



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ESTUDIO DE LA
PATOGENESIS DEL DAÑO ENDOTELIAL, MIELOIDE Y
LINFOIDE, DE AISLAMIENTOS MEXICANOS DEL
VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE
INOCULADOS EN POLLO DE ENGORDA COMERCIAL.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

PRESENTA:

RUBÉN MERINO GUZMÁN

TUTOR

NORMA LETICA CALDERÓN APODACA

COMITÉ TUTORAL

**HILDA VILLEGAS CASTREJÓN
JOSÉ ANTONIO QUINTANA LÓPEZ**

MÉXICO, D.F.

2010



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.

DEDICATORIAS

A mi esposa **Teresa Olivares Hernández** y mis hijos **Iván** y **Yael**, porque su amor y paciencia me alienta a seguir adelante, y porque saben que todos mis esfuerzos son para ellos. Los amo.

A mis padres **Nohemí Guzmán M.** y **Juan Merino B.**, porque con su gran esfuerzo me permitieron tener estudios universitarios y con el ejemplo me enseñaron a ser una buena persona y buscar la superación.

A mis hermanos **Elvira** y **Oscar**, mi cuñada **Esther**, mis sobrinos **Omar** y **Axa** porque siempre han tenido confianza en mí.

Al **bebé** de Oscar y Esther, que está librando una gran batalla. Tú puedes.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora y amiga, Dra. **Norma L. Calderón Apodaca**, por confiar en mí para la realización del proyecto y darme la libertad y motivación para desarrollarlo apropiadamente.

A mi comité tutorial:

Dra. **Hilda Villegas Castrejón**. Por su apoyo para la utilización de su laboratorio de microscopía electrónica, sus consejos y confianza.

Dr. **José Antonio Quintana López**, Por su amistad y su apoyo para conseguir la estancia de investigación en la Universidad de Georgia.

A los Dres. **Pedro Villegas**, **Francisco Perozo** y **Claudio Afonso**, por su apoyo para la realización de la parte molecular de este trabajo.

Al personal del laboratorio de morfología celular y molecular del Centro Nacional de Rehabilitación, especialmente al Biol. **Alberto Carlos Martínez** y Biol. **Alma Delia Hernández Pérez**, por su ayuda para la preparación y observación de los cortes de microscopía electrónica.

Al Dr. **Néstor Ledesma Martínez**, jefe del Departamento de Producción Animal: Aves, de la FMVZ – UNAM, por darme la autorización para realizar los estudios de doctorado y su paciencia para reincorporarme a mis labores docentes.

A todo el **Departamento de Producción Animal: Aves**, de la FMVZ – UNAM, por su ayuda para terminar con éxito este proyecto.

No ha sido Fácil:

Yo, vine creciendo y me forjé
cual mi generación distinta
a la de ayer.

Soy, continuidad de mi niñez,
que es hija del sudor
de los brazos que amé.

Soy como quisieron ser
pero tratando de ser yo,
ni menos mal
pero en verdad
ni menos bien.

No ha sido fácil tener
una opinión que haga
valer mi vocación
mi libertad para escoger.

Amo sin ver lo que en el futuro
tenga que acontecer
dejo al sentir más puro,
florecer.

Ámame sin temor alguno
que yo he de prometer
fidelidad a mi modo de ser.

Yo, yo sólo tengo la razón
de quien quisiera ser
mejor de lo que ayer.

Yo, pongo en tu mano el corazón
con toda mi virtud,
mi egoísmo también.

Sufre conmigo el error que cometeré
goza también lo que de bien
se ha de lograr sin pretender.

Sube conmigo a encontrar el escalón
que evocaré para llegar
a ese lugar que un día soñé.

Pablo Milanés

CONTENIDO

| | Página |
|---|--------|
| Índice | i |
| Índice de cuadros | iii |
| Índice de figuras | v |
| Abreviaturas | vii |
| Resumen | viii |
| Abstract | ix |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Revisión general de la enfermedad de Newcastle | 1 |
| Definición | 1 |
| Etiología | 1 |
| Respuesta inmune y protección contra la enfermedad | 6 |
| Lesiones histológicas | 7 |
| Situación de la enfermedad de Newcastle en México | 8 |
| Campaña de erradicación | 8 |
| Causas de los brotes | 9 |
| Prevención y control | 10 |
| Estudios sobre el virus velogénico en México | 11 |
| Trabajos realizados durante 2000-2009 | 11 |
| Estudios moleculares y análisis filogenéticos | 13 |
| JUSTIFICACIÓN | 15 |
| HIPÓTESIS | 15 |
| OBJETIVOS | 16 |
| Objetivo general | 16 |
| Objetivos particulares | 16 |
| METAS | 16 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 17 |
| Cepas virales | 17 |
| Determinación de la virulencia de los aislamientos virales | 17 |
| Tiempo medio de mortalidad embrionaria (TMME) | 17 |
| Índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) | 18 |
| Pruebas de Biología Molecular | 19 |
| RT-PCR | 19 |
| Secuencia de nucleótidos y análisis filogenético | 20 |
| Evaluación de la patogenicidad: tropismo endotelial, mieloide y linfoide de las cepas | 21 |

| | |
|--|----|
| velogénicas | |
| Obtención del inóculo viral | 21 |
| Animales de experimentación y alojamiento | 22 |
| Diseño experimental | 22 |
| Estudio histológico | 22 |
| Evaluación de cortes semi-finos y ultraestructurales | 23 |
| Estudio virológico | 24 |
| RESULTADOS | 25 |
| Tiempo medio de mortalidad embrionaria (TMME) | 25 |
| Índice de Patogenicidad Intracerebral (IPIC) | 25 |
| RT-PCR | 25 |
| Secuenciación del gen F | 25 |
| Caracterización biológica | 26 |
| Lesiones microscópicas | 27 |
| Cortes semi-finos de la médula ósea | 28 |
| Microscopía electrónica | 28 |
| Aislamiento viral | 29 |
| DISCUSIÓN | 30 |
| CONCLUSIONES | 39 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 40 |
| APÉNDICE | 82 |
| Publicaciones científicas derivadas del estudio | 82 |
| Perozo F, Merino R, Afonso CL, Villegas P, Calderon N. Biological and Phylogenetic Characterization of Virulent Newcastle Disease Virus Circulating in Mexico. Avian Dis 2008, 52(3): 472-479. | 83 |
| Merino R, Villegas H, Quintana JA, Calderon N. Characterization of Newcastle disease viruses isolated from chicken, gamefowl, pigeon and quail in Mexico. Vet Res Commun. 2009, 33(8):1023-1030. | 91 |

