

01674

16



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE VARIAS  
CEPAS DEL VIRUS DE NEWCASTLE A TRAVES DE  
METODOS DE INFECTIVIDAD Y ANALISIS DE  
RESTRICCION DEL GEN f**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION  
Y DE LA SALUD ANIMAL**

PRESENTADA POR

**MVZ MIREYA ORTIZ NICOLI**

COMITE TUTORAL:

MVZ Ph D GUILLERMO TELLEZ ISAIAS

Ph D BILLY HARGIS

DMV TAMAS FEHERVARI

MC VICTOR MANUEL PETRONE GARCIA

DR. VICTOR TENORIO GUTIERREZ



MEXICO, D. F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

*A Dios que siempre me ha guiado en el sendero de la vida y en los sitios más oscuras ilumina siempre mi camino*

*A mi mamá que me regaló la vida, que ha trabajado tanto y tan duro Este trabajo es para ti mamá más que para nadie, a ti que siempre estas cuando más te necesito, aún cuando a veces no se hacia donde se dirige mi camino, y con la soledad que a veces me acompaña se que tu siempre estarás a mi lado para poder ayudarme en mis tropiezos Se que el camino a veces ha sido arduo y sobre todo lento, sin embargo, hoy finalmente he concluido con una parte de él*

*A mi hermano que me ha dado tanto y me ha acompañado en mis fracasos lo mismo que en mis triunfos*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## AGRADECIMIENTOS

*A mis asesores:*

*Tamas Fehérvári por su apoyo, amistad, paciencia, conocimientos y sobre todo por su confianza en mi para poder realizar esta investigación.*

*Victor M. Petrone por sus conocimientos, paciencia y amistad.*

*Guillermo Téllez por sus conocimientos, apoyo brindado.*

*Billy Hargis por apoyo brindado.*

*Victor Tenorio por ayuda, conocimientos y paciencia hacia mi persona.*

*A todos mis por haberme brindado la oportunidad de conocerlos y aprender con ellos y de ellos: Lily Castellanos, Gaby Zarco, Mónica Andrade, Paty Maya, Libia Gutiérrez, Ruth Tejeda, Victor Morales, Bertha Tlacomulco, Nestor Ledesma, Jorge Alva, Aida Luna, Belem Huerta y de muchos más de los cuales quizá no recuerde su nombre pero bien que he de recordar su cara, amistad y enseñanzas, las cuales les llevaré siempre en mi corazón.*

*A Francisco que con su apoyo continuo, amistad, amor y cariño me han ayudado a salir adelante.*



**LISTA DE CONTENIDOS**

	<b>Página</b>
LISTA DE CONTENIDOS	iv
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
OBJETIVO	8
MATERIAL Y MÉTODOS	8
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIÓN	24
LITERATURA CITADA	25

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## LISTA DE CUADROS

**CUADRO 1:** Titulación del virus de la enfermedad de Newcastle (VNC) mediante el método de hemoaglutinación (HA) en placa

Pág 28

**CUADRO 2:** Titulación del virus de la enfermedad de Newcastle (VNC) mediante la técnica de dosis letal 50% (DL 50%)

Pág. 29

**CUADRO 3:** Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

Pág 30

TESIS CON  
FAMILIA DE ORIGEN

**LISTA DE FIGURAS**

- FIGURA 1:** **A)** Cultivo de fibroblastos de embrión de pollo sin inocular. **B)** Sincitios en fibroblastos de embrión de pollo inoculados con la cepa lentogénica 98-220  
Pág 31.
- FIGURA 2:** **A)** Cultivo de fibroblastos de embrión de pollo sin inocular **B)** Formación de placas de aproximadamente 3 mm de diámetro en fibroblastos de embrión de pollo inoculados con la cepa mesogénica Ishii **C)** Formación de placas de aproximadamente 3 mm de diámetro en fibroblastos de embrión de pollo inoculados con la cepa mesogénica Miyadera  
Pág 32
- FIGURA 3:** **A)** Cultivo de fibroblastos de embrión de pollo sin inocular. **B)** Formación de placas de aproximadamente 5 mm de diámetro en fibroblastos de embrión de pollo inoculados con la cepa velogénica Torreón **C)** Formación de placas de aproximadamente 5 mm de diámetro en fibroblastos de embrión de pollo inoculados con la cepa velogénica 98-034  
Pág 33
- FIGURA 4:** **A)** Cultivo de fibroblastos de embrión de pollo sin inocular **B)** Formación de placas de aproximadamente 3 mm de diámetro en fibroblastos de embrión de pollo inoculados con la cepa velogénica 98-053 **C)** Formación de placas de aproximadamente 3 mm de diámetro en fibroblastos de embrión de pollo inoculados con la cepa velogénica 98-064  
Pág 34.
- FIGURA 5:** Amplificación de un fragmento de 1349 pb correspondiente a una fracción del gen *f* de 7 de las 26 cepas trabajadas  
Pág 35.
- FIGURA 6:** Fragmentos de restricción del producto de PCR de la cepa velogénica de referencia Torreón **(A)** y la cepa velogénica 00-006 **(B)**  
Pág 36

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**FIGURA 7:** Fragmentos de restricción del producto de PCR de la cepa velogénica de referencia Chimalhuacán (C) y la cepa velogénica 01-013 (D).

Pág 37

**FIGURA 8:** Fragmentos de restricción del producto de PCR de la cepa lentogénica de referencia La Sota (E) y la cepa 98-436 (F).

Pág 38

**FIGURA 9:** Fragmentos de restricción del producto de PCR de las cepas S-1(G), S-2 (H) y 01-050 (I) que coincidieron entre si, pero no correspondieron con las cepas de referencia analizadas.

Pág 39

**FIGURA 10:** Fragmentos de restricción del producto de PCR de las cepas 048 (J) y 00-033 (K) que no correspondieron con las cepas de referencia analizadas

Pág 40

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>Acm</b>	Anticuerpos monoclonales
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>DL 50%</b>	Dosis letal 50 %.
<b>DEPC</b>	Dietyl-pirocarbonato
<b>ENC</b>	Enfermedad de Newcastle.
<b>F</b>	Fusión
<b>HI</b>	Inhibición de la hemoaglutinación
<b>HN</b>	Hemoaglutinina-neuraminidasa
<b>L</b>	Polimerasa
<b>M</b>	Matriz
<b>MEM</b>	Medio mínimo esencial
<b>NC</b>	Newcastle
<b>NP</b>	Nucleoproteína.
<b>OIE</b>	Oficina Internacional de Epizootias
<b>P</b>	Fosfoproteína
<b>PBS</b>	Solución amortiguada fosfatada
<b>PMV</b>	Paramixovirus
<b>RFLP's</b>	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción
<b>RI-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa.
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>UFP</b>	Unidades formadoras de placa
<b>VNC</b>	Virus de la enfermedad de Newcastle

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## RESUMEN

**Ortiz Nicoli Mireya. Identificación y caracterización de varias cepas del virus de Newcastle a través de métodos de infectividad y análisis de sitios de restricción del gen *f*. Comité Tutoral: Ph D Guillermo Téllez Isaías, Ph D Billy Hargis, MDV Tamas Fehérvári, MC Víctor M Petrone García y Dr. Víctor Tenorio Gutiérrez.**

La enfermedad de Newcastle es una enfermedad altamente contagiosa tanto para aves jóvenes como adultas ocasionando mortalidad elevada. En México, el último brote que se presentó en el año 2001 causó grandes pérdidas económicas, afectando a 13 500 160 aves. El objetivo de la presente investigación fue caracterizar cepas del virus de Newcastle, derivadas de diferentes localizaciones geográficas de la República Mexicana en distintos períodos de tiempo, mediante la utilización de los siguientes métodos: hemoaglutinación en placa, cálculo de la dosis letal 50% en embriones de pollo, unidades formadoras de placa y análisis de restricción del gen *f*, esta última realizada por primera vez en México. Se utilizaron 19 cepas del virus de Newcastle obtenidas del Laboratorio de Diagnóstico Aviar del Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y 7 cepas de referencia del virus de Newcastle: 3 velogénicas viscerotrópicas (Chimalhuacán, Querétaro y Torreón), 2 mesogénicas (Ishii y Miyadera) y 2 lentogénicas (La Sota y Queensland V4). Se observó que los títulos obtenidos con el método de hemoaglutinación en placa variaron. Esta variación se puede deber al manejo continuo de congelación y descongelación de las muestras. El título de la dosis letal 50% en el embrión de pollo se relaciona con la virulencia de la cepa, mostrando relación con el aumento de tamaño de las unidades formadoras de placa. Mediante la utilización de la técnica reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa se amplificó un fragmento de 1349 pb de la proteína F de cada una de las cepas. Los fragmentos obtenidos fueron digeridos con 3 enzimas de restricción (*Bst* I, *Hinf* I y *Rsa* I) y separados por tamaño en geles de agarosa al 3%. Los patrones de restricción de las 19 cepas correspondieron a: 7/19 (36.84%) Torreón; 1/19 (5.26%) Chimalhuacán; 6/19 (31.57%) La Sota. Sin embargo, 5/19 (26.31%) tuvieron patrones distintos al de las cepas de referencia analizadas. Un análisis de secuenciación entre las diferentes cepas es necesario para determinar si estas cepas se encuentran relacionadas entre sí o bien para determinar si son cepas nuevas. Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa y polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción permitieron en esta investigación dar un diagnóstico rápido y específico para la enfermedad de Newcastle.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**ABSTRACT**

**Ortiz Nicoli Mireya. Identification and Characterization of Newcastle virus by Infective and Restriction site analysis of the *f* gene methods. Evaluation Committee: Ph D Guillermo Téllez Isaías, Ph D Billy Hargis, MDV Tamas Fehérvári, MC Víctor M Petrone García and Dr. Víctor Tenorio Gutiérrez.**

Newcastle disease is a highly contagious virus infection for young and adult chickens causing high mortality. The last outbreak in Mexico caused several economic losses killing 13 500 160 broilers. The objective of the present study was to characterize Newcastle disease viruses derived from different geographical locations of Mexico in different time periods by using the following methods: hemoagglutination, lethal dose 50% in chicken embryos, analysis of plaque formation and restriction site analysis of the *f* gene, the last for first time done in Mexico 19 field isolates of Newcastle disease virus obtained from the Department of Animal Production: Poultry of the Faculty of Veterinary Medicine at the National Autonomous University of Mexico were used and compared with 3 velogenic viscerotropic (Chimalhuacan, Queretaro, and Torreon), 2 mesogenic (Ishii and Miyadera) and 2 lentogenic (La Sota and Queensland V4) Newcastle disease viruses. Results obtained by hemagglutination method show that the titers are affected by the continuous freezing and unfreezing management of the samples. Lethal dose in chicken embryo is related with the virulence of the strain showing relation with the sizes of plaques formed in tissue culture. Using reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique a fragment of 1349 bp long of a region from *f*-gene of each strain was amplified. The fragments were then digested by 3 restriction enzymes (*Bst*I, *Hinf*I and *Rsa*I). Digested fragments were separated by size in 3 % agarose gels. Patterns of the 19 isolates corresponded to: Torreon 7/19 (36.84 %); Chimalhuacan 1/19 (5.26 %); and La Sota 6/19 (31.57 %). However, 5/19 (26.31 %) had different patterns from the reference strains. Sequence analysis of these 5 isolates is necessary to determine if they are related to other either known or unknown Newcastle disease virus strains. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction site analysis techniques allow a faster and more specific diagnostic for Newcastle disease.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VARIAS CEPAS DEL VIRUS DE NEWCASTLE A TRAVÉS DE METODOS DE INFECTIVIDAD Y ANÁLISIS DE SITIOS DE RESTRICCIÓN DEL GEN *f*.

## II. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle (ENC) es una enfermedad altamente contagiosa tanto en aves jóvenes como adultas ocasionando mortalidad elevada, la cual puede alcanzar hasta el 100%, disminución en la producción y en la calidad del huevo, baja incubabilidad y por lo tanto pérdidas económicas. Considerada en la lista A de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE)<sup>1</sup>, entre una de las enfermedades enzoóticas más peligrosas.

