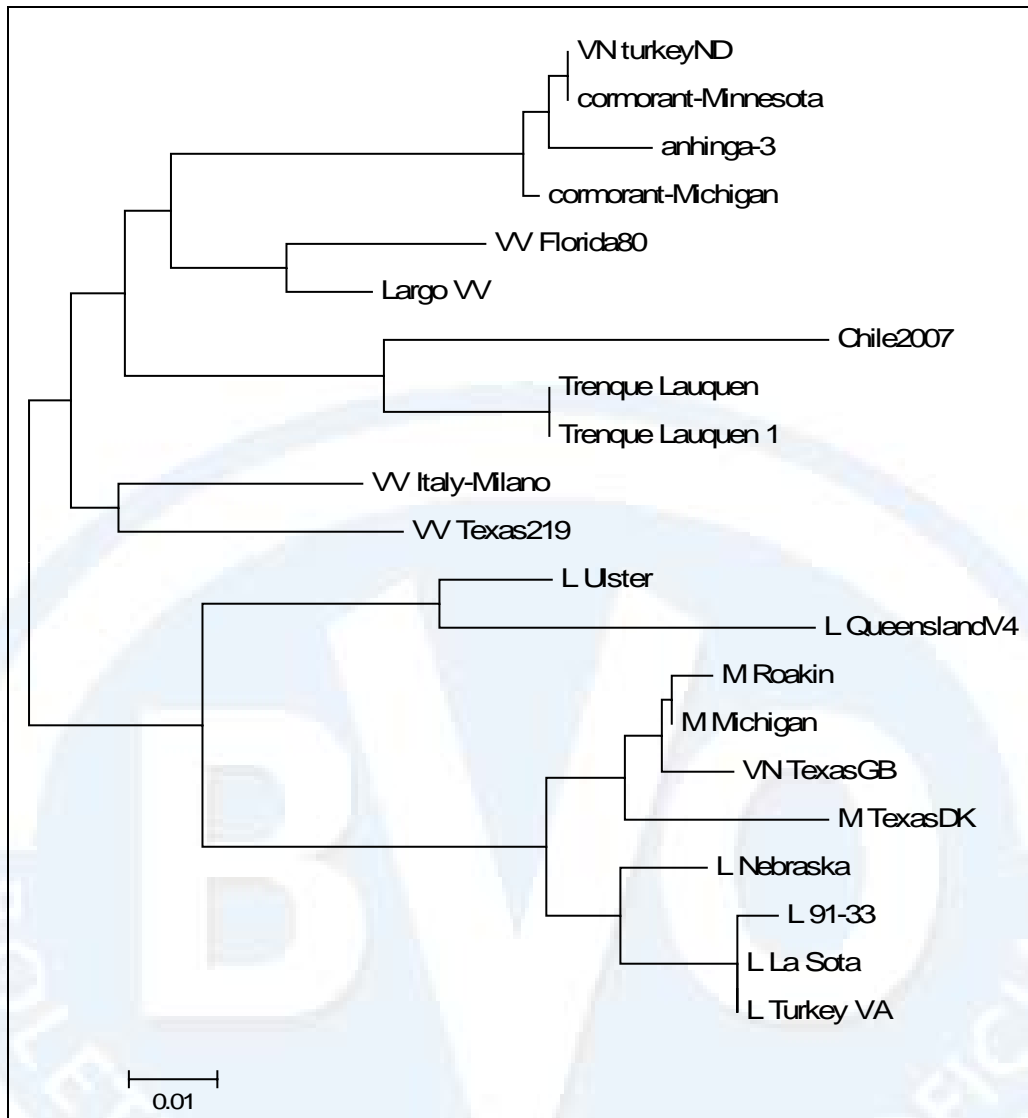


Figura 1

Análisis filogenético de la secuencia de nucleótidos de los productos amplificados de la proteína de fusión del VNC generado por el programa MEGA.

Abreviaturas: L, lentogénico; M, mesogénico; VN, velogénico neurotrópico y VV, velogénico viscerotrópico.

Los virus usados en el análisis se describen en el cuadro 1.