Índice de Cuadros

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Cepas velogénicas del VEN aisladas en México de 1946 a 1975 | 53 |
| Cuadro 2. Reporte de focos de EN velogénico en México, enero 2008 – 30 Abril 2009. | 53 |
| Cuadro 3. Presupuesto destinado a la Campaña contra la EN, en millones de pesos (SENASICA). | 53 |
| Cuadro 4. Programas de vacunación para pollo de engorda | 54 |
| Cuadro 5. Programas de vacunación para gallinas de postura y reproductoras | 54 |
| Cuadro 6. Cepas de virus usados para la elaboración de vacunas (15 laboratorios) contra la EN. | 55 |
| Cuadro 7. Análisis filogenético de cepas velogénicas mexicanas del VEN. | 56 |
| Cuadro 8. Características de 25 aislamientos del VEN y resultados de las pruebas de TMME, IPIC, RT-PCR, secuenciación del gen F, virulencia, genotipo y cepa relacionada. | 57 |
| Cuadro 9. Resultado de la reactivación de las cepas virales usadas para la prueba biológica. | 58 |
| Cuadro 10. Intensidad de los principales signos clínicos observados a las 96 hpi en pollos de engorda inoculados experimentalmente con diferentes cepas del VEN. | 58 |
| Cuadro 11. Evaluación de las lesiones en el timo de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP ₅₀ /0.2 ml de diferentes cepas de VEN. | 58 |
| Cuadro 12. Evaluación de las lesiones en el bazo de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP ₅₀ /0.2 ml de diferentes cepas de VEN. | 59 |
| Cuadro 13. Evaluación de las lesiones en la bolsa de Fabricio de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP ₅₀ /0.2 ml de diferentes cepas de VEN. | 59 |
| Cuadro 14. Evaluación de las lesiones en la tonsila cecal de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP ₅₀ /0.2 ml de diferentes cepas de VEN. | 60 |
| Cuadro 15 Evaluación de las lesiones en la glándula de Harder de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP ₅₀ /0.2 ml de diferentes cepas de VEN. | 60 |
| Cuadro 16 Evaluación de las lesiones en la médula ósea de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP ₅₀ /0.2 ml de diferentes cepas de VEN. | 60 |
| Cuadro 17. Aislamiento viral a partir de órganos de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP ₅₀ /0.2 ml de la cepa tipo Torreón del VEN. | 61 |
| Cuadro 18. Aislamiento viral a partir de órganos de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP ₅₀ /0.2 ml de la cepa tipo Chimalhuacán del VEN. | 61 |
| Cuadro 19. Aislamiento viral a partir de órganos de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP ₅₀ /0.2 ml de la cepa Querétaro del VEN. | 62 |
| Cuadro 20. Aislamiento viral a partir de órganos de aves inoculadas a las 5 semanas de | 62 |

edad con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de la cepa DPAA del VEN.

Cuadro 21. Aislamiento viral a partir de órganos de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de la cepa LaSota del VEN.

63

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Genoma del virus de la EN | 64 |
| Figura 2. Cronología de la declaración de Estados Libres de la EN, presentación velogénica. | 64 |
| Figura 3. Inversiones de Alianza para la Campaña contra la EN, 1996 – 2003, y aportaciones estatales, federales y de los productores de 2004 a 2008. | 65 |
| Figura 4. Resultado del RT-PCR de la amplificación del segmento de 374 pb del gen de la proteína F de algunos aislamientos del VEN, revelado del gel de electroforesis en un transiluminador ultravioleta. | 65 |
| Figura 5a. Comparación filogenética de la región completa que codifica en gen F de los virus de este estudio con otros VEN de la clase I y Clase II, genotipos I al VII publicados previamente. | 66 |
| Figura 5b. Análisis filogenético de máxima probabilidad del fragmento de 374 pb del gen F de los virus de este estudio y su comparación con secuencias publicadas previamente en el GenBank. | 67 |
| Figura 5c. Análisis filogenético de 642 pb de los segmentos contiguos de los genes de las proteínas M y F de los virus de este estudio y su comparación con secuencias de referencia publicadas previamente en el GenBank. | 68 |
| Figura 6. Timo de pollo de engorda desafiado con la cepa Chimalhuacán del VEN, 96 hpi, hematoxilina y eosina. | 69 |
| Figura 7a. Bazo de pollo de engorda desafiado con la cepa DPAA del VEN, 48 hpi, hematoxilina y eosina, 20x. | 70 |
| Figura 7b. Bazo de pollo de engorda desafiado con la cepa Torreón del VEN, 84 hpi, hematoxilina y eosina, 20x | 70 |
| Figura 8a. Bolsa de Fabricio de pollo de engorda desafiado con la cepa DPAA del VEN, 84 hpi, hematoxilina y eosina, 10x. | 71 |
| Figura 8b. Bolsa de Fabricio de pollo de engorda desafiado con la cepa Chimalhuacán del VEN, 96 hpi, hematoxilina y eosina, 10x. | 71 |
| Figura 9a. Tonsila cecal de pollo de engorda desafiado con la cepa LaSota del VEN, 96 hpi, hematoxilina y eosina, 20x. | 72 |
| Figura 9b. Tonsila cecal de pollo de engorda desafiado con la cepa Torreón del VEN, 96 hpi, hematoxilina y eosina, 20x. | 72 |
| Figura 10a. Glándula de Harder de pollo de engorda inoculado con la cepa LaSota del VEN, 72 hpi, hematoxilina y eosina, 20x. | 73 |
| Figura 10b. Glándula de Harder de pollo de engorda inoculado con la cepa Chimalhuacán del VEN, 96 hpi, hematoxilina y eosina 20x. | 73 |

| | |
|--|----|
| Figura 11a. Médula ósea de pollo de engorda inoculado con la cepa Torreón del VEN, 48 hpi, hematoxilina y eosina, 5x. | 74 |
| Figura 11b. Médula ósea de pollo de engorda inoculado con la cepa Querétaro del VEN, 84 hpi, hematoxilina y eosina, 10x. | 74 |
| Figura 12. Médula del timo de pollo de engorda inoculado con la cepa DPAA del VEN, 72 hpi, Azul de toluidina 40x. | 75 |
| Figura 13. Folículo linfoide de la bolsa de Fabricio de pollo de engorda inoculado con la cepa DPAA del VEN, 84 hpi, Azul de toluidina 40x. | 75 |
| Figura 14a. Bazo de pollo de engorda inoculado con la cepa DPAA del VEN, 96 hpi, Azul de toluidina 100x. | 76 |
| Figura 14b. Bazo de pollo de engorda inoculado con la cepa DPAA del VEN, 96 hpi, Azul de toluidina 100x. | 76 |
| Figura 15a. Médula ósea de pollo de engorda inoculado con la cepa Querétaro del VEN, 36 hpi, Azul de toluidina 100x. | 77 |
| Figura 15b. Médula ósea de pollo de engorda inoculado con la cepa Querétaro del VEN, 84 hpi, Azul de toluidina 100x. | 77 |
| Figura 16: Fotografía de microscopio electrónico donde se muestra un corte de médula ósea de pollo inoculado con el VEN Chimalhuacán a las 24 hpi. Líneas celulares. | 78 |
| Figura 17: Fotografía de microscopio electrónico donde se muestra un corte de médula ósea de pollo inoculado con el VEN Chimalhuacán a las 24 hpi. Heterófilo. | 79 |
| Figura 18. Fotografía de microscopio electrónico donde se muestra un corte de médula ósea de pollo inoculado con el VEN Chimalhuacán a las 24 hpi. Partícula electrodensa. | 80 |
| Figura 19. Fotografía de microscopio electrónico donde se muestra un corte de médula ósea de pollo inoculado con el VEN Chimalhuacán a las 48 hpi. Necrosis celular. | 81 |