La infección que ahora se denomina ENC se conoce desde 1926, año que se registro el primer brote en la isla de Java (ahora parte de Indonesia), y poco después en la región de Newcastle-upon-Tyne, Inglaterra. Se consideran que se han presentado cuando menos 4 panzootias de la ENC en el mundo<sup>2</sup>. La primera, inicio en 1926 y termino alrededor de 1960, surgió del Sureste de Asia con una lenta y progresiva distribución mundial. La segunda, proveniente del Medio Oriente, comenzó a fines de la década de los 60's y avanzando a más países en 1973, iniciándose en pichones enjaulados. La tercera proveniente de Medio Oriente, a fines de los 70's y distribuida en todo el mundo para 1981, en presentación neurotrópica<sup>2,3</sup>.

Actualmente se está presentando la cuarta panzootia, pues desde 1991 se ha venido incrementando la incidencia de una serie de brotes caracterizados por la presencia de un virus velogénico muy virulento que causa principalmente la forma respiratoria y ocasionalmente la viscerotrópica<sup>2</sup>.

En México la ENC fue notificada por primera vez en 1946<sup>4</sup>. Los primeros aislamientos del virus de Newcastle (VNC) fueron realizados por la Dra. Aurora Velázquez a partir de pollos y gallinas importados de los Estados Unidos de América<sup>5</sup>. Durante la década de los 50's a los 60's la avicultura a nivel nacional tuvo un rápido crecimiento, en

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

las que se emplearon toda clase de vacunas inactivadas y vivas en todas las combinaciones posibles <sup>5,6</sup> Sin embargo, a pesar de todos los programas de control, incluyendo las vacunaciones existentes la ENC siguió presentándose de forma periódica ocasionando cuantiosas pérdidas económicas. A fines de la década de los 50's con apoyo de la fundación Rockefeller se fundó el Laboratorio de las Enfermedades de las Aves en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM <sup>5</sup> De los primeros programas iniciados en el laboratorio fue la investigación de la ENC ya que esta enfermedad representaba el mayor problema de la industria avícola. A pesar del control de la ENC con el uso de vacunas y métodos zosanitarios, las cepas virulentas extremadamente patógenas están aún presentes en la República Mexicana <sup>7</sup> El 29 de marzo del 2001 se hizo la denuncia de un nuevo brote de la ENC velogénico en la región de la Comarca Lagunera. A partir del primer diagnóstico, dado a conocer hasta junio del año 2001, se notificó que resultaron positivas 83 granjas comerciales con una población de 13 500 160 aves; las pérdidas generadas por el brote se estiman en 250 millones de pesos (aproximadamente 25 millones de USD dolares) <sup>7</sup>

El agente causal de la ENC es un virus clasificado como miembro de la superfamilia *Mononegavirales* en la familia *Paramyxoviridae*. Esta familia de virus se divide en dos subfamilias: *Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae*. En 1993, el Comité Internacional de la Taxonomía Viral reordena el género *Paramyxovirus* (PMV) y colocó al VNC en el género *Rubulavirus* entre los *Paramyxovirinae* <sup>8</sup> De acuerdo a la clasificación actual los PMV aviares constan de 9 serotipos del PMV-1 al PMV-9. Los virus del PMV-2 al PMV-9 se pueden encontrar en muchas aves domésticas y silvestres, pero no se relacionan con la ENC. A excepción de los PMV-2 y PMV-3, estos virus no se han relacionado hasta ahora con ninguna enfermedad. No presentan reacción serológica cruzada con el PMV-1 a excepción del PMV-3 que puede reaccionar con el VNC en las pruebas serológicas y por lo general los serotipos son estables <sup>2</sup> El virus consta de un amplio rango de hospedadores con 27 a 30 órdenes de aves que se han reportado infectadas con el VNC. Sin embargo, la gravedad de la enfermedad varía mucho según el tipo de aves que se encuentre afectando. La patogenicidad de las cepas se ha establecido en pruebas realizadas en pollos clasificándolas en altamente virulentas (velogénicas), moderadas o intermedias.

(mesogénicas), de baja patogenicidad (lentogénicas) y apatógenas. La microscopía electrónica de contraste negativo del VNC muestra partículas virales pleomórficas; sin embargo, la mayoría son redondas y miden de 100 a 500 nm de diámetro. La envoltura de este virus consta de polaridad negativa con un genoma de RNA de cadena sencilla no segmentado con aproximadamente 15 kilobases, cuyo genoma codifica 6 polipéptidos mayores: hemoaglutinina-neuraminidasa (HN), proteína de fusión (F), matriz (M), fosfoproteína (P), nucleoproteína (NP) y polimerasa (L).<sup>8,9,10</sup>

El VNC se inactiva completamente en 3 minutos por la acción del alcohol etílico al 70 ó 90%, fenol y cresol al 3%, tintura de yodo al 1%. La fumigación con formaldehído al 1% con una humedad del 80% produce una desinfección eficaz en casetas e incubadoras<sup>11</sup>. Para el aislamiento rutinario del VNC las muestras apropiadas se obtienen a partir de hisopos cloacales y traqueales.<sup>12</sup> El virus puede estar presente en cualquier parte del organismo durante el período clínico de la enfermedad, aislándose a través de tejidos como pulmón, cerebro, bazo, hígado, riñón y médula ósea. El VNC se identifica fácilmente mediante el uso de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI) y mediante la utilización de anticuerpos específicos. Cuando el virus se pone en presencia del anticuerpo, este es capaz de neutralizar la propiedad de los virus de aglutinar los eritrocitos, por el bloqueo del sitio de unión de la proteína HN del virus al eritrocito.<sup>11,12,13</sup> La enzima neuraminidasa forma parte de la proteína HN cuya presencia se confirma por la elusión gradual de los eritrocitos aglutinados a través de la remoción de los sectores virales de la célula huésped evitando la readherencia de las partículas virales liberadas.<sup>12,13</sup>

Los anticuerpos en el suero de aves pueden ser identificados mediante métodos serológicos como HI, seroneutralización viral (VSN) y la prueba de ELISA. Otras técnicas de laboratorio que pueden ser de utilidad para la identificación del VNC son la fijación del complemento e inmunodifusión en gel, las cuales detectan antígeno soluble e inactivo.<sup>12,13</sup>

Estudios moleculares basados en la patogenicidad del VNC han establecido que la virulencia de este virus depende de la habilidad de las proteasas que se encuentran en gran parte de las células y tejidos del hospedador, para desdoblar el precursor de la proteína F.

(F0) en F1 y F2 Así mismo, basados en la comparación de secuencias de nucleótidos de los genes HN y F de once cepas de Newcastle (NC) tres distintas líneas evolutivas se han identificado en la actualidad <sup>8</sup>, siendo principal determinante para la patogenicidad la proteína F, sitio de anclaje en la secuencia de aminoácidos y la habilidad de proteasas específicas para unirse a la proteína F de diferentes patotipos; encontrándose aminoácidos dibásicos rodeando a la glutamina en la posición 114 de la proteína F en el sitio de anclaje de cepas mesogénicas y velogénicas, mientras las cepas lentogénicas carecen de este aminoácido en este sitio <sup>8,9</sup>

Las pruebas de reacción de anticuerpos monoclonales (Acm) y reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RI-PCR) a partir de una fracción del gen de fusión del VNC indica que al menos tres genotipos diferentes (II, III y IV) fueron responsables de la primera panzootia en el mundo Sin embargo, en la actualidad no se conoce con seguridad a que genotipo pertenecen las cepas viscerotrópicas que se encuentran afectando las diferentes regiones de la República Mexicana <sup>11 12 13</sup>

Los métodos de control y erradicación varían de país a país, e incluso difieren de continente a continente A su vez la efectividad de las medidas de control dependen del tipo de la industria avícola, de la estructura de los servicios veterinarios, de la infraestructura nacional y de la identificación de las cepas que se encuentran afectando los brotes

La identificación de las cepas es de gran importancia en los países donde se utilizan diferentes vacunas con virus vivo, para establecer la identidad de la vacuna Conjuntando esfuerzos en décadas pasadas se ha logrado introducir métodos de identificación y diferenciación Estas técnicas se han basado en las propiedades virales tales como la patogenicidad o la formación de placas, propiedades fisicoquímicas tales como la termoestabilidad y el análisis de polipéptidos u oligonucleótidos estructurales, obteniéndose los mejores resultados para la identificación y diferenciación de las cepas del VNC con el análisis de Acm Este método establece 10 grupos antigénicos de los cuales 5 incluyen

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

cepas muy virulentas (velogénicas) Esta fue la primera clasificación de cepas de NC donde las cepas comparten propiedades antigénicas y epizootiológicas <sup>8,9</sup>

La diferenciación entre las cepas del VNC es de gran importancia, debido a que existen cepas de alta, mediana y baja virulencia para los pollos Las cepas de baja y mediana virulencia son consideradas enzooticas en la mayoría de las aves silvestres de todos los países y el casi universal uso de vacunas vivas significa, que la sola demostración de la infección, sin la identificación de la cepa infectante, pocas veces es suficiente para el seguimiento epidemiológico de los brotes <sup>12,14</sup> La detección y diferenciación de cepas del VNC se basan, de manera convencional, en pruebas de laboratorio tales como el aislamiento viral realizado en embriones de pollo o en fibroblastos de embriones de pollo con la producción de unidades formadoras de placa (UFP), índice de patogenicidad intracerebral, índice de patogenicidad intravenoso y dosis letal 50% (DL50%) Estas pruebas por lo general son laboriosas, de larga duración, caras e inhumanas <sup>15</sup> y el tipo de información es distinto al de la técnica de RI-PCR Es por ello que en la actualidad muchos investigadores están utilizando métodos relativamente simples de RI-PCR y análisis de enzimas de restricción del gen *f* para encontrar relaciones existentes entre los aislamientos procedentes de diferentes partes del mundo <sup>15</sup> La comparación por medio del análisis de enzimas de restricción provee una técnica relativamente rápida, simple y confiable para la identificación de cepas del VNC permitiendo agruparlas entre aquellas que comparten relaciones epidemiológicas, así como entre aquellas que comparten descendientes en común <sup>9</sup> Con base en el análisis de enzimas de restricción las cepas del VNC se dividen en VIII genotipos en donde algunas de las cepas vacunales clásicas se clasifican dentro del genotipo II, las cepas presentes en el continente Americano se clasifican también dentro del genotipo II, las cepas típicas del continente Europeo se clasifican dentro del genotipo VII y dentro de los genotipos restantes se encuentran clasificadas las cepas que pertenecen a otros continentes <sup>7</sup> En México no se han realizado estudios de RI-PCR con cepas mexicanas por lo que fue de primordial importancia Realizar este tipo de estudios es de interés general ya que la introducción de técnicas moleculares permitirá realizar en 24 horas diagnósticos de la presencia y tipo de cepa del

VNC que esta presente en un brote y si esta se encuentra relacionada o no con otros brotes de la enfermedad

### **III. OBJETIVO**

El objetivo del presente trabajo fue llevar al cabo la caracterización de cepas del VNC derivadas de diferentes localizaciones geográficas de la Republica Mexicana en los distintos períodos de tiempo en que se ha presentado el brote de la enfermedad y usar los datos obtenidos para mostrar las relaciones epidemiológicas de brotes de NC mediante la utilización de los siguientes métodos: titulación del VNC, DL50% en embrión de pollo, UFP y polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