Cuadro 1
Aislados virales analizados filogenéticamente

Aislado	País	Año de aislamiento	Patotipo*
Queensland/V4	Australia	1966	L
Ulster	Irlanda del Norte	1964	L
LaSota	Estados Unidos	1946	L
Turkey/VA	Estados Unidos	1985	L
91/33	Estados Unidos	1991	L
Nebraska	Estados Unidos	1954	L
Michigan	Estados Unidos	1946	M
Roakin	Estados Unidos	1946	M
Texas DK	Estados Unidos	1958	M
Cormorant-Minnesota	Estados Unidos	1992	NV
Cormorant-Michigan	Estados Unidos	1992	NV
Turkey ND	Estados Unidos	1992	NV
Texas GB	Estados Unidos	1948	NV
Italy-Milano	Italia	1945	VV
Texas 219	Estados Unidos	1970	VV
Florida 80	Estados Unidos	1980	VV
Largo	Estados Unidos	1970	VV
Anhinga-3	Estados Unidos	1994	M
Trenque Lauquen	Argentina	1970	VV
Trenque Lauquen 1	Argentina	1970	VV
Chile2007	Chile	2007	M

* L: lentogénico
M: mesogénico
VN: velogénico neurotrópico
VV: velogénico viscerotrópico

✓1. Chile Cormoran Constitucion 07	S	R	G	K	R	Q	K	R	F	I	G	A	I	I	G	S	V
✓2. Trenque Lauquen 1971	S	G	G	R	R	Q	K	R	F	I	G	A	I	I	G	S	V
✓3. Trenque Lauquen 1970	S	G	G	R	R	Q	K	R	F	I	G	A	I	I	G	S	V
✓4. VV Texas219	S	G	R	R	R	Q	K	R	F	I	G	A	I	I	G	S	V
✓5. US(CA) 2002 V	S	G	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	V
✓6. Largo psitacido 1974	S	G	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	V
✓7. VV Florida80	S	G	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	V
✓8. US(CA) 1971 V	S	G	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	V
✓9. NY70181-1970 loro V	S	G	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	V
✓10. Ct Saska1990	S	G	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	I
✓11. cormorant-Michigan 1992	S	R	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	I
✓12. cormorant-Minnesota 1992	S	R	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	I
✓13. anhinga-1993	S	R	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	I
✓14. VN turkeyND 1992	S	R	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	I
✓15. Ct Alb 1999	S	R	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	I
✓16. Ct Man1992	S	R	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	I
✓17. Ct Ont 39 1996	S	R	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	I
✓18. Ct Ont 48 1996	S	R	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	I
✓19. Ct Ont 429 2000	S	R	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	I
✓20. Ct Ont 2344 1995	S	R	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	I
✓21. Ct Ont 2575 1995	S	R	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	I
✓22. Ct Saska1992	S	R	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	I
✓23. Ct Saska1995	S	R	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	I
✓24. Ct Saska1998	S	R	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	I
✓25. Ct Saska1999	S	R	G	R	R	Q	K	R	F	V	G	A	I	I	G	S	I

Figura 2

Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos desde el residuo 109 al 125 de la proteína de fusión. Los sitios conservados están resaltados en color (Ct: cormorán).