Abreviaturas

| | |
|------------------------|--|
| ADNc | Ácido desoxiribonucleico complementario |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| DIEP ₅₀ /ml | Dosis infectante en embrión de pollo, 50% |
| DLEP ₅₀ /ml | Dosis letal en embrión de pollo, 50% |
| DPAA | Departamento de Producción Animal: Aves |
| dpi | Días post-inmunización; días post-inoculación |
| EN | Enfermedad de Newcastle |
| F | Proteína de Fusión |
| FMVZ | Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia |
| HN | Hemaglutinina-Neuraminidasa |
| hpi | Horas post-inoculación |
| IH | Inhibición de la hemoaglutinación |
| IPIC | Índice de patogenicidad intracerebral |
| IPIV | Índice de patogenicidad intravenosa |
| L | Polimerasa de ARN |
| M | Proteína de Matriz |
| OIE | Organización Mundial de Sanidad Animal |
| P | Fosfoproteína |
| pb | Pares de bases |
| PMV | Paramixovirus |
| RT-PCR | Transcriptasa reversa – Reacción en cadena de la polimerasa |
| SAGARPA | Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación |
| SENASICA | Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria |
| SPF | Specific Pathogens Free, libre de patógenos específicos |
| TMME | Tiempo medio de mortalidad embrionaria |
| UNAM | Universidad Nacional Autónoma de México |
| VEN | Virus de la enfermedad de Newcastle |

RESUMEN

La enfermedad de Newcastle ha representado una seria amenaza para la avicultura Mexicana desde su primer reporte en 1946. Varios virus velogénicos fueron aislados en diferentes áreas de México a partir de pollos, aves de combate, palomas y codornices entre 1998 y 2006. Estos aislamientos fueron evaluados por análisis filogenético y caracterización biológica por medio de pruebas estándar de patogenicidad y estudios de desafío en pollos de engorda comerciales, con énfasis particular en el tropismo linfoide, mieloides y endotelial. Los estudios filogenéticos mostraron que todos estos virus velogénicos pertenecen al genotipo V y están claramente divididos en dos linajes, ya que la similitud filogenética entre grupos fue de 93-94%. Los aislamientos de 1998 a 2001 están relacionados estrechamente con la cepa responsable del brote surgido en la región de La Laguna (cepa Torreón), y son filogenéticamente distintos de los virus aislados entre 2004 y 2006, los cuales están relacionados con la cepa Chimalhuacán aislada originalmente en 1973. Todos los virus, tanto parecidos a Chimalhuacán como a Torreón, presentaron el sitio de activación de la proteína F correspondiente a los virus virulentos, representado por la secuencia "GGRRQKRF", caracterizada por dos pares de aminoácidos básicos, lo que sugiere que los cambios evolutivos ocurrieron en un sitio diferente a este. El tiempo medio de mortalidad embrionaria fue menor (43.9 horas), para los virus parecidos a Chimalhuacán que el de los parecidos a Torreón (54.3 horas, $P < 0.05$). El IPIC promedio de los virus aislados entre 2004 y 2006 fue mayor (1.92) que el de los aislados entre 1998 y 2001 (1.74, $P < 0.05$). El estudio microscópico reveló que el aislamiento tipo Chimalhuacán ocasionó en general lesiones más severas que un aislamiento tipo Torreón en la bolsa de Fabricio, timo, bazo y médula ósea de pollos de engorda de 5 semanas de edad. La evaluación ultra estructural demostró el tropismo por células linfoides, mieloides y endoteliales. Los resultados de este trabajo sugieren que diferentes factores ejercieron presión de selección sobre la cepa Chimalhuacán, aislada originalmente en 1973, para dar origen a la aparición de la cepa Torreón a mediados de la década de los 90 del siglo pasado, la cual también es velogénica, pero menos virulenta. Además, el estudio comprueba el tropismo linfoide, mieloides y endotelial del virus, lo que resalta la importancia del mismo en países como México, donde las aves comerciales vacunadas están protegidas contra la muerte, pero no contra la infección, ni la replicación del virus en los órganos linfoides primarios y secundarios, por lo que pueden presentar baja en los parámetros productivos y quedar expuestas a otras infecciones.

Palabras clave: Enfermedad de Newcastle, análisis filogenético, virulencia, tropismo, México.

ABSTRACT

Velogenic Newcastle disease has threatened the Mexican poultry industry since 1946. Several strains of velogenic Newcastle disease virus were isolated from poultry, gamefowl, quail and pigeon from different areas of Mexico between 1998 and 2006. These viruses were subjected to phylogenetic analysis and biological characterization using standard pathogenicity tests and challenge studies in commercial broiler chickens, with particular emphasis on tropism for myeloid, lymphoid and endothelial cells. Phylogenetic analysis showed that all velogenic strains belong to genetic group V and are clearly divided in two lineages, since phylogenetic similarities between groups are of only 93–94%. Isolates from 1998 to 2001 are closely related to the strain responsible for the 2000 year outbreak raised in La Laguna region (Torreon strain), and are phylogenetically distinct from viruses isolated between 2004 and 2006 that are genetically related to the Chimalhuacan strain isolated in 1973. All the viruses of both, the Chimalhuacan and the Torreon groups, contained a virulent fusion protein cleavage site represented by the motif “GGRRQKRF”, characterized by two pairs of basic amino acids, revealing that evolutionary changes occurred at a different site. Chicken embryo mean death time value was shorter, $P < 0.05$, for the Chimalhuacan-like viruses (43.9 hours), when compared with the 1998–2001 average (54.3 hours), Torreon-like. ICPI average value was higher (1.92) for viruses isolated during 2004–2006 than that for viruses isolated before 2001 (1.74), $P < 0.05$. Microscopic evaluation of bursa of Fabricius, thymus, spleen and bone marrow of 5w-o broiler chickens showed that Chimalhuacan-like isolate caused, in general, more severe lesions. Ultra-structural evaluation showed the tropism of these viruses for lymphoid, myeloid and endothelial cells. Along with all our results, our findings suggest that some distinct selective pressure on the very virulent Chimalhuacan strain isolated in 1973 may have led to the appearance of the still velogenic but less virulent new group (Torreon-like) in the middle of 1990's. Besides, this study proves the virus tropism for lymphoid, myeloid and endothelial cells, which enhances its importance in countries like Mexico, where vaccinated commercial poultry is protected against the death, but not against the infection or the virus replication in lymphoid organs, which can lead to reduced productive performance and susceptibility to other infections.