### **IV. MATERIAL Y MÉTODOS:**

#### **1. Virus**

Se utilizaron 19 cepas del VNC obtenidas del Laboratorio de Diagnóstico Aviar del Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, que se aislaron a partir de muestras remitidas para diagnóstico durante los años de 1997 al 2001 procedentes de 5 estados de la República Mexicana: Edo de México, D F., Morelos, Chiapas y Guadalajara. Así mismo se utilizaron 7 cepas como referencia positivas al VNC: 3 velogénicas viscerotrópicas (Chimalhuacán, Querétaro, y Torreón), 2 mesogénicas (Ishii y Miyadera) y 2 lentogénicas (La Sota y Queensland V4). Las 19 cepas del VNC fueron clasificadas por su virulencia durante su diagnóstico con base en la mortalidad embrionaria en 9 cepas lentogénicas y 10 cepas velogénicas

#### **2. Titulación del VNC**

Para la titulación de las cepas del VNC, estas fueron descongeladas de una temperatura de  $-85^{\circ}\text{C}$  y cada una fue inoculada vía cavidad alantoidea a 5 embriones libres de patógenos específicos de 9 días de desarrollo embrionario. Los embriones se incubaron a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  y se observaron al ovoscopio durante 3 días, registrándose la

VNC que esta presente en un brote y si esta se encuentra relacionada o no con otros brotes de la enfermedad

### **III. OBJETIVO**

El objetivo del presente trabajo fue llevar al cabo la caracterización de cepas del VNC derivadas de diferentes localizaciones geográficas de la Republica Mexicana en los distintos períodos de tiempo en que se ha presentado el brote de la enfermedad y usar los datos obtenidos para mostrar las relaciones epidemiológicas de brotes de NC mediante la utilización de los siguientes métodos: titulación del VNC, DL50% en embrión de pollo, UFP y polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

### **IV. MATERIAL Y MÉTODOS:**

#### **1. Virus**

Se utilizaron 19 cepas del VNC obtenidas del Laboratorio de Diagnóstico Aviar del Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, que se aislaron a partir de muestras remitidas para diagnóstico durante los años de 1997 al 2001 procedentes de 5 estados de la República Mexicana: Edo de México, D F., Morelos, Chiapas y Guadalajara. Así mismo se utilizaron 7 cepas como referencia positivas al VNC: 3 velogénicas viscerotrópicas (Chimalhuacán, Querétaro, y Torreón), 2 mesogénicas (Ishii y Miyadera) y 2 lentogénicas (La Sota y Queensland V4). Las 19 cepas del VNC fueron clasificadas por su virulencia durante su diagnóstico con base en la mortalidad embrionaria en 9 cepas lentogénicas y 10 cepas velogénicas

#### **2. Titulación del VNC**

Para la titulación de las cepas del VNC, estas fueron descongeladas de una temperatura de  $-85^{\circ}\text{C}$  y cada una fue inoculada vía cavidad alantoidea a 5 embriones libres de patógenos específicos de 9 días de desarrollo embrionario. Los embriones se incubaron a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  y se observaron al ovoscopio durante 3 días, registrándose la

VNC que esta presente en un brote y si esta se encuentra relacionada o no con otros brotes de la enfermedad

### **III. OBJETIVO**

El objetivo del presente trabajo fue llevar al cabo la caracterización de cepas del VNC derivadas de diferentes localizaciones geográficas de la Republica Mexicana en los distintos períodos de tiempo en que se ha presentado el brote de la enfermedad y usar los datos obtenidos para mostrar las relaciones epidemiológicas de brotes de NC mediante la utilización de los siguientes métodos: titulación del VNC, DL50% en embrión de pollo, UFP y polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

### **IV. MATERIAL Y MÉTODOS:**

#### **1. Virus**

Se utilizaron 19 cepas del VNC obtenidas del Laboratorio de Diagnóstico Aviar del Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, que se aislaron a partir de muestras remitidas para diagnóstico durante los años de 1997 al 2001 procedentes de 5 estados de la República Mexicana: Edo de México, D F., Morelos, Chiapas y Guadalajara. Así mismo se utilizaron 7 cepas como referencia positivas al VNC: 3 velogénicas viscerotrópicas (Chimalhuacán, Querétaro, y Torreón), 2 mesogénicas (Ishii y Miyadera) y 2 lentogénicas (La Sota y Queensland V4). Las 19 cepas del VNC fueron clasificadas por su virulencia durante su diagnóstico con base en la mortalidad embrionaria en 9 cepas lentogénicas y 10 cepas velogénicas

#### **2. Titulación del VNC**

Para la titulación de las cepas del VNC, estas fueron descongeladas de una temperatura de  $-85^{\circ}\text{C}$  y cada una fue inoculada vía cavidad alantoidea a 5 embriones libres de patógenos específicos de 9 días de desarrollo embrionario. Los embriones se incubaron a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  y se observaron al ovoscopio durante 3 días, registrándose la

mortalidad embrionaria diaria. El líquido alantoideo de los embriones muertos se examinó para saber si contenían hemoaglutinina viral utilizando eritrocitos de pollo al 2%. De cada una de las cepas se cosechó el líquido alantoideo y se almacenaron a  $-85^{\circ}$  C hasta el momento de su titulación.

La titulación del VNC se desarrolló utilizando el método de hemoaglutinación en placa descrito por Villegas<sup>16</sup>

La titulación se realizó por triplicado a cada una de las cepas utilizadas en una placa de 96 pozos con fondo en V de la siguiente manera:

- Se llenaron 3 líneas de la placa con 50  $\mu$ l de solución amortiguada fosfatada (PBS) en cada pozo
- Al primer pozo de cada línea se le agregaron 50  $\mu$ l de líquido alantoideo infectado con el VNC a titular. A partir de la primera dilución 1:2 se realizaron diluciones seriadas al pasar 50  $\mu$ l de cada pozo con ayuda de una multipipeta
- Una vez hechas las diluciones a cada uno de los pozos se le agregaron 50  $\mu$ l de eritrocitos de pollo al 0.5%
- Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos
- La determinación del título del VNC se consideró como la dilución más alta donde se presentó la hemoaglutinación, es decir la ausencia de formación de un botón de eritrocitos

### **3. Dosis Letal 50% en embrión de pollo**

La titulación de la DL 50% del VNC se desarrolló utilizando el método descrito por Allan y colaboradores<sup>11</sup>

Se realizaron 10 diluciones con PBS decuples seriadas por cada cepa, y 100  $\mu$ l de cada dilución fueron inoculados vía cavidad alantoidea a 5 embriones libres de patógenos específicos de 9 días de desarrollo embrionario. Los embriones se incubaron a una

temperatura de 37 °C y se observaron al ovoscopio durante 7 días, registrándose la mortalidad embrionaria diaria. El líquido alantoideo de los embriones muertos se examinó para saber si contenían hemoaglutinina viral utilizando eritrocitos de pollo al 2%. El cálculo de la DL50% se realizó mediante la fórmula descrita por Allan y colaboradores<sup>11</sup>:

$$DL50\% = X_k + 1/2d - (d\sum r_i/n)$$

Donde:

DL 50% = dosis letal 50%

$X_k$  = el valor log de la última línea de la titulación

$d$  = el incremento (log); un incremento décuplo

$d\sum r_i$  = la suma de todos los embriones que sobrevivieron

$n$  = el número de huevos inoculados por dilución

#### **4. Unidades formadoras de placa**

##### **a) Preparación de fibroblastos de embrión de pollo**

El método de preparación de cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo utilizado es el mismo descrito por Cunningham<sup>17</sup> teniendo la siguiente modificación: 5 ml de la suspensión celular se colocó en cajas Petri estériles con diámetro de 3.5 cm. Las cajas Petri fueron incubadas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas para la formación de la monocapa del cultivo celular.

##### **b) Inoculación y evaluación de placas**

Se realizaron 7 diluciones décuples seriadas a cada una de las cepas utilizando como diluyente solución de Hank's con antibiótico y 3% de suero fetal bovino (SFB). 100 µl de cada dilución fueron inoculados por caja Petri con el método de adsorción<sup>18</sup> durante 60 minutos. Durante el período de adsorción las cajas fueron incubadas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> moviéndolas de lado a lado en un ángulo de 45° cada 5 minutos para evitar que la

monocapa se secará Después de pasados 60 minutos se retiró el sobrenadante y se agregó 5 ml de agar noble mezclado con MEM 2x para evitar que las partículas virales se difundan por toda la monocapa Los cultivos celulares se incubaron durante 5 días a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> Por último, la observación de las UFP se realizó agregando rojo neutro hasta cubrir completamente la monocapa de los cultivos celulares, el cual fue adsorbido por las células vivas observándose las UFP sin teñir Las placas se evaluaron mediante el uso de un microscopio invertido y mediante la observación a trasluz

### **Soluciones utilizadas:**

- \* Solución balanceada de Hank's (GibcoBRL, No. Cat : 14175-079)
- \* Medio mínimo esencial (MEM, GibcoBRL, No. Cat : 12800-017)
- \* TRIS 0.25M (GibcoBRL, No. Cat : 155504-012)
- \* HEPES 1M pH 8.25 (Sigma, No. Cat : H-0763)
- \* L-Glutamina 3% (Sigma, No. Cat : 21051-024)
- \* Antibióticos: estreptomina 50 mg/l, penicilina 1000 U/l
- \* Rojo Neutro (Sigma, No. Cat : 50040)
- \* Suero fetal bovino (SFB, GibcoBRL, No. Cat : 16110-082)
- \* Lacto albúmina (Sigma, No. Cat : L6388)
- \* Agarosa 1.5% (GibcoBRL, No. Cat : 15510-027)

### **MEM 1x**

Agua bidestilada	1000 ml
MEM	9.438 gr
Lacto albúmina	4 gr
TRIS	10 ml

### **Medio para cultivo celular de fibroblastos**

MEM 1x	500 ml
SFB	40 ml
L-glutamina	5 ml
HEPES	2.5 ml

**MEM 2x**

Agua bidestilada	500 ml
MEM	9 428 gr
Lacto albumina	4 gr
TRIS	10 ml
HEPES	2.5 ml
SFB	25 ml
Antibiótico	5 ml

**Medio para cubrir el cultivo celular**

MEM 2x	50 ml
Agarosa	50 ml

**Rojo Neutro**

Rojo Neutro	1 gr
Alcohol absoluto	20 ml
Agua destilada	80 ml

**Medio para la tinción del cultivo celular**

Solución balanceada de Hank's	100 ml
Rojo Neutro	2-3 ml

**5. Análisis de enzimas de restricción de la proteína F****a) Extracción del RNA viral**

Se utilizó la técnica de extracción del RNA viral con el método descrito por Ballagi-Pordány y colaboradores<sup>9</sup> que consiste en:

- Inoculación de 100 µl de cada cepa del VNC a 5 embriones libres de patógenos específicos de 9 días de desarrollo embrionario. Los embriones se incubaron a una

temperatura de 37 °C y se observaron al ovoscopio durante 3 días registrándose la mortalidad embrionaria. El líquido alantoideo de los embriones muertos se examinó para saber si contenía hemoaglutinina viral utilizando eritrocitos al 2%. Los embriones que sobrevivieron al tercer día postinoculación fueron sacrificados y examinados para saber si contenían hemoaglutinina viral. De los embriones positivos a la hemoaglutinación se colectó líquido alantoideo libre de sangre y saco vitelino el cual fue almacenado a -85 °C hasta el momento de su utilización.

- A 500 µl de cada líquido alantoideo se le agregó 100 µl de amortiguador 1x (Tris-HCl 1M; 0.5 M EDTA pH 8; SDS 10%), 3 µl de la enzima proteinasa K y se incubaron a 55 °C durante 1 hora.
- Después del período de incubación se agregó por muestra 500 µl de fenol agitándose 30 segundos en vortex; las muestras fueron centrifugadas a 9000 g durante 10 minutos a 4 °C.

### **Precipitación**

- Se transfirió la fase acuosa de cada muestra a tubos nuevos. A cada muestra se le agregó 500 µl de cloroformo agitándose 30 segundos en vortex; las muestras fueron centrifugadas a 9000 g durante 10 minutos a 4 °C.
- Se transfirió la fase acuosa de aproximadamente 400 µl de cada muestra a tubos eppendorf nuevos de 2 ml.
- Se agregó a cada muestra 50 µl de acetato de sodio (3 M, pH 5.2) y 800 µl de etanol absoluto.
- Las muestras se dejaron precipitando a -20 °C durante 24 horas.
- Las muestras fueron centrifugadas a 9000 g durante 20 minutos a 4 °C.