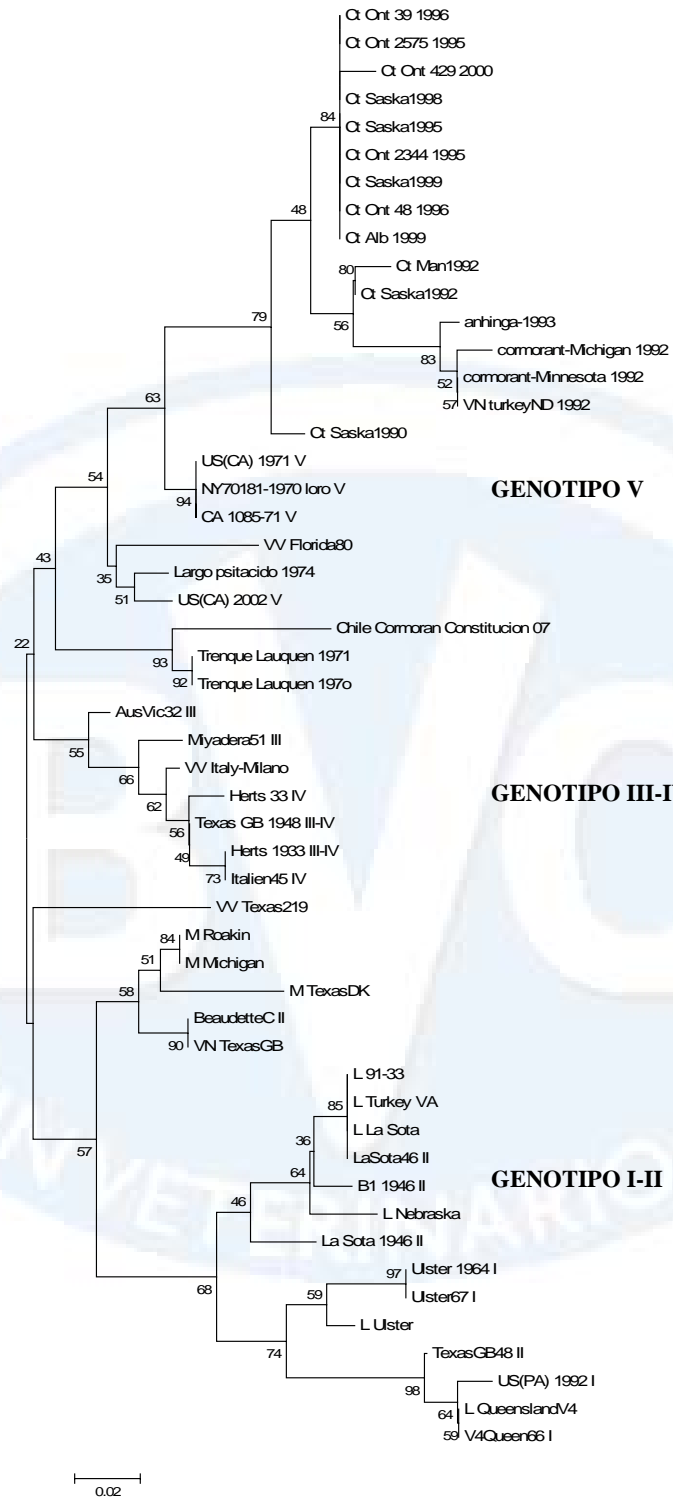


Figura 3

Relaciones filogenéticas entre los aislados de VNC donde se representan los genotipos individuales en número romano (I, II, III, IV, V) y de los aislados de cormoranes (Ct) de Canadá, Norteamérica, basado en la secuencia de nucleótidos de 253 pares de bases que incluye el sitio de clivaje de la proteína de fusión.