Keywords: Newcastle disease, phylogenetic analysis, virulence, tropism, Mexico.

Caracterización molecular y estudio de la patogénesis del daño endotelial, mieloide y linfoide, de aislamientos mexicanos del virus de la enfermedad de Newcastle inoculados en pollo de engorda comercial

INTRODUCCIÓN

Revisión general de la enfermedad de Newcastle

Definición

La enfermedad de Newcastle (EN) es una infección viral de distribución mundial, contagiosa y letal de las aves domésticas y silvestres que causa alta morbilidad y mortalidad (NOM-ZOO-013,1995). Es una enfermedad que se incluye en la lista de enfermedades de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (Alexander and Senne, 2008a).

Por muchos años ha sido una enfermedad devastadora de las aves domésticas y en muchos países permanece como uno de los mayores problemas que afectan a la industria avícola, ya que puede causar mortalidad hasta del 100% (Kouwehoven, 1993; Alexander, 2000; Alexander and Senne, 2003b). A partir de 1991 se ha apreciado en el mundo un aumento de la incidencia de brotes de la enfermedad.

Etiología

La EN es ocasionada por un paramixovirus que contiene ARN, del género Avulavirus que pertenece a la familia Paramyxoviridae. El genoma tiene un tamaño que varía de 15,186 a 15,198 nucleótidos (Czeglédi *et al.*, 2006). Los paramixovirus aviares forman 9 serogrupos [Paramixovirus -1 al Paramixovirus -9 (PMV-1 al PMV-9)] de los cuales sólo el PMV-1 se relaciona con la EN, éstos se replican en embriones de pollo y no presentan reacción serológica cruzada entre ellos, a excepción del PMV-3 el cual puede tener reacción cruzada con el PMV-1. Los serogrupos son estables antigénicamente y no llegan a mutar de un serogrupo a otro (Alexander, 2008b; Gallili and Ben-Nathan, 1998; Seal *et al.* 2000; Alexander and Senne, 2008b; Pedersen *et al.* 2004). A pesar de que hay sólo un serotipo del virus, éste ha mostrado 14 grupos antigénicos con el uso de 9 anticuerpos monoclonales (AcM) y 39 patrones con un panel de 26 AcM (Alexander *et al.*, 1997).

El virus tiene una amplia gama de hospederos, ya que se ha reportado que de los 50 órdenes de aves, 27 de ellos pueden ser infectados por el virus. Los pollos son particularmente susceptibles al virus, mientras que los patos y gansos pueden infectarse y mostrar signos clínicos leves o permanecer asintomáticos (Seal *et al.* 2000; Pedersen *et al.* 2004). El virus de la enfermedad de

Newcastle (VEN) sobrevive hasta por 16 días en la gallinaza a temperatura ambiente (Kinde *et al.* 2004). Es sensible al éter, al pH ácido, a la formalina y fenol; es inactivado a 56°C durante 3 horas y a 60°C durante 30 minutos (Alexander and Senne, 2008b).

El VEN codifica al menos 6 proteínas principales que comprenden la nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), matriz (M), fusión (F), hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y una polimerasa de ARN (L), (Figura 1). El genoma de los APMV-1 tiene al menos tres longitudes, 15,186, 15,192 y 15,198 nucleótidos (Czegledi *et al.*, 2006). La proteína M forma una unión entre la glicoproteína de la envoltura del virus y la nucleoproteína de la cápside, para estabilizar la estructura del virus. Las proteínas HN y F forman proyecciones en la envoltura viral. La proteína HN está involucrada en la unión del virión a los receptores que contienen ácido siálico de las células blanco. La actividad de neuraminidasa de la HN regula la ruptura del ácido siálico de los receptores para el virus en la superficie celular y le permite al virus liberarse de la célula infectada. Además, la HN promueve la actividad de fusión, ya que se requiere de HN y F para la formación de sincitios. La proteína funcional F induce la fusión de las membranas del virus y la célula blanco y también es responsable de la inducción de la fusión entre células hospederas. Esto le permite a la unidad de transcripción viral, la nucleocápside y las proteínas P y L, entrar al citosol de la célula hospedera. Por lo tanto, las glicoproteínas HN y F son esenciales para la infectividad viral y son blancos ideales para prevenir la infección por inmunidad protectora (Al-Garib *et al.* 2003).

La clasificación de las cepas en cuanto a su virulencia puede basarse en la velocidad con la que ocasionan la muerte al embrión de pollo: lentógenicas (baja patogenicidad) si tarda más de 90 horas en morir el embrión, mesogénicas (moderada patogenicidad) si muere entre las 60 y 90 horas post inoculación en cavidad alantoidea y velogénicas (alta patogenicidad) si el embrión muere en menos de 60 horas pos inoculación en cavidad alantoidea. Los virus también se pueden clasificar de acuerdo con los órganos más afectados y los signos clínicos que ocasionan: cepas neurotrópicas, que provocan signos clínicos y lesiones de tipo nervioso, y las cepas viscerotrópicas que dañan al sistema digestivo y provocan hemorragias severas en las vísceras, sin la presentación de signos de tipo nervioso (Alexander, 2000; Alexander and Senne, 2008b; OIE, 2005).

La clasificación aceptada de la patogenicidad de las cepas del VEN, incluye la infección asintomática, conocida también como presentación entérica, que sólo es detectada por métodos serológicos y aparentemente no hay signos clínicos; las cepas involucradas son Ulster, 2C, QV4 y VG/GA. Con la realización de numerosos aislamientos de VEN en diversos países, que producían signos clínicos muy leves o que eran totalmente asintomáticos, se originó el concepto de las cepas