### **Lavado**

Se removió el sobrenadante, el precipitado fue lavado con 1000 µl de etanol al 70%. La muestra fue mezclada y centrifugada a 9000 g durante 10 minutos a 4 °C.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Redisolución

El sobrenadante fue desechado dejando secar los botones de RNA a temperatura ambiente. Los botones de RNA fueron disueltos en 25  $\mu$ l de agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC, Sigma, No Cat : D5758). Las muestras se almacenaron a  $-85^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

## b) Transcriptasa Reversa

- 1 Se preparó la siguiente mezcla para cada una de las cepas en un microtubo estéril de 200  $\mu$ l puesto en hielo
  - 4  $\mu$ l de amortiguador 1st strand 5X como amortiguador (GibcoBRL, No Cat : Y00146)
  - 2  $\mu$ l de Oligo dtt 0.1 M (GibcoBRL, No Cat : Y00147)
  - 2  $\mu$ l de dNTP's 2mM (10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP pH 7.0, Biotecnologías Universitarias)
  - 0.5  $\mu$ l de RNAsin 40 U/ $\mu$ l (Invitrogen, No Cat : 10777-019)
  - 3  $\mu$ l de RNA viral
  - 6.5  $\mu$ l de agua tratada con DEPC
- 2 Se agitó la muestra 4 segundos en vortex y se incubó a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos
- 3 Se agregó 1  $\mu$ l del iniciador 1 aa (5' a 3' TGA-IIG-WAI-YCG-IAR-GAI-ACA-AGR-KTC-IG; GibcoBRL) a una concentración de 250 ng/ $\mu$ l a cada muestra
- 4 Se agitó la muestra 4 segundos en vortex y se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos
- 5 Se agregó 1  $\mu$ l de la enzima Super Script II 200 U/ $\mu$ l (GibcoBRL, No Cat : 18064-014) a cada muestra.
- 6 Se agitó la muestra 4 segundos en vortex y se incubó a  $45^{\circ}\text{C}$  durante 50 minutos
- 7 Para inactivar la enzima Super Script II la reacción se calentó a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos.

### c) Reacción en cadena de la polimerasa

Se amplificó un fragmento de 1349 pb correspondiente a una fracción del gen *f* del VNC de cada una de las cepas en el termociclador Gen Amp PCR System 2400 Perkin Elmer, utilizando los siguientes iniciadores basados en la secuencia publicada por Lomniczi B<sup>8</sup>:

1aa 5' a 3' IGA-ITG-WAI-YCG-IAR-GAI-ACA-AGR-KIC-IG correspondiente a los nucleótidos de la posición 334-362 (Sentido)

4aa 5' a 3' ATC-IGR-YCI-AGI-GIR-ITA-TTC-CCA-AGC-CA correspondiente a los nucleótidos de la posición 1654-1682 (Reversa).

La amplificación se llevo a cabo con 2.5 µl de ambos iniciadores (10 mM), 1.2 µl de taq polimerasa (5 U/µl, Biotecnologías Universitarias), 5 µl de amortiguador para PCR (2 mM MgCl), 5 µl de dNIP's, 5 µl de cDNA obtenido mediante la técnica de RT y 31.3 µl de agua tratada con DEPC

Se utilizó:

Un ciclo: 94 °C 3 minutos

30 ciclos: 94 °C 30 segundos, 55.5 °C 1 minuto y 72 °C dos minutos por ciclo

Un ciclo: 72 °C 5 minutos

Un volumen de 5 µl del producto de PCR fue corrido mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% durante 45 minutos a 90 Volts para la observación y análisis de la amplificación del fragmento de 1349 pb de cada una de las cepas, el gel se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml durante 10 minutos y se observó en un transiluminador UVP de luz ultravioleta de onda corta

#### d) Análisis de restricción.

Los fragmentos de 1349 pb de cada una de las cepas fueron digeridos con 3 enzimas de restricción (*Bst*O I Promega, No Cat : R6931 *Hinf* I Promega, No Cat : R6201 y *Rsa* I Promega, No Cat : R6371), de la siguiente manera:

3 µl del amortiguador correspondiente señalado por el proveedor (Promega)

10 µl de producto de PCR.

0.5 µl de albumina sérica bovina (BSA, Promega, No Cat : R396D, 10 U/µl)

1 µl de enzima de restricción

15.5 µl de agua DEPC

La digestión se llevó a cabo bajo las condiciones señaladas por el proveedor (Promega) de la siguiente manera:

- Las muestras con *Rsa* I y *Hinf* I se incubaron durante 24 horas en baño María a 37 °C para la digestión del fragmento
- La enzima *Bst*O I se incubó durante 24 horas en baño María a 60 °C para la digestión del fragmento

Los productos de digestión fueron concentrados mediante el concentrador 50301 Eppendorf en volúmenes de 10 µl. El volumen total de las digestiones fue corrido mediante electroforesis durante 45 minutos a 90 Volts en geles de agarosa al 3% y fueron teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml durante 10 minutos para su observación en un transiluminador UVP de luz ultravioleta de onda corta.

## V. RESULTADOS

### 1. Titulación de los VNC

En 11 de las cepas consideradas como lentogénicas se obtuvieron títulos que fluctuaron de 1:64 a 1:4096 (B1, La Sota, Queensland V4, S-1, S-2, 08, 97-436, 98-082, 98-085, 98-220 y 01-050) En 2 de las cepas consideradas como mesogénicas se obtuvieron títulos de 1:16 y 1:256 (Ishii y Miyadera respectivamente) En 13 de las cepas consideradas como velogénicas se obtuvieron títulos que fluctuaron de 1:128 a 1:2048 (Chimalhuacán, Querétaro, Torreón, 048, 98-034, 98-053, 98-058, 98-064, 00-006, 00-033, 00-058, 00-063 y 01-013) (Cuadro 1)

### 2. Dosis Letal 50% en embrión de pollo

En 11 de las cepas consideradas como lentogénicas se obtuvieron títulos que fluctuaron de  $10^{5.7}$  a  $10^{7.9}$  (B1, La Sota, Queensland V4, S-1, S-2, 08, 97-436, 98-082, 98-085, 98-220 y 01-050) En 2 de las cepas consideradas como mesogénicas se obtuvieron títulos de  $10^{6.9}$  y  $10^{7.1}$  (Ishii y Miyadera respectivamente) En 13 de las cepas consideradas como velogénicas se obtuvieron títulos que fluctuaron de  $10^{7.3}$  a  $10^{9.1}$  (Chimalhuacán, Querétaro, Torreón, 048, 98-034, 98-053, 98-058, 98-064, 00-006, 00-033, 00-058, 00-063 y 01-013) (Cuadro 2)

### 3. Unidades formadoras de placa

En 11 de las cepas consideradas como lentogénicas (B1, La Sota, Queensland V4, S-1, S-2, 08, 97-436, 98-082, 98-085, 98-220 y 01-050) no se observó la formación de placas; sin embargo, se observó la formación de sincitios (Figura 1) En 2 de las cepas consideradas como mesogénicas (Ishii y Miyadera) se observó la formación de placas chicas homogéneas de 3 mm aproximadamente (Figura 2) En 9 de las cepas consideradas como velogénicas (Chimalhuacán, Querétaro, Torreón, 98-034, 98-058, 00-006, 00-033, 00-058, y 01-013) se observó la formación de placas grandes homogéneas de 3 y 5 mm

aproximadamente (Figura 3); sin embargo, en otras 4 cepas también consideradas velogénicas (048, 98-053, 98-064, y 00-063) se observó la formación de placas chicas homogéneas de 3 mm aproximadamente (Figura 4).

#### 4. Análisis de enzimas de restricción del gen *f*

Se obtuvo la amplificación de un fragmento de 1349 pb correspondiente a una fracción del gen *f* del VNC de todas las cepas analizadas (Figura 5) Mediante la comparación de los RFLP's se observó que de las 19 cepas analizadas 7 (36.84 %) mostraron los mismos patrones de la cepa Torreón (Figura 6); 1 (5.26 %) mostró el mismo patrón de la cepa Chimalhuacán (Figura 7); 6 (31.57 %) mostraron los mismos patrones de la cepa La Sota (Figura 8), y ninguna de las 19 cepas (0.00 %) mostraron patrones similares al de las cepas de referencia Ishii, Miyadera, Queensland V4 y Querétaro Sin embargo, 5/19 (26.31 %) tuvieron RFLP's distintos al de las cepas de referencia analizadas, dentro de las cuales 3 de ellas mostraron los mismos RFLP'S (Figura 9 y 10; Cuadro 3)

## VI. DISCUSIÓN

EN el caso de la virología el término de cepa se utiliza para denominar a un aislamiento bien caracterizado o de algunas características importantes de un virus; teniendo como uno de los objetivos la agrupación de virus similares En el caso particular del VNC, esto permite la distinción entre virus de alta y baja patogenicidad para pollos<sup>12</sup>

Una de las primeras investigaciones que se realizó al VNC para poder distinguir entre diferentes cepas fue mediante pruebas de virulencia Hanson y Brandly<sup>13</sup>, agruparon las cepas de VNC en velogénicas, mesogénicas y lentogénicas basados en la mortalidad embrionaria, después de la inoculación de embriones de pollo vía cavidad alantoidea Otras pruebas que se han utilizado para distinguir entre diferentes cepas del VNC, se enfocan a los signos clínicos y mortalidad de las aves infectadas



aproximadamente (Figura 3); sin embargo, en otras 4 cepas también consideradas velogénicas (048, 98-053, 98-064, y 00-063) se observó la formación de placas chicas homogéneas de 3 mm aproximadamente (Figura 4).

#### 4. Análisis de enzimas de restricción del gen *f*

Se obtuvo la amplificación de un fragmento de 1349 pb correspondiente a una fracción del gen *f* del VNC de todas las cepas analizadas (Figura 5) Mediante la comparación de los RFLP's se observó que de las 19 cepas analizadas 7 (36.84 %) mostraron los mismos patrones de la cepa Torreón (Figura 6); 1 (5.26 %) mostró el mismo patrón de la cepa Chimalhuacán (Figura 7); 6 (31.57 %) mostraron los mismos patrones de la cepa La Sota (Figura 8), y ninguna de las 19 cepas (0.00 %) mostraron patrones similares al de las cepas de referencia Ishii, Miyadera, Queensland V4 y Querétaro Sin embargo, 5/19 (26.31 %) tuvieron RFLP's distintos al de las cepas de referencia analizadas, dentro de las cuales 3 de ellas mostraron los mismos RFLP'S (Figura 9 y 10; Cuadro 3)

## VI. DISCUSIÓN

EN el caso de la virología el término de cepa se utiliza para denominar a un aislamiento bien caracterizado o de algunas características importantes de un virus; teniendo como uno de los objetivos la agrupación de virus similares En el caso particular del VNC, esto permite la distinción entre virus de alta y baja patogenicidad para pollos<sup>12</sup>

Una de las primeras investigaciones que se realizó al VNC para poder distinguir entre diferentes cepas fue mediante pruebas de virulencia Hanson y Brandly<sup>13</sup>, agruparon las cepas de VNC en velogénicas, mesogénicas y lentogénicas basados en la mortalidad embrionaria, después de la inoculación de embriones de pollo vía cavidad alantoidea Otras pruebas que se han utilizado para distinguir entre diferentes cepas del VNC, se enfocan a los signos clínicos y mortalidad de las aves infectadas