4. Bibliografía

- Aldous, E. W., Mynn, J. K., Banks J., Alexander, D. J. 2003. 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 Pathology* 32: 239-257
- Alexander, D.J. 1986. The classification, host range and distribution of avian paramyxovirus. In *Acute virus infections of poultry*, J.B. McFerran and M.S McNulty (eds). Martinus Nijhoff Publishing, Dordrecht, Netherlands, pp52-66
- Alexander, D.J. 1997. Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections. In B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald & Y.M. Saif (Eds.), *Diseases of Poultry*, 10th edn (pp.541-569). Ames: Iowa State University Press.
- Alexander, D.J. 1998. Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses. In: D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson and W.M. Reed, Editors, *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens* (4th ed), *American Association of Avian Pathologists, Kennett Square* (1998), pp. 156–163.
- Alexander, D.J. 2001. Newcastle disease. *British Poultry Science*, 42 :5 - 22.
- Allison, AB., Gottdenker, N. L., Stallknecht D. E. 2005. Wintering of Neurotropic Velogenic Newcastle Disease Virus and West Nile Virus in Double-Crested Cormorants (*Phalacrocorax auritus*) from the Florida Keys *Avian Dis.* 49:292–297.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Banerjee, M., W. M. Reed, S. D. Fitzgerald, and B. Panigraphy. 1994. Neurotropic velogenic Newcastle disease in cormorants in Michigan: pathology and virus characterization. *Avian Dis.* 38:873–878.
- Beard C.W. & Hanson R.P. 1981. Newcastle disease. *In: Diseases of Poultry*, Eighth Edition, Hofstad M.S., Barnes H.J., Calnek B.W., Reid W.M. & Yoder H.W., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 452-470
- Berinstein, A., Seal, B.S., Zanetti, F., Kaloghlian, A., Segade, G., Carrillo, E. 1999. Newcastle Disease Virus Surveillance in Argentina: Use of Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction and Sequencing for Molecular Typification. *Avian Diseases*, 43: 792-797.
- Caballero, F., Alba, M., Icochea, E., Perales, R. Rosadio, R. 2005. Susceptibilidad de la Paloma Silvestre (*Columba livia*) a un virus velogénico viscerotrópico de la enfermedad de Newcastle en condiciones experimentales. *Rev Inv Vet Perú* 16: 41-48
- Clavijo, A., Y. Robinson, and J. López. 2001. Isolation of Newcastle disease virus and *Salmonella typhimurium* from the brain of double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*). *Avian Dis.* 45:245–250.
- Collins, MS., Strong, I., Alexander, DJ. 1994. Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses". *Arch Virol* 134: 403-411.
- Czeglédi, A., Wehmann, E., and Lomniczi, B. 2003. On the origins and relationships of Newcastle disease virus vaccine strains Hertfordshire and Mukteswar, and virulent strain Herts'33. *Avian Pathology* 32:271-276
- Czeglédi, A., Ujvári, D., Somogyi, E., Wehmann, E., Werner, O., Lomniczi B. 2006. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Research* 120: 36–48
- Glaser, L., I. K. Barker, D. V. C. Weseloh, J. Ludwig, R. M. Windingstad, D. W. Key, and T. K. Bollinger. 1999. The 1992 epizootic of Newcastle disease in double-crested cormorants in North America. *J. Wild. Dis.* 35: 319–330.