lentogénicas, que se han utilizado como virus vacunales activos que incluyen a las cepas lentogénicas: B1, LaSota y Clon 30 (Asplin, 1952; Hitchner and Johnson, 1948; McFerran and Nelson, 1971; Simmons, 1967), aunque llegan a ocasionar signos respiratorios de leves a moderados y disminución en los parámetros productivos como respuesta post vacunal. Beaudette y Black (1946) describieron una variante neurotrópica que sólo producía mortalidad en aves jóvenes y de ahí se originó el concepto de las variantes mesogénicas. Es decir, la variante Beaudette, corresponde a una forma mesogénica-neurotrópica que produce signos respiratorios y disminuye la producción de huevo durante varias semanas y puede ocasionar signos nerviosos; las cepas involucradas son las denominadas mesogénicas: Roakin, Haifa-Komarov, Krananuel, cepa H y Mukteswar. La variante Beach, denominada neumoencefalitis en 1942 (Beach, 1942), fue identificada serológicamente como causada por un agente idéntico al de la Enfermedad de Newcastle (Beach, 1944). Esta variante es letal y aguda en todas las edades, pero sus manifestaciones clínicas son fundamentalmente respiratorias y nerviosas por lo que la denominación en este caso corresponde a la de forma neurotrópica. Ambas variantes, tanto la viscerotrópica como la neurotrópica, son de curso agudo y por ello se clasifican además como velogénicas, como la cepa Texas, cuya morbilidad puede llegar al 100% y la mortalidad puede ser del 50% en aves adultas y 90% en aves jóvenes. La variante Doyle fue descrita por este autor en 1926 en Newcastle-upon-Tyne en Inglaterra, de donde deriva el nombre oficial de la enfermedad. Fue caracterizada como una infección letal y aguda en aves de todas las edades, causante de hemorragias en todos los órganos del aparato digestivo y de ahí la denominación viscerotrópica (Doyle, 1927); se caracteriza por producir signos respiratorios, digestivos y nerviosos; la mortalidad alcanza el 100% en aves susceptibles. Tradicionalmente, las cepas mexicanas Iztapalapa, Querétaro y Chimalhuacán han sido clasificadas en este tipo de presentación. Desde 1972, se han realizado estudios de la patología ultra-estructural de infecciones con cepas velogénicas del VEN en América del Norte, en los que se describe un daño endotelial generalizado y severo, que es compatible con las frecuentes hemorragias que se presentan en esta enfermedad (Cheville *et al.* 1972).

Las pruebas de patogenicidad son útiles para determinar la virulencia de las cepas virales. Originalmente las cepas del VEN fueron diferenciadas con base en el tiempo medio de mortalidad del embrión de pollo después de la infección. Posteriormente la diferenciación se basó en pruebas *in vivo* y el uso del desarrollo de la enfermedad o la muerte de las aves infectadas como indicador. Se usan diferentes rutas de infección en estas pruebas: la vía intracerebral en pollos de un día de edad para determinar el índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) y la vía intravenosa en pollos de 6 semanas de edad para determinar el índice de patogenicidad intravenosa (IPIV). Estos índices fueron calculados de acuerdo con la severidad de los signos de la enfermedad. El IPIV es

particularmente útil para la clasificación de aislamientos del VEN de moderada y alta virulencia, pero tiende a no mostrar diferencias entre algunos virus mesogénicos y lentogénicos. En el IPIC se calcula el valor medio por ave en observaciones cada 24 horas durante 8 días. Generalmente los virus lentogénicos dan índices máximos de 0.6, los virus entéricos asintomáticos usualmente ocasionan índices ligeramente menores, los virus mesogénicos usualmente alrededor de 1.4 y los virus velogénicos entre 1.7 y 2.0. En la Unión Europea, los aislamientos de VEN con valor IPIC mayor a 0.7 se consideran virulentos (Al-Garib *et al.*, 2003).

La patogenicidad del VEN depende grandemente de la ruptura de la proteína de fusión precursora F_0 en las proteínas subunitarias F_1 y F_2 . Esta forma una base molecular importante para que las partículas virales sean infecciosas. La ruptura está mediada por proteasas de la célula hospedadora. La importancia de la ruptura de F_0 es demostrada simplemente por la incapacidad de las cepas lentogénicas para producir placas en sistemas de cultivo celular, en ausencia de tripsina.

El cambio de tan sólo dos nucleótidos en el sitio de activación de la proteína de fusión puede resultar en el surgimiento de una forma virulenta del VEN a partir de un virus lentogénico; sin embargo, sólo hay unos cuantos casos documentados de este fenómeno. Los brotes que ocurrieron en Irlanda en 1990 y en Australia de 1998 a 2000 fueron cada uno resultado de virus de baja virulencia que mutaron a alta virulencia. En Irlanda, los virus de baja virulencia fueron endémicos en poblaciones costeras silvestres, y en Australia, los virus de baja virulencia inicialmente circularon en la avicultura comercial (Alexander *et al.*, 1992; Gould *et al.*, 2001). La evidencia que sugiere que el VEN de baja virulencia puede volverse altamente patógeno para la avicultura comercial ha estimulado considerable interés en el entendimiento de las fuerzas evolutivas que afectan los cambios genéticos del virus (Miller *et al.*, 2009a).

La comparación de la deducción de la secuencia de aminoácidos en el sitio de ruptura del precursor F_0 ha sido utilizada para clasificar patotipos del VEN. Los virus virulentos para los pollos, con valor alto de IPIC tienen secuencia $^{112}\text{Arg/Lis-Arg-Glu/Lis-Arg/Lis-Arg}^{116}$ en la terminal C- de la proteína F_2 y fenil alanina en el residuo 117, la terminal N- de la proteína F_1 . Los virus de baja virulencia tienen la secuencia $^{112}\text{Gli/Glu-Lis/Arg-Glu-Gli/Glu-Arg}^{116}$ y leucina en el residuo 117 de la misma región. Así, para que el virus sea virulento aparentemente se requiere de un par doble de aminoácidos básicos en los residuos 112 y 113 y en los residuos 115 y 116, más una fenil alanina en el residuo 117 (Al-Garib *et al.* 2003).

Actualmente se emplean dos sistemas para la clasificación genética del virus, sin que haya un consenso sobre cual es el más apropiado. El sistema propuesto por Aldous *et al.* (2003) agrupa al

VEN en seis linajes y 13 sublinajes, a los que posteriormente se agregaron otros 3 sublinajes (Snoeck *et al.* 2009). El segundo sistema clasifica al VEN en dos divisiones principales representadas por las clases I y II; la clase I se divide en nueve genotipos y la clase II en 10 (Ballagi-Pordany *et al.* 1996; Czeglédi *et al.* 2006). Ambos sistemas de clasificación se basan en información genética similar, por lo que las discrepancias entre ambos sistemas son nominales (Miller *et al.* 2009a).

En el segundo sistema de clasificación, los virus de la clase I son apatógenos para los pollos, excepto por un virus patógeno conocido (Miller *et al.* 2009), e históricamente se han aislado de aves acuáticas (familia *Anatidae*) y de playa (Kim *et al.* 2007). Estos virus tienen el genoma de 15,198 nucleótidos (Czeglédi *et al.* 2006), y comprenden al menos nueve genotipos (1-9) que pueden estar distribuidos mundialmente en aves silvestres (Kim *et al.* 2007a) y frecuentemente se aíslan de muestras de mercados de aves vivas (Kim *et al.* 2007a; 2007b).