Las formas de caracterizar a los VNC se encuentran relacionadas con las actividades biológicas de los paramixovirus. La capacidad del VNC para aglutinar eritrocitos se debe a la unión de la proteína HN a los receptores sobre su superficie <sup>12</sup>. Esta propiedad y la inhibición específica de aglutinación por antisueros, son instrumentos muy útiles en el diagnóstico de la ENC. También la prueba de HI permite cuantificar anticuerpos contra la ENC. Sin embargo, la presencia de los anticuerpos específicos en el suero de un ave no aporta información para conocer la infectividad de las cepas del VNC <sup>12</sup>. La titulación de los VNC a través de la utilización de la técnica de hemoaglutinación en placa se basa en la capacidad del VNC de llevar a cabo una aglutinación de los eritrocitos la cual no es considerada muy precisa, pero resulta muy fácil de obtener y proporciona indicaciones sobre la cantidad de viriones presentes en una muestra de manera relativa <sup>19</sup>. A menudo el título obtenido a través de la hemoaglutinación y de la prueba de HI puede variar de manera considerable debido al manejo de las muestras analizadas, destacando el período de incubación entre el antígeno-anticuerpo, dando como resultado títulos distintos entre diferentes laboratorios <sup>20</sup>. La titulación de 12 cepas del VNC evaluado por Beard y colaboradores <sup>20</sup> realizado en 10 laboratorios distintos de los Estados Unidos de América muestra que el período de tiempo de congelación y descongelación, así como la persona que desarrolla la técnica influye en los resultados obtenidos en donde los títulos variaron entre 1:256 a 1:1024 de una misma cepa analizada. En el caso de las 26 cepas analizadas durante esta investigación donde los títulos obtenidos de cada una de las cepas analizadas estuvieron dentro de un rango de 1:16 hasta 1:4096, se puede explicar debido a la congelación y descongelación constante de las cepas a partir de una temperatura de almacenamiento de  $-85^{\circ}\text{C}$  entre otros factores, aunado a que la titulación con el método de hemoaglutinación en placa se realizó en grupos de 5 cepas por semana, lo cual podría ocasionar la pérdida de potencia de las cepas. Los títulos de los virus varían cada semana según la temperatura de almacenamiento y el manejo constante las cepas, permitiendo que estas bajen su título a medida que pasa el tiempo <sup>11</sup>, de tal manera que los títulos varían ampliamente, impidiendo realizar una caracterización exacta de las cepas.

La técnica de UFP descrita por Scholer y colaboradores <sup>22</sup> se utiliza para caracterizar los VNC de acuerdo al tamaño y morfología de las placas <sup>12,15</sup>. Las placas

formadas pueden ser de dos tipos morfológicos: claros u oscuros, y el tamaño producido se relaciona con la virulencia del VNC. Sin embargo, las cepas consideradas como lentogénicas no forman placas en los cultivos celulares a menos que a estos se les agregue dietilaminoetil (DEAE) y magnesio como iones<sup>+</sup> o tripsina, debido a la falta de desdoblamiento de la proteína F durante la infección<sup>12,15</sup>. La habilidad de formar placas en cultivos celulares como en el cultivo de fibroblastos de embrión de pollo se encuentra relacionada con la proteína F encargada de la fusión de las membranas celular y viral permitiendo la entrada a la célula del RNA viral. La fusión que se presenta entre las células infectadas con el VNC se conoce con el nombre de sincitios la cual puede dar lugar a la formación de placas<sup>21</sup>. Aunque las cepas lentogénicas del VNC no forman placas; sin embargo, pueden provocar efectos citopáticos en los cultivos celulares como la formación de sincitios sin causar muerte celular. Las cepas mesogénicas analizadas por Reeve<sup>21</sup> y Scholer<sup>22</sup> forman placas de 3 mm de diámetro mientras que las cepas velogénicas forman placas que varían de 3 a 5 mm de diámetro<sup>22</sup>, donde la presencia de placas de diferentes tamaños en un mismo cultivo celular fue un indicativo de que la muestra se encontraba mezclada con cepas de diferente virulencia<sup>21,22</sup>. De las 26 cepas analizadas en esta investigación se observó que las dos cepas mesogénicas (Ishii y Miyadera) formaron placas de aproximadamente 3 mm de diámetro; mientras que en 13 de las cepas velogénicas (Chimalhuacán, Querétaro, Torreón, 98-034, 00-033, 048, 98-053, 98-058, 98-064, 00-006, 00-058, 00-063 y 01-013) mostraron placas tanto de 3 mm como de 5 mm de diámetro de manera homogénea; mostrando que cada una de las cepas trabajadas en esta investigación fueron cepas puras y no se encontraban mezcladas. El tamaño de las placas observado corresponde con las investigaciones realizadas por Schloer y colaboradores<sup>22</sup> donde se demuestra que el tamaño de las placas se relaciona con la virulencia de las cepas; es decir que mientras más virulentas son las cepas, estas forman placas de mayor tamaño y viceversa. Sin embargo, el tamaño de las placas aun entre cepas consideradas como velogénicas puede variar de acuerdo a la virulencia entre cada una de las cepas<sup>21,22</sup>. Aunque la técnica de UFP es útil para caracterizar cepas del VNC esta técnica no permite una identificación exacta únicamente en base a el tamaño de las placas<sup>22</sup>.

Una forma de conocer la virulencia entre las diferentes cepas del VNC es la realización de pruebas cuantitativas. Las pruebas cuantitativas se basan en la respuestas positivas y el número total de respuestas posibles. En cada individuo se lee una respuesta todo o nada, es decir, positiva o negativa sin existir calificaciones intermedias<sup>18</sup>. La virulencia se mide como la dosis que determina una respuesta positiva. Dentro de las pruebas cuantitativas existe la DL 50% que permite conocer el título en el cual una cepa mata el 50% de los individuos desafiados, con el fin de conocer la letalidad que existe entre las distintas cepas<sup>18,23</sup>. Los resultados observados durante esta investigación mediante el uso de la DL 50% muestran títulos que van de  $10^{5.7}$  a  $10^{9.1}$ , títulos que demuestran que mientras más patógena es una cepa en el caso del VNC más alto se obtendrá el título ya que mientras más virulenta es una cepa esta causa mayor mortalidad embrionaria<sup>11</sup>. La rápida replicación viral en el caso de las cepas velogénicas y mesogénicas se relaciona con la proteína F que es desdoblada por las proteasas de la célula huésped en F1 y F2, permitiendo que las partículas virales de progenie sean infectantes a diferencia de las cepas lentogénicas que no desdoblan la proteína F<sup>12</sup>. Los resultados de esta investigación sugieren que existe una relación entre la DL 50% y las UFP ya que mientras más alto es el título que se presenta en la DL 50% mayor es el tamaño de las placas que se observan.

El uso de la técnica de aislamiento viral como prueba diagnóstica rutinaria tiene severas limitaciones. Los procedimientos generalmente son lentos y en ocasiones requieren de múltiples pases para llegar a un diagnóstico. Cuando se obtiene un resultado positivo a través del aislamiento viral han pasado por lo menos 4 días, tiempo en el cual los animales se han recuperado o bien han muerto<sup>24</sup>. En el caso de las aves la ENC presenta una morbilidad e incluso una mortalidad muy elevadas, dependiendo de la virulencia de la cepa que se encuentre afectando un brote y para cuando se obtiene el diagnóstico positivo a la ENC las aves probablemente han muerto, pudiendo ocasionar la presencia de nuevos brotes, debido al movimiento de aves portadoras con infecciones inaparentes de un lugar a otro o por el movimiento de equipo de una granja a otra<sup>3,12,15,25</sup>. El aislamiento viral es una técnica efectiva; sin embargo, se requieren métodos más rápidos que permitan obtener un diagnóstico de la ENC en el menor tiempo posible y que permita la diferenciación entre las distintas cepas del VNC<sup>25</sup>.

El avance de las técnicas moleculares en la última década, ha permitido la introducción de estas en el área diagnóstica, siendo relativamente fáciles de realizar y permitiendo un diagnóstico específico. La técnica de RT-PCR seguida del análisis de enzimas de restricción es utilizada por varios investigadores para diferenciar entre las distintas cepas del VNC.<sup>16</sup> A partir del análisis con enzimas de restricción se observó que de las 19 cepas analizadas 7 (36.84 %) mostraron los mismos patrones de la cepa Torreón; 1 (5.26 %) mostraron los mismos patrones de la cepa Chimalhuacán; 6 (31.57 %) mostraron los mismos patrones de la cepa La Sota, y ninguna de las 19 cepas (0.00 %) mostró patrones similares al de las cepas de referencia Ishii, Miyadera, Queensland V4 y Querétaro. Sin embargo, 5/19 (26.31 %) tuvieron RFLP's distintos al de las cepas de referencia analizadas dentro de las cuales 3 de ellas mostraron los mismos RFLP'S. Las cepas de referencia Chimalhuacán y Querétaro son cepas que se encontraban presentes en la República Mexicana durante la década de los años 50's; y el que 5 de las cepas analizadas no hayan coincidido con ninguna de las cepas de referencia utilizadas en esta investigación indica que a través de los años se han encontrado cepas distintas del VNC, como consecuencia del desarrollo y crecimiento de la industria avícola. Sin embargo, para poder determinar si estas 5 cepas se encuentran relacionadas con otras cepas del VNC o bien para conocer la presencia de nuevas cepas en la República Mexicana es necesario la realización de un análisis de secuenciación de aminoácidos a partir de la amplificación del fragmento de 1349 pb obtenido de ellas.

En la presente investigación se obtuvo un resultado positivo a la ENC en un tiempo de 24 horas mediante la utilización de la técnica de RT-PCR a diferencia de otras técnicas de laboratorio que requieren más de 24 horas para realizar un aislamiento positivo de la ENC; así mismo, el análisis de enzimas de restricción utilizado en esta investigación permite revelar la identidad de la cepa que se encuentra afectando un brote en un período de 48 horas después de haber realizado la técnica de RT-PCR.

Actualmente las cepas del VNC están divididas de I a VIII genotipos de acuerdo al tamaño de los RFLP's, con base en el análisis de enzimas de restricción del gen *f*<sup>9,10</sup>. De las cepas utilizadas y reconocidas internacionalmente como cepas de referencia Queensland

V4 pertenece al genotipo I, La Sota pertenecen al genotipo II; Ishii y Miyadera pertenecen al genotipo III. Mientras que las cepas Chimalhuacán, Querétaro y Torreón usadas como cepas de referencia nacionales se agrupan dentro del genotipo II. El genotipo II incluye algunas cepas vacunales y la mayoría de los aislamientos realizados en el continente Americano, independientemente de su virulencia se caracterizan por la presencia de corte en la posición del nucleótido 1160 con la enzima *Rsa* I, o bien por la ausencia de corte en la posición del nucleótido 752 con la enzima *Bst*O I<sup>9</sup>. Para poder realizar la diferenciación entre cepas virulentas y no virulentas, independientemente del genotipo al que pertenezcan las cepas, se puede utilizar la técnica de RT-PCR utilizando iniciadores que sean representativos de la proteína F de cepas virulentas y no virulentas respectivamente<sup>25</sup>. Seis de las cepas analizadas (97-436, 98-082, 98-085, 98-220, 048 y B1) mostraron el mismo patrón que la cepa de referencia La Sota agrupándolas por lo tanto dentro del genotipo II. Una de las cepas analizadas (01-013) mostró el mismo patrón que la cepa de referencia Chimalhuacán y 7 de las cepas analizadas (98-034, 98-053, 98-058, 98-064, 00-006, 00-058 y 00-063) mostraron el mismo patrón de la cepa de referencia Torreón, agrupándolas también dentro del genotipo II al cumplir con las características arriba mencionadas. De las 19 cepas con las que se trabajaron una se encontraba identificada como la cepa vacunal B1 y mediante el uso del análisis de restricción se demostró que esta cepa en realidad era otra cepa vacunal conocida como La Sota. Este análisis permitió, sin lugar a duda, identificar una cepa. Sin embargo, 5 de las cepas no coincidieron con ninguna de las cepas de referencia, lo cual indica que la falta de una vacunación adecuada y la falta de bioseguridad han permitido la aparición de distintas cepas del VNC. Es necesario realizar un análisis de secuencia para determinar si estas se encuentran relacionadas con otras cepas del VNC o para poder conocer la introducción de cepas distintas del VNC en México.