- Heckert, R. A., M. S. Collins, R. J. Manvell, I. Strong, J. E. Pearson, and D. J. Alexander. 1996. Comparison of Newcastle disease viruses isolated from cormorants in Canada and the USA in 1975, 1990 and 1992. *Can. J. Vet. Res.* 60:50–54.
- Kaleta, E. F., and Baldauf, C. 1988. Newcastle disease in free-living and petbirds, p. 197–246. In D. J. Alexander (ed.), *Newcastle disease*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Mass.
- Kelleher, C.J., Halvorson, D.A., Newman, J.A., and Senne D.A.. 1985. Isolation of avian paramyxoviruses from sentinel ducks and turkeys in Minnesota. *Avian Dis.* 29:400–407.
- Kim, L.M, King,D.J., Suarez,D.L., Wong, C.W., Afonso, C.L. 2007.Characterization of Class I Newcastle Disease Virus Isolates from Hong Kong Live Bird Markets and Detection Using Real-TimeReverse Transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 45: 1310-1314
- King, D.J. 1996. Influence of Chicken Breed on Pathogenicity Evaluation of Velogenic Neurotropic Newcastle Disease Virus Isolates from Cormorants and Turkeys. *Avian Dis* 40:210-217.
- Kuiken, T., F. A. Leighton, G. Wobeser, K. L. Danesik, J. Riva, and R. A. Heckert. 1998. An epidemic of Newcastle disease in double-crested cormorants from Saskatchewan. *J. Wild. Dis.* 34:457–471.
- Kuiken, T., G. Wobeser, F. A. Leighton, D. M. Haines, B. Chelack, J. Bogdan, L. Hassard, R. Heckert, and J. Riva. 1999. Pathology of Newcastle disease in double-crested cormorants from Saskatchewan, with comparison of diagnostic methods. *J. Wild. Dis.* 35:8–23.
- Kumar S, Tamura K & Nei M. 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment [Briefings in Bioinformatics](http://www.briefingsinbioinformatics.org/) 5:150-163. <http://kumarlab.net/pdf_new/KumarTamura03.pdf>
- Lomniczi, B., E. Wehmann, E., Herczeg, J., Ballagi-Pordány, A., Kaleta, E. F., Werner, O., Meulemans, G., Jorgensen, P. H., Mant’e A. P., Gielkens, A. L. J., Capua, I., and Damoser, J. 1998. Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Arch Virol* 143: 49–64
- Liu, H., Wang, Z., Wu, Y., Zheng, D., Sun, C., Bi, D., Zuo, Y., Xu, T. 2007. Molecular epidemiological analysis of Newcastle disease virus isolated in China in 2005 *Journal of Virological Methods* 140:206–211
- Mayo, M.A. 2002a. Virus taxonomy-Houston, *Arch. Virol.* 147:1071–1076.
- Mayo, M.A 2002b. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV, *Arch. Virol.* 147 : 1655–1656.
- Meteyer, C. U., D. E. Docherty, L. C. Glaser, J. C. Franson, D. A. Senne, and R. Duncan. 1997. Diagnostic findings in the 1992 epornitic of neurotropic velogenic Newcastle disease in double-crested cormorants from the upper Midwestern United States. *Avian Dis.* 41:171–180.
- Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W, Martelli, G.P., Mayo M.A. and Summers, M.D. 1995. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses, *Arch. Virol.* 10: 268–274.
- Organización Mundial de Salud Animal. 2004. Newcastle disease. Capítulo 2.1.15 En *Manual of standards for Diagnostic tests and vaccines*, 5th ed. Office International des Epizzoties, Paris, France. <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00038.htm>
- http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00038.htm
- Peeters, B. P. H., O. S. de Leeuw, G. Koch, and A. L. J. Gielkens. 1999. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virol.* 73:5001–5009.
- Seal, B.S., King, D.J. & Bennett, J.D. 1995. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequencedatabase for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *J. Clin. Microbiol.* 33 , 2624 -2630.

- Seal, B.S. 1996. Analysis of Matrix Protein Gene Nucleotide Sequence Diversity Among Newcastle Disease Virus Isolates Demonstrates that Recent Disease Outbreaks Are Caused by Viruses of Psittacine Origin. *Virus Genes* 11:217-224.
- Seal, B.S., King, D.J.; Locke, D.P., Senne, D.A., and Jackwood, M.W. 1998. Phylogenetic relationships among highly virulent Newcastle disease virus isolates obtained from exotic birds and poultry from 1989 to 1996. *J. Clin. Microbiol.* 36:1141–1145.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=retrieve&db=pubmed&list_uids=17488738&dopt=AbstractPlus>
- Wakamatsu, N., King D.J, Seal B.S, Siba K. Samal, S.K and Brown, C.C. 2006. The pathogenesis of Newcastle disease: A comparison of selected Newcastle disease virus wild-type strains and their infectious clones. *Virology* 353, pp 333-343.
- Weingartl, H.M., Riva, J., Kumthekar, P. 2003. Molecular Characterization of Avian Paramyxovirus 1 Isolates collected from Cormorants in Canada from 1995 to 2000. . *J. Clin. Microbiol.* 41:1280–1284.
- Wobeser, G. A, F. A. Leighton, r. Norman, D. J. Meyers, D. Onderka, M. J. Pybus, J. L. Neufeld, G. A. Fox, and D. J. Alexander. 1993. Newcastle disease in wild water birds in western Canada, 1990. *Canadian Veterinary Journal* 34: 353–359.
- Yusoff, Khatijah and Tan, Wen Siang. 2001. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathology*, 30:5, 439 – 455.

Artículo relacionado

Ver en este mismo Boletín: [Informe epidemiológico final: detección de un brote de la enfermedad de Newcastle \(ENC\) en aves marinas, en la zona costera de Constitución, Región del Maule, Chile 2007.](#)