Los virus de la clase II se han estudiado en más detalle y comprenden 10 genotipos (I-X). Los genotipos considerados “ancestrales” (1930-1960), I-IV y IX contienen 15,186 nucleótidos (Czeglédi *et al.*, 2006). Los virus que emergieron después de 1960, V-VIII y X, contienen 15,192 nucleótidos. Los virus del genotipo I de la clase II son de baja virulencia y algunos se usan frecuentemente como vacuna de virus activo (chicken/Australia/QV4/1966 y chicken/N. Ireland/Ulster/1967), excepto por el virus patógeno reciente responsable por el brote de 1998 a 2000 en Australia. Los virus del genotipo II de la clase II incluyen virus de baja virulencia que son usados como virus vacunales en todo el mundo, tales como LaSota, B1 y VG/GA. También incluye a la cepa patógena neurotrópica chicken/U.S. (TX) GB/1948 (TXGB) que fue aislada en 1948 y se usa en los EUA como cepa de desafío para las pruebas de potencia de las vacunas comerciales. Los virus del genotipo III fueron aislados principalmente antes de 1960 en Japón, pero se han aislado esporádicamente en Taiwán en 1969 y 1985 y en Zimbabue en 1990 (Yu *et al.* 2001). Los virus del genotipo IV fueron los aislados predominantemente en Europa antes de 1970 (Czeglédi *et al.* 2006).

Los genotipos V – VIII son los que circulan mundialmente y contienen solo virus virulento. Los virus del genotipo V emergieron en Centro y Sudamérica en 1970 y causaron brotes en Europa en el mismo año (Ballagi-Pordany *et al.* 1996), también se presentaron en Norteamérica en Florida (1971, 1993) y California (1971, 2002) (Wise *et al.* 2004a), y aún circulan en México (Miller *et al.* 2006). El genotipo VI surgió en la década de 1960's y fue el que predominó en Asia hasta 1985, cuando el genotipo VII se volvió más común (Mase *et al.* 2002). El genotipo VI se divide en subgenotipos VIa a VIg, de los cuales, el VIb se aísla comúnmente de pichones.

El genotipo VII está dividido en los sub-genotipos VIIa a VIIh, unos de los cuales surgieron en el lejano oriente en la década de los 90 del siglo pasado (VIIa) y se diseminaron a Europa y Asia, otros se diseminaron a Sudáfrica (VIIb) (Aldous *et al.* 2003). Los sub-genotipos VIIc, d y e, se aislaron en China, Kazajstán y Sudáfrica (Bogoyavlenskiy *et al.* 2009; Wang *et al.* 2006), mientras que VIIf, g y h, representan aislamientos africanos (Snoeck *et al.* 2009). Los virus del genotipo VIII han circulado en África desde la década de los 60 del siglo XX y aún circulan en el sureste asiático (Abolnik *et al.* 2004a). El genotipo IX es un grupo único que incluye el primer brote de virus virulento de China en 1948, y hasta la fecha algunos miembros de este genotipo se aíslan ocasionalmente en China (Wang *et al.* 2006). Los virus del genotipo X se aislaron exclusivamente en Taiwán en 1969 y 1981 (Tsai *et al.* 2004).

En la actualidad hay virus de la mayoría de los genotipos que circulan simultáneamente en el mundo, con excepción del genotipo IV, el cual no ha sido reportado en el GenBank desde 1989 (Miller *et al.* 2009). El GenBank permite el incremento del número de genotipos reportados; por ejemplo, un virus aislado en Madagascar en 2008 (chicken/MG/725T/2008), obtenido de un pollo aparentemente sano, presenta la secuencia 112GRRRRR↓FV118 en el sitio de activación de la proteína F y muestra 5 aminoácidos básicos (R) en las posiciones 112-116, lo que representa una secuencia virulenta no reportada previamente. El análisis filogenético muestra que ese aislamiento es cercano al genotipo IV, pero puede estar lo suficientemente distante para constituir un genotipo nuevo (genotipo XI) (Servan de Almeida *et al.* 2009).

Respuesta inmune y protección contra la enfermedad

En la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH), el título de 16 de los anticuerpos séricos protege al 80% de los animales contra la muerte ante un desafío severo; si el título es 32 o superior se puede alcanzar el 100% de protección. Con título IH menor a 16, la correlación entre la protección y el título es mucho menor y depende de factores como el tipo de vacuna, dosis, vía de administración, edad, etc. En las aves en producción, se evita la baja en la postura de huevo y las alteraciones de la calidad del mismo con título de IH de 128 o más (Survashe and Desmukh, 1998; Soto *et al.* 2006). El VEN velogénico se aisló de hisopos traqueales y cloacales durante 14 días con títulos séricos de anticuerpos IH entre 8 y 128; sin embargo, la excreción se reduce significativamente cuando los títulos están entre 256 y 4096 (Westbury, 1989).

La relación entre el título de anticuerpos medidos por IH y la resistencia al desafío con virus virulento se ha reportado como sigue (Survashe and Desmukh, 1998):

| Rango de títulos IH (Log ₂) | Resultado del desafío |
|---|---|
| 2 ² o menor | 100% mortalidad |
| 2 ² - 2 ⁴ | 10% mortalidad |
| 2 ⁴ - 2 ⁶ | 0% mortalidad |
| 2 ⁶ - 2 ⁸ | Caída seria de la producción, sin muertes. |
| 2 ⁹ - 2 ¹¹ | Sin caída en la producción, sin muertes. Convaleciente puede alcanzar 2 ¹² |

Lesiones histológicas

La mayoría de las publicaciones describen los cambios histológicos subsecuentes a la infección con el VEN patógeno. Los cambios más importantes son:

Sistema nervioso. En el sistema nervioso central (cerebelo, médula, cerebro medio, tallo cerebral y médula espinal) se observa encefalomietitis no supurativa con degeneración neuronal, focos de células de la glía e infiltración linfocitaria perivascular.

Sistema vascular. Congestión, edema y hemorragias en varios órganos. Degeneración hidrópica, hialinización de capilares y arteriolas, trombosis hialina en vasos pequeños, hipertrofia y necrosis de las células endoteliales de los vasos.

Sistema linfoide. Desaparición de tejido linfoide. Lesiones necróticas en el bazo, mientras que en el timo y el bazo se observan vacuolización focal y destrucción de linfocitos en las áreas corticales y en los centros germinales. En la bolsa de Fabricio se presenta degeneración marcada de los linfocitos de la región medular.

Tracto intestinal. Hemorragia y necrosis del tejido linfoide de la mucosa.

Tracto respiratorio. Pérdida de cilios del epitelio. Congestión, edema e infiltración densa de linfocitos y macrófagos en la mucosa del tracto respiratorio superior. Las cepas velogénicas viscerotrópicas Texas 219 y Florida Largo ocasionaron lesiones pulmonares, primero congestión y edema del parabronquio y posteriormente hemorragias y eritrofagocitosis más extensas en las áreas alveolares del parabronquio. También puede observarse edema, infiltración celular e incremento del grosor y densidad de los sacos aéreos.

Sistema reproductor. Hay atresia de los folículos ováricos, con infiltración de células inflamatorias y la formación de agregados linfocitarios, los cuales también se observan en el oviducto (útero).