Las pruebas de titulación del VNC, DL 50% y UFP son marcadores útiles y guías de la importancia de un aislamiento y caracterización del VNC. Sin embargo, no aportan mayor información y no indican las relaciones epidemiológicas entre las cepas con la misma virulencia. Ciertas propiedades moleculares del VNC, son consideradas de gran utilidad para la diferenciación entre cada una de las cepas mediante el uso de técnicas de RT-PCR y análisis de restricción de la proteína F. A través de la utilización de técnicas

moleculares es posible conocer las diferentes cepas que se encuentran presentes en las diferentes panzootias que se han presentado en el mundo. De igual manera la evaluación filogenética de cada una de las cepas del VNC basada en la secuenciación completa del gen *f* muestra la distancia evolutiva en el desarrollo de las cepas.

## V. CONCLUSIONES

- 1 La prueba de HA mostró que los títulos obtenidos son sujetos de varios factores inespecíficos y no aportan información de la virulencia de la cepa del VNC analizada.
- 2 Las pruebas de UFP y DL50% no aportan información exacta de la cepa que se encuentra afectando un brote.
- 3 La técnica de RFLP's permite una diferenciación entre cada una de las cepas del VNC.
- 4 La técnica de RFLP's permite clasificar a las cepas del VNC en VII genotipos distintos y dependiendo del tamaño del fragmento amplificado del gen *f*, permite diferenciar a las cepas en lentogénicas, velogénicas y mesogénicas.
- 5 El análisis de enzimas de restricción indicó que a través de los años se han ido encontrando distintas cepas en la República Mexicana como consecuencia del desarrollo y crecimiento de la industria avícola.
- 6 El análisis de secuenciación es necesario para poder determinar si de las 5 cepas que no coincidieron con ninguna de las cepas de referencia utilizadas, se encuentran relacionadas con otras cepas del VNC, o bien para conocer la presencia de nuevas cepas en la República Mexicana.
7. El avance en las técnicas moleculares permite realizar diagnósticos de manera más rápida y exacta en 24 horas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

moleculares es posible conocer las diferentes cepas que se encuentran presentes en las diferentes panzootias que se han presentado en el mundo. De igual manera la evaluación filogenética de cada una de las cepas del VNC basada en la secuenciación completa del gen *f* muestra la distancia evolutiva en el desarrollo de las cepas.

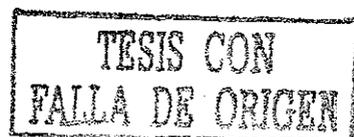
## V. CONCLUSIONES

- 1 La prueba de HA mostró que los títulos obtenidos son sujetos de varios factores inespecíficos y no aportan información de la virulencia de la cepa del VNC analizada.
- 2 Las pruebas de UFP y DL50% no aportan información exacta de la cepa que se encuentra afectando un brote.
- 3 La técnica de RFLP's permite una diferenciación entre cada una de las cepas del VNC.
- 4 La técnica de RFLP's permite clasificar a las cepas del VNC en VII genotipos distintos y dependiendo del tamaño del fragmento amplificado del gen *f*, permite diferenciar a las cepas en lentogénicas, velogénicas y mesogénicas.
- 5 El análisis de enzimas de restricción indicó que a través de los años se han ido encontrando distintas cepas en la República Mexicana como consecuencia del desarrollo y crecimiento de la industria avícola.
- 6 El análisis de secuenciación es necesario para poder determinar si de las 5 cepas que no coincidieron con ninguna de las cepas de referencia utilizadas, se encuentran relacionadas con otras cepas del VNC, o bien para conocer la presencia de nuevas cepas en la República Mexicana.
7. El avance en las técnicas moleculares permite realizar diagnósticos de manera más rápida y exacta en 24 horas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VI. LITERATURA CITADA

- 1 Solis S Situación de la campaña nacional contra la enfermedad de Newcastle Memorias del Curso “Enfermedades emergentes: Enfermedad de Newcastle”; 2000 julio 14; México, D F México (D F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México A C; 2000: 20-22
- 2 Fehérvári I Estrategias y control de la enfermedad de Newcastle en otros países Memorias del Curso “Enfermedades emergentes: Enfermedad de Newcastle”; 2000 julio 14; México, D F México (D F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México A C; 2000: 1-7
- 3 Monrroy LJF Epidemiología de la Enfermedad de Newcastle velogénica viscerotrópica Memorias del Curso “Enfermedades emergentes: Enfermedad de Newcastle”; 2000 julio 14; México, D F México (D F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México A C; 2000: 12-15
- 4 Lucio B Panorama de la enfermedad de Newcastle en México Vet Mex 1974; 7: 30-34
- 5 Sánchez WC Repercusiones económicas y políticas del brote de Newcastle en la Comarca Lagunera Memorias del Curso “Enfermedades emergentes: Enfermedad de Newcastle”; 2000 julio 14; México, D F México (D F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México A C; 2000: 16-19
- 6 Estudillo J Algunas consideraciones sobre la enfermedad de Newcastle Memorias del Curso “Enfermedades emergentes: Enfermedad de Newcastle”; 2000 julio 14; México, D F México (D F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México A C; 2000: 29-35
- 7 Estudillo J La enfermedad de Newcastle en México. Memorias del Curso “Enfermedades emergentes: Enfermedad de Newcastle; 2000 julio 14; México, D F México (D F): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México A C; 2000: 36-42
- 8 Seal BS, King DJ, Meinersmann Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the paramyxoviridea Virus Research 2000; 66: 1-11



- 9 Ballagi-Pordány A, Wehmann E, Herczeg J, Belák, Lomniczi B Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of region from the F gene Arch Virol 1996; 141: 243-261.
- 10 Lomniczi B, Wehmann E, Herczeg J, Ballagi-Pordány A, Kaleta EF, Werner O, Moulemans G, Jorgensen PH, Manté AP, Gielkens ALJ, Capua I, Damoser J Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and novel genotype (VII) Arch Virol 1998; 143: 49-54
- 11 Allan WH, Lancaster JE, Ióth B Vacunas contra la enfermedad de Newcastle. Roma (Italia) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) 1980
- 12 Calnek BW, Alexander DJ Newcastle disease and other paramyxovirus infections In: Calnek BW, Barnes HJ, Berad CW, Reid MW, Yoder WH, editors Diseases of poultry, 9<sup>th</sup> ed Ames (Iowa): Iowa State University Press, 1997: 555-584
- 13 Hanson RP, Brandly CA. Identification of Newcastle disease virus Science 1955; 122: 156-157
- 14 Méndez HJA Características diferenciales de algunas cepas del virus de la enfermedad de Newcastle (tesis de licenciatura) México (D F ) Facultad de Química IPN, 1995
- 15 Alexander DJ Newcastle disease In: Hitchner BS, editor. A laboratory Manual for the isolation and identification of avian pathogens The American Association of Avian Pathologist 3<sup>rd</sup> ed; New Bolton Center (Pennsylvania): 1993:114-120
- 16 Nanthakumar I, Kataria RS, Iiwari AK, Butchaiah G, Kataria JM. Pathotyping of Newcastle Disease Viruses by RT-PCR and Restriction Enzyme Analysis Vet Res Comm 2000; 24: 275-286
- 17 Villegas P Laboratory Manual Avian virus diseases Athens (Georgia): The University of Georgia Press, 1998
- 18 Cunningham CH A laboratory Guide in Virology. 7<sup>th</sup> ed Minneapolis (Minnesota): Burgess Publishing Co; 1973.
- 19 Coll MJ Técnicas de diagnóstico en virología Madrid (España): Díaz de Santos ediciones, 1993

- 20 Beard CW, Wilkes WJ A comparison of Newcastle disease hemagglutination-inhibition test results from diagnostic laboratories in the southeastern United States *Avian Dis* 1985; 29: 1048-1056
- 21 Reeve P, Poste G Studies of the Cytopathogenicity of Newcastle Disease Virus: Relationship Between Virulence, Polykaryocytosis and Plaque Size *J Gen Virol* 1971; 11: 17-21.
- 22 Scholer G, Hanson RP Plaque morphology of Newcastle disease virus as Influenced by cell type and Environmental Factors *Am J Vet Res* 1968; 29: 883-895
- 23 Villegas P, Graham PH Titration of Biological Suspensions In: Hitchner BS, editor *A laboratory Manual for the isolation and identification of avian pathogens* The American Association of Avian Pathologist 3<sup>rd</sup> ed New Bolton Center (Pennsylvania), 1993:186-191
- 24 Gough RE, Alexander DJ Collins MS, Lister SA, Coc WJ Routine virus isolation or detection in the diagnosis of diseases in birds *Avian Pathol* 1988; 17: 893-907
- 25 Kant A, Koch DJ, Roozelaar V, Balk F, Huurne A. Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction *Avian Pathol* 1997; 26: 837-849
- 26 Velázquez EA, Aceves FA, Temblador AS, García MA, Simorth LH, Hernández SR, González GR Características de algunas cepas del virus de la enfermedad de Newcastle aisladas en México *Memorias del Symposium de las enfermedades respiratorias de las aves, 1964* México, D F. México (D F): Oficina de Estudios Especiales, S A G, 1964: 103-109.
- 27 Lara FAM *Estudio de algunas características del virus de la enfermedad de Newcastle* *Memorias del I Symposium de la enfermedad de Newcastle, 1960* México, D F México (D F): Oficina de Estudios Especiales, S A G, 1960: 14-20

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 1. Titulación del VNC<sup>A</sup> mediante el método de HA<sup>B</sup> en placa.

HA <sup>B</sup>			HA <sup>B</sup>		
No.	Cepas	Título	No.	Cepas de Referencia	Título
1	97-436	1:1024	20	Chimalhuacán	1:128
2	98-034	1:1024	21	Ishii	1:16
3	98-053	1:2048	22	Queensland V4	1:256
4	98-058	1:2048	23	Querétaro	1:1024
5	98-064	1:512	24	La Sota	1:1024
6	98-082	1:4096	25	Miyadera	1:256
7	98-085	1:4096	26	Torreón	1:256
8	98-220	1:1024			
9	00-006	1:2048			
10	00-033	1:512			
11	00-058	1:2048			
12	00-063	1:128			
13	01-013	1:512			
14	01-050	1:1024			
15	08	1:2048			
16	048	1:1024			
17	B1	1:64			
18	S-1	1:256			
19	S-2	1:256			

Método utilizado: hemoaglutinación en placa

<sup>A</sup> Virus de Newcastle

<sup>B</sup> Hemoaglutinación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2. Titulación del VNC<sup>A</sup> mediante la técnica DL 50%<sup>B</sup>.

DL 50% <sup>B</sup>			DL 50% <sup>B</sup>		
No.	Cepas	Título	No.	Cepas de Referencia	Título
1	97-436	10 <sup>6.9</sup>	20	Chimalhuacán	10 <sup>7.7</sup>
2	98-034	10 <sup>8.1</sup>	21	Ishii	10 <sup>7.1</sup>
3	98-053	10 <sup>8.7</sup>	22	La Sota	10 <sup>5.9</sup>
4	98-058	10 <sup>8.1</sup>	23	Miyadera	10 <sup>6.9</sup>
5	98-064	10 <sup>8.5</sup>	24	Queensland V4	10 <sup>5.7</sup>
6	98-082	10 <sup>7.9</sup>	25	Querétaro	10 <sup>8.9</sup>
7	98-085	10 <sup>7.9</sup>	26	Torreón	10 <sup>7.7</sup>
8	98-220	10 <sup>6.3</sup>			
9	00-006	10 <sup>8.7</sup>			
10	00-033	10 <sup>8.5</sup>			
11	00-058	10 <sup>8.3</sup>			
12	00-063	10 <sup>7.3</sup>			
13	01-013	10 <sup>8.3</sup>			
14	01-050	10 <sup>7.1</sup>			
15	08	10 <sup>7.9</sup>			
16	048	10 <sup>9.1</sup>			
17	B1	10 <sup>5.7</sup>			
18	S-1	10 <sup>6.1</sup>			
19	S-2	10 <sup>6.1</sup>			

Método utilizado: fórmula de Spearman Karber

<sup>A</sup> Virus de Newcastle

<sup>B</sup> Dosis letal 50%.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro 3. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción.**

<b>Cepas de Referencia</b>	<b>No. de cepas iguales</b>	<b>Porcentaje de correspondencia</b>	<b>Cepas con correspondencia</b>
Chimalhuacán	1/19	5.26 %	01-013
Ishii	0/19	0.00 %	---
La Sota	6/19	31.57 %	97-436, 98-082, 98-085, 98-220, 048 y B1
Miyadera	0/19	0.00 %	---
Queensland V4	0/19	0.00 %	---
Querétaro	0/19	0.00 %	---
Torreón	7/19	36.84 %	98-034, 98-053, 98-058, 98-064, 00-006, 00-058 y 00-063
Sin correspondencia	5/19	26.31 %	S-1, S-2, 00-033, 01-050 y 048

Método utilizado: análisis de enzimas de restricción de un fragmento del gen F

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

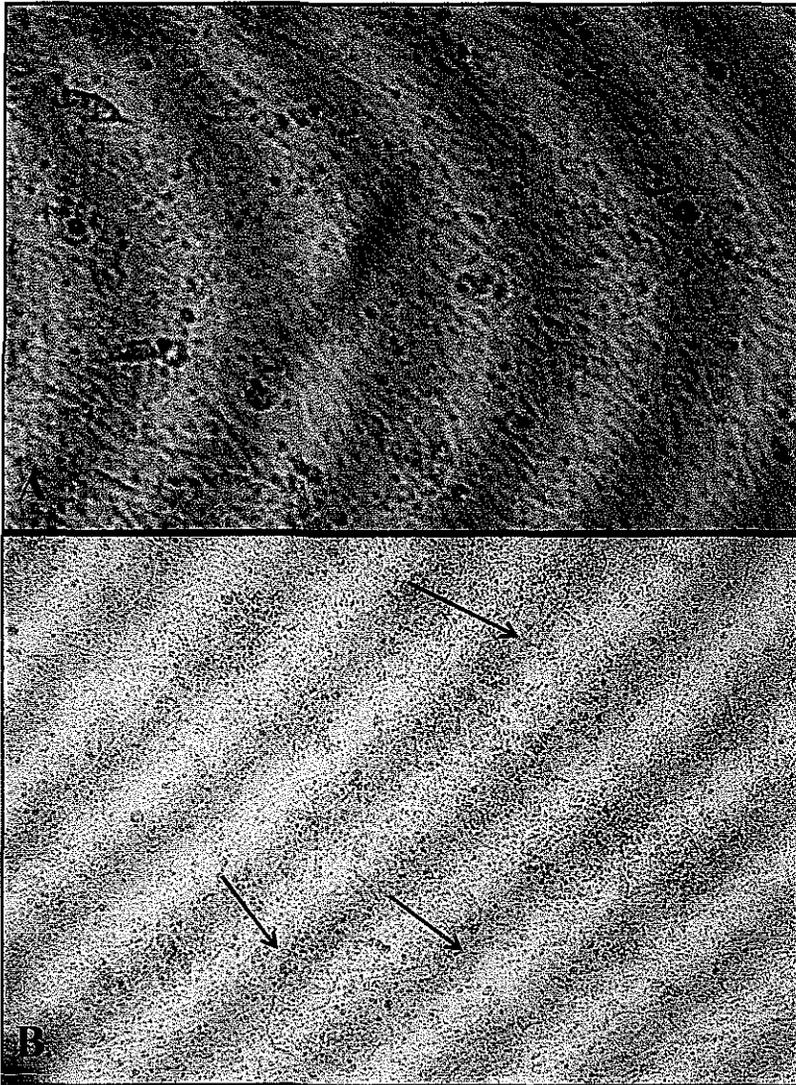


Figura 1. A) Cultivo de fibroblastos de embrión de pollo sin inocular. B) Sincitios (→) en fibroblastos de embrión de pollo inoculados con la cepa lentogénica 98-220.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

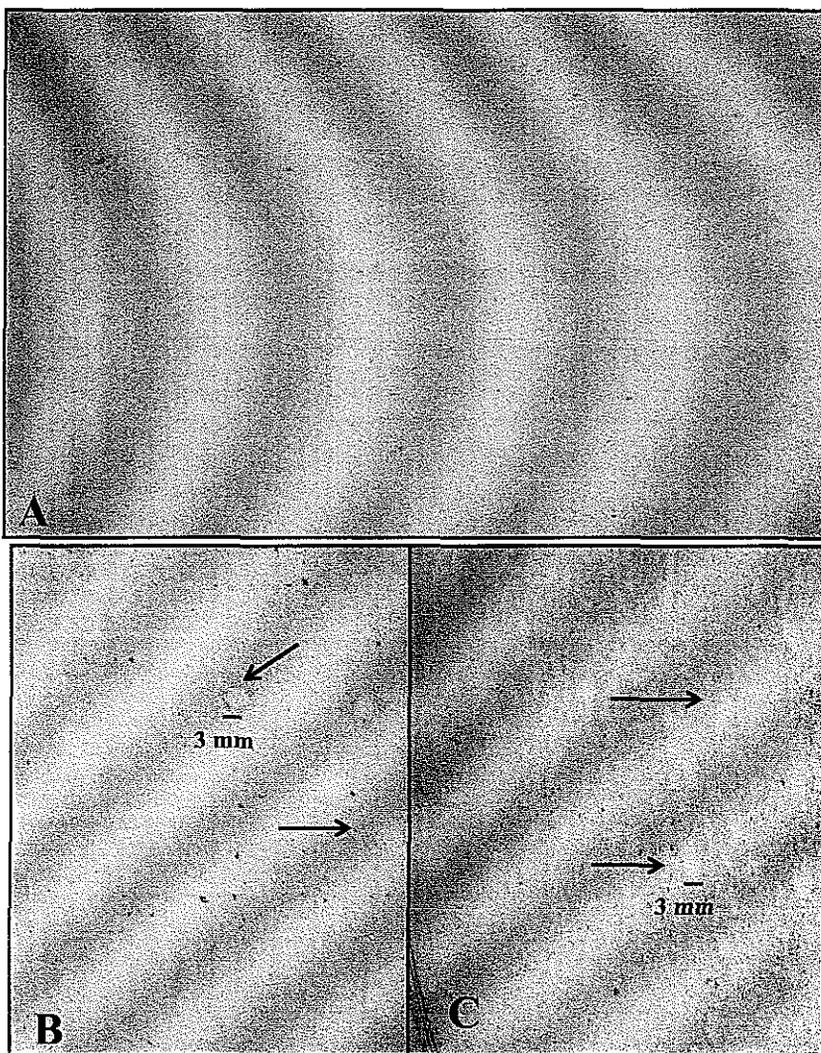


Figura 2. A) Cultivo de fibroblastos de embrión de pollo sin inocular. B) Formación de placas de aproximadamente 3 mm de diámetro (→) en fibroblastos de embrión de pollo inoculados con la cepa mesogénica Ishii. C) Formación de placas de aproximadamente 3 mm de diámetro (→) en fibroblastos de embrión de pollo inoculados con la cepa mesogénica Miyadera.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

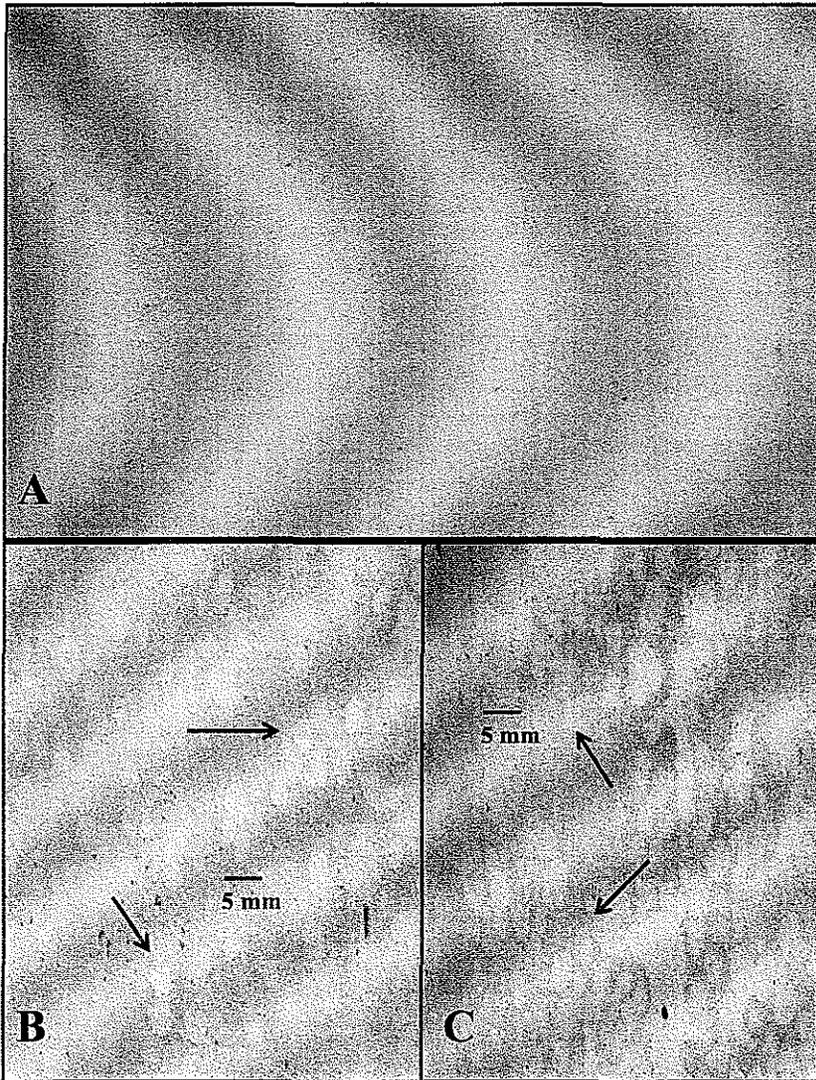


Figura 3. A) Cultivo de fibroblastos de embrión de pollo sin inocular. B) Formación de placas de aproximadamente 5 mm de diámetro (→) en fibroblastos de embrión de pollo inoculados con la cepa velogénica Torreón. C) Formación de placas de aproximadamente 5 mm de diámetro (→) en fibroblastos de embrión de pollo inoculados con la cepa velogénica 98-034.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