Otros órganos. Áreas focales pequeñas de necrosis en el hígado acompañadas de hiperplasia de células fagocíticas mononucleares en la infección subaguda, y a veces con hemorragias en la vesícula biliar y el corazón. Infiltración linfocitaria pancreática. El virus velogénico viscerotrópico puede ocasionar hemorragia y ulceración cutánea, acompañada de congestión y petequias en la cresta y barbillas, así como lesiones conjuntivales hemorrágicas.

Situación de la enfermedad de Newcastle en México

El primer diagnóstico en México de la EN velogénica fue realizado por Bankowski y Velázquez en 1946, Olvera comprobó que el virus llegó al país mediante la importación de pollitos de un día provenientes de EUA. Ramírez Valenzuela sugirió que la epizootia de 1950-51 fue ocasionada por un virus llegado con aves importadas de Inglaterra. En la década de los 60 del siglo pasado se reconoce la presencia en México de las presentaciones Hitchner, Beaudette, Beach y Doyle de la EN. Matzer reportó que la epizootia de 1970 se originó de la importación de periquitos de Sudamérica. En el cuadro 1 se muestran las principales cepas velogénicas aisladas en México de 1946 a 1975. Las primeras vacunas contra la enfermedad fueron usadas en 1950, se aplicaba sólo una dosis al día de edad de los pollos. En 1960 la vacunación típica incluía la cepa B1 ocular a los 10 días de edad, LaSota por vía intramuscular a las 4 semanas y LaSota en el agua de bebida a las 6 semanas si era necesario. Debido a los brotes intensos de principios de la década de 1970's, se requirió de la implementación de calendarios de vacunación más cerrados (Márquez, 1978).

En las décadas de los 70 y 80 del siglo XX se reconoció que la EN es un problema endémico de difícil control y que se puede prevenir sólo a través de evitar el contacto de las aves con el virus patógeno de campo, lo cual es posible con un programa de vacunación adecuado, como complemento al estricto programa de bioseguridad (Camacho *et al.* 2006).

Campaña de erradicación

A principios de los años 90 del siglo pasado, la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, con la participación de los avicultores nacionales y la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, inició una campaña nacional contra la enfermedad de Newcastle velogénica, mediante la acreditación de médicos veterinarios zootecnistas coordinados por la Dirección General de Salud Animal. La campaña empezó con la certificación de parvadas de progenitoras y reproductoras, sumándose más adelante las de ponedoras comerciales, pollo de engorda, aves de combate, ornato y canoras. El 28 de febrero de 1995 se publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-

013-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Enfermedad de Newcastle, presentación velogénica (Rivera, 2000), la cual ha tenido avances importantes. En la figura 2 se muestra el año de declaración de estado libre de la EN velogénica en México, basado en los acuerdos publicados en el Diario Oficial de la Federación y la información de Heneidi y León (2003).

En 1996 se registraron en todo el país 11 focos de EN velogénico, 6 en 1997, 30 en 1998, 20 en 1999, 137 en 2000. Para ese año, 13 estados en el norte de la república y la península de Yucatán estaban declarados como libres de la enfermedad. La región Lagunera fue declarada libre de EN en marzo de 1996, pero a finales de marzo de 2000 se diagnosticó EN velogénico en una granja de pollos de engorda en esa zona. Al 30 de septiembre de ese año, se detectaron 93 granjas afectadas, entre pollo de engorda comercial, avicultura de traspatio, gallos de pelea y una granja de avestruces, en las cuales se realizó el sacrificio y disposición sanitaria de más de 13.6 millones de aves, el último caso clínico fue el 11 de mayo de 2000. La EN no se diagnosticó en granjas de progenitoras, reproductoras o de postura comercial. A mediados de enero de 2001 se detectó un brote en aves de crianza, la granja se puso en cuarentena de inmediato y todas las aves fueron sacrificadas. La cuarentena se levantó a mediados de febrero del mismo año (Heneidi, 2003). En total en 2001 se detectaron 20 focos de EN y 4 en 2002. En el periodo 1996-2002, la EN velogénica en aves de traspatio y combate representó casi el 38% de los brotes, tal porcentaje se interpreta artificialmente bajo, debido a los 94 focos reportados en pollo de engorda durante el brote del año 2000. En 2003 se reportaron 14 focos de EN, 9 en 2004, 41 en 2005, 78 en 2006, y 14 en 2007. En el cuadro 2 se muestra la detección de focos de Newcastle velogénico en el país, de 1996 a noviembre de 2009 (SENASICA).

El presupuesto gubernamental (ALIANZA) para la campaña contra la EN, fue de alrededor de 16, 26, 23, 21, 25, 12, 24 y 25 millones de pesos durante los años 1996-2003, respectivamente (Figura 3). En el cuadro 3 se muestra el presupuesto para el periodo 2004 – 2008.

Causas de los brotes

Los brotes de la EN en parvadas de aves comerciales se pueden dar en aves jóvenes por distintas razones (Camacho *et al.* 2006):

1- La exposición temprana al virus, que puede estar asociada con la persistencia del virus en las casetas cuando la parvada previa estuvo infectada y los métodos de limpieza y desinfección no fueron adecuados, ya que el virus puede permanecer viable por semanas o meses en superficies protegidas de la luz solar. En las granjas con animales de distintas edades es difícil lavar y desinfectar perfectamente, lo que deja a las aves de reciente ingreso en riesgo de infectarse si es

que el virus patógeno circula en la granja. La alta densidad de producción avícola en una zona específica, que permite la cercanía entre granjas a menos de 500 m, eleva la posibilidad de difundir el virus a través del aire, aves, vehículos, personas, equipo y material.

2- La inmunidad humoral que las gallinas reproductoras transfieren a la progenie proporcionan protección durante la primera semana de vida, pero puede ser rebasada por la exposición temprana, prolongada o alta al virus patógeno.

3- Fallas en la vacunación, debidas a mala calidad de la vacuna, o más frecuentemente por manejo inadecuado de la misma, incluidas la selección de la cepa empleada en la vacuna y la vía de aplicación. Los factores inmunodepresores infecciosos y no infecciosos pueden permitir la EN clínica en aves que fueron vacunadas adecuadamente.

La presentación de la EN en aves mayores de 4 semanas puede apreciarse de dos formas. La manifestación respiratoria es común en parvadas de aves bien protegidas, en la cual la mortalidad y presencia de signos nerviosos o digestivos es baja (1-2%), por lo que el diagnóstico puede dificultarse. El cuadro clásico de EN se presenta en parvadas con diferentes grados de inmunidad, se pueden observar signos nerviosos y digestivos, con baja en la producción de huevo y mortalidad superior al 5% (Camacho *et al.* 2006).

La rápida diseminación de la ENC durante las décadas de los 60 y 70 del siglo pasado fue atribuida al incremento en el comercio internacional de la avicultura comercial y de psitácidos. Estos eventos permitieron el desarrollo de vacunas inactivadas y con virus activo para controlar la ENC en la avicultura. Para la mayoría de las enfermedades infecciosas la vacunación es el método de elección para la prevención, apoyada por buenas prácticas de manejo y medidas de bioseguridad, pero la vacunación no substituye al manejo efectivo. La incidencia de los brotes de la EN está poco relacionada con la época del año y no está relacionada con la latitud (Soto *et al.* 2006).

Prevención y control

Los calendarios de vacunación empleados comúnmente en México antes y después del brote del año 2000 en la Comarca Lagunera se presentan en los cuadros 3 y 4 (Antillón, 2005).

Las opciones de vacunas para el establecimiento de los programas de inmunización son amplias. En el cuadro 5 se presenta un resumen de las vacunas usadas en México para la prevención de la enfermedad de Newcastle. Las vacunas con virus activo deben contener por lo menos 10^7 DIEP₅₀/ml o $10^{5.5}$ DIEP₅₀/dosis (NOM-052-ZOO-1995).

Miller *et al.* (2007, 2009b) mostraron que vacunas elaboradas con virus homólogo al del desafío redujeron más la excreción oral del virus que las vacunas heterólogas, lo que sugiere que el virus vacunal filogenéticamente más cercano al virus potencial de desafío puede facilitar el control de la EN al reducir la transmisión a partir de las aves infectadas. El estudio de Lucio *et al.* (2007) coincide con esta hipótesis, ya que al vacunar aves con virus homólogo o heterólogo (LaSota) al del desafío, las aves mostraron protección contra la manifestación clínica y aun contra la muerte. Al cuarto día post-desafío no se aisló virus de hisopos traqueales en el grupo con desafío homólogo, mientras que en el desafío heterólogo se logró el aislamiento en el 50% de las aves desafiadas.

Estudios sobre el virus velogénico en México

La infección viscerotrópica (Doyle, 1927) es aguda y letal en aves de todas las edades. Ocasiona signos respiratorios, digestivos, nerviosos y hemorragias en todos los órganos del aparato digestivo, la mortalidad puede alcanzar el 100%. Las cepas Chimalhuacán, Querétaro, Torreón y muchas más aisladas en México ocasionan este tipo de presentación.

En la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a través de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), se ha trabajado con el VEN para la realización de 66 tesis, 61 de licenciatura, 4 de maestría y una de doctorado. La primera consistió en la descripción de la enfermedad (Olvera, 1948), 21 se han relacionado con vacunas y vacunación, 19 con la evaluación inmunológica y serológica, 24 con aspectos de virología y diagnóstico, y en una se evaluó el efecto de dos desinfectantes. En las tesis de maestría se evaluaron el efecto de un inmunomodulador, la patogenia de las hemorragias, la caracterización por infectividad y análisis de restricción del gen F, y el desafío de palomas con el VEN (2008). La tesis de doctorado estudió el efecto de la aflatoxina B1 sobre la respuesta inmune de pollos Leghorn contra el VEN. Muchos de estos trabajos se han presentado en la Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, AC (ANECA).

En las 34 Convenciones Anuales de la ANECA, se han presentado 72 trabajos sobre la EN en México. En resumen, 35 han sido sobre vacunas, 20 relacionados con inmunidad y pruebas serológicas, 13 cubrieron aspectos de virología, en tres se evaluó la efectividad de desinfectantes y en uno se describió la historia de la enfermedad en el país.

Trabajos realizados durante 2000-2009.

En 2001, Galindo *et al.* infectaron experimentalmente a 25 pollitos libres de patógenos específicos con 10^6 DLEP₅₀ (dosis letal en embrión de pollo al 50%) de la cepa Chimalhuacán, por instilación nasal. Detectaron necrosis de los islotes hematopoyéticos de la médula ósea a las 48 horas

postinoculación (hpi), seguida de incremento en el conteo de heterófilos y descenso en la cuenta de monocitos y linfocitos a las 60 hpi. Los tromboplastos mostraron basofilia, con vacuolización del núcleo y el citoplasma. Durante el mismo periodo, fue evidente la hinchazón y vacuolización de las células endoteliales de los capilares, principalmente en los pulmones. Por lo anterior, se consideraron la trombocitopenia y el daño endotelial como las causas principales de las hemorragias. En el experimento se observó importante reducción en la cuenta de trombocitos a las 72 hpi y necrosis multifocal en la médula ósea, lo que sugiere que la trombocitopenia fue el resultado del daño directo ocasionado por el virus a las células precursoras en la médula ósea.

Algunas de las cepas mexicanas del virus de la enfermedad de Newcastle velogénica viscerotrópica estudiadas hasta la fecha han mostrado algunas diferencias en su índice de neuropatogenicidad en pollitos de 1 día de edad, tiempo medio de mortalidad y su comportamiento frente a glóbulos rojos de diferentes especies animales. Un estudio sobre la caracterización biológica de 4 cepas velogénicas, mostró que el tiempo medio de elusión de las cepas Chimalhuacán, Querétaro, Tlalpan y Torreón fue en promedio de 14 minutos. La dosis letal 50% en embrión de pollo fue $10^{6.7}$ para la cepa Chimalhuacán, $10^{6.3}$ para Querétaro, $10^{9.07}$ para Tlalpan y $10^{8.3}$ para Torreón. El rango de mortalidad del embrión de pollo fue de 36 a 48 horas (Juárez *et al.* 2002).

El trabajo de Ortiz *et al.* (2002) con las enzimas de restricción BstO I, Hinf I y Rsa I para la caracterización de 19 aislamientos del virus de Newcastle demostró que 6 estaban relacionados con el virus aislado en Torreón durante el brote del año 2000, 1 con la cepa Chimalhuacán y 4 con LaSota, los 8 restantes tuvieron patrones electroforéticos diferentes al de las cepas de referencia, pero no se continuaron trabajos de secuenciación para identificar plenamente a esos aislamientos.

En el estudio de Calderón *et al.* (2005), la cepa Chimalhuacán fue caracterizada por el análisis con enzimas de restricción del gen F, y se encontró que pertenece al genotipo II de los virus velogénicos. La infección experimental con esta cepa Chimalhuacán en pollos libres de patógenos específicos (SPF) de 6 semanas de edad, produjo signos clínicos a las 24 hpi y a las 48 horas se logró aislar el virus de la médula ósea. Histológicamente, a partir de las 36 horas se detectó degeneración y necrosis progresiva de los islotes hematopoyéticos de la médula ósea, coincidente con trombocitopenia severa. A las 72 hpi se observó 50% de descenso en la cuenta de trombocitos y monocitos, así como depleción celular completa en los islotes de la médula ósea. Los trombocitos son elementos indispensables para la hemostasis primaria, por lo que la trombocitopenia, aunada al daño endotelial severo, explican el carácter significativamente hemorrágico y agudo de las infecciones velogénicas con la cepa Chimalhuacán del VEN. En las evaluaciones anatomopatológicas