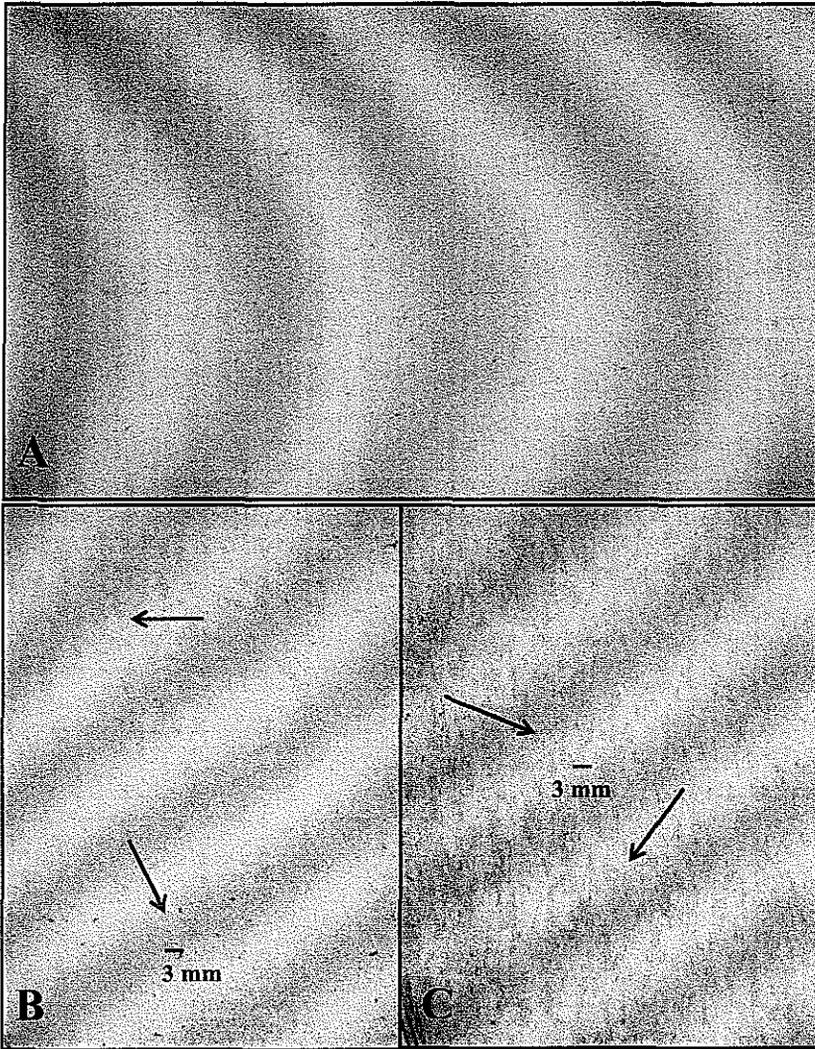
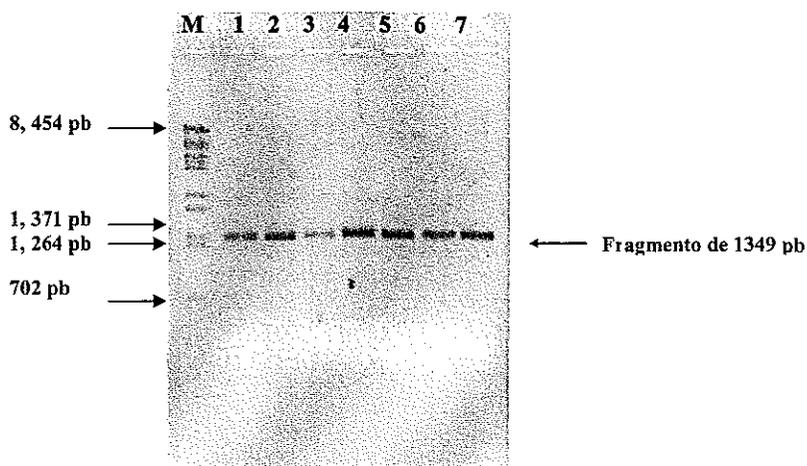


Figura 4. A) Cultivo de fibroblastos de embrión de pollo sin inocular. B) Formación de placas de aproximadamente 3 mm de diámetro (→) en fibroblastos de embrión de pollo inoculados con la cepa velogénica 98-053. C) Formación de placas de aproximadamente 3 mm de diámetro (→) en fibroblastos de embrión de pollo inoculados con la cepa velogénica 98-064.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 5. Amplificación de un fragmento de 1349 pb correspondiente a una fracción del gen F de 7 de las 26 cepas trabajadas.**

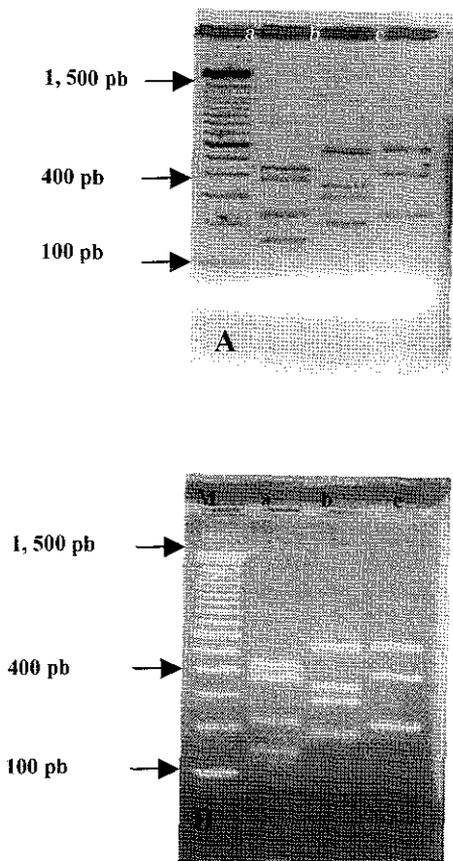


M Marcador de peso molecular lambda DNA digerida con *Bste* II

- 1 cepa 08.
- 2 cepa 98-058
- 3 cepa 01-050
- 4 cepa 01-013
- 5 cepa 048.
- 6 cepa 97-436
- 7 cepa 98-085

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

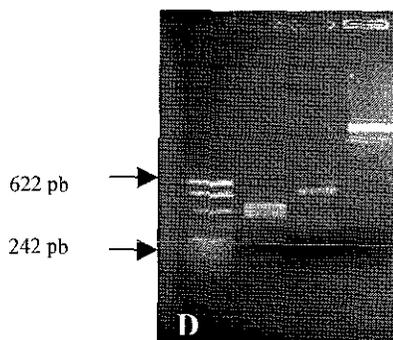
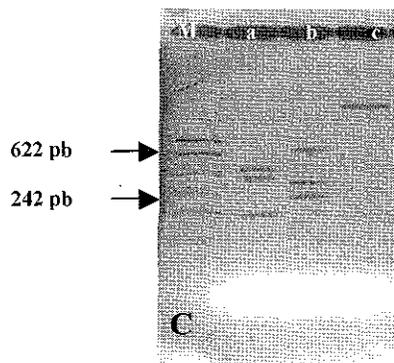
Figura 6. Fragmentos de restricción del producto de PCR de la cepa velogénica de referencia Torreón (A) y la cepa velogénica 00-006 (B).



Enzimas de restricción utilizadas *BstO* I (a), *Hinf* I (b) y *Rsa* I (c).  
M Marcador de peso molecular de 100 pb.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 7. Fragmentos de restricción del producto de PCR de la cepa velogénica de referencia Chimalhuacán (C) y la cepa 01-013 (D).

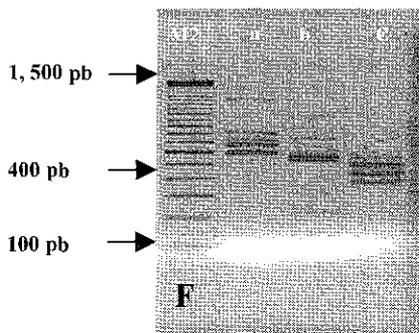
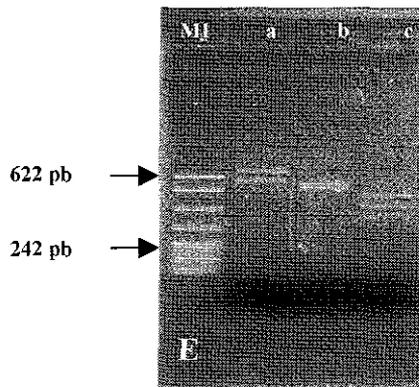


Enzimas de restricción utilizadas *Bst*O I (a), *Hinf* I (b) y *Rsa* I (c).

M Marcador de peso molecular pBR322 DNA digerido con *Msp* I

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 8. Fragmentos de restricción del producto de PCR de la cepa lentogénica de referencia La Sota (E) y la cepa 97-436 (F).**



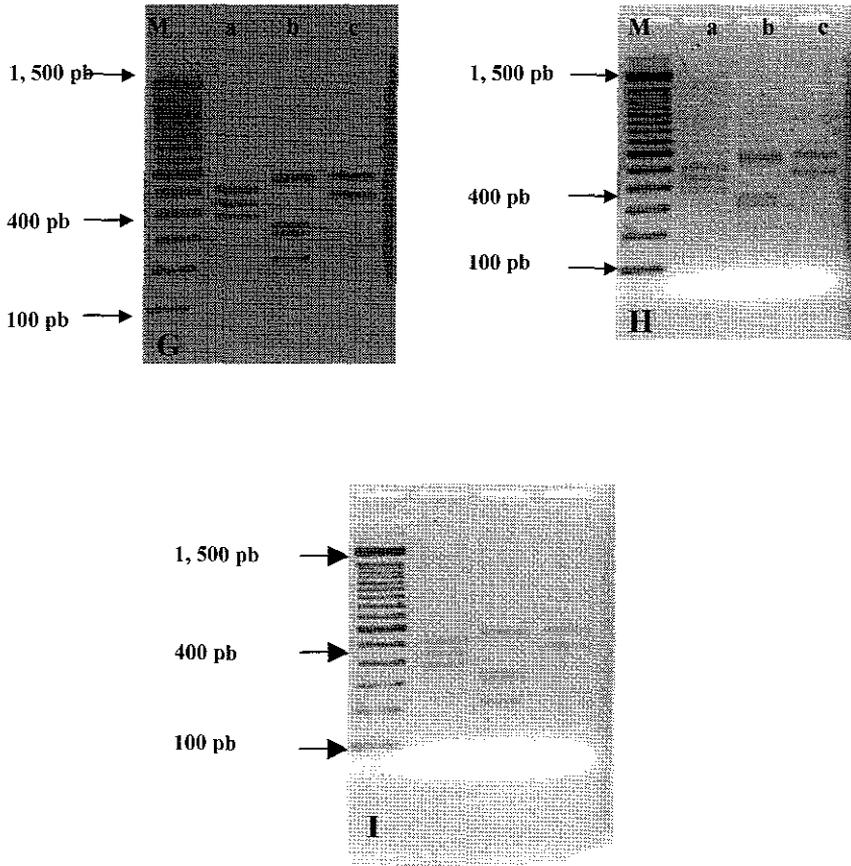
Enzimas de restricción utilizadas *BstO* I (a), *Hinf* I (b) y *Rsa* I (c)

**M1** Marcador de peso molecular pBR322 DNA digerido con *Msp* I

**M2** Marcador de peso molecular de 100 pb.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 9. Fragmentos de restricción del producto de PCR de las cepas S-1 (G), S-2 (H) y 01-050 (I) que coincidieron entre si, pero no correspondieron con las cepas de referencia analizadas.

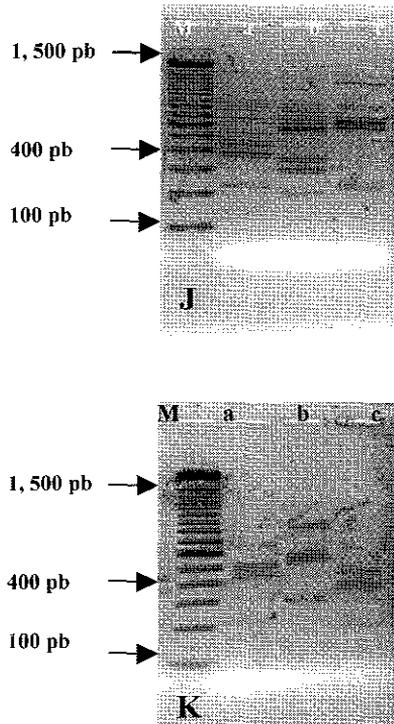


Enzimas de restricción utilizadas *Bst* I (a), *Hin* I (b) y *Rsa* I (c).  
**M** Marcador de peso molecular de 100 pb

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE  
 DE LA BIBLIOTECA

Figura 10. Fragmentos de restricción del producto de PCR de las cepas 048 (J) y 00-033 (k) que no correspondieron con las cepas de referencia analizadas.



Enzimas de restricción utilizadas *Bst*OI (a), *Hinf*I (b) y *Rsa*I (c).  
M Marcador de peso molecular de 100 pb.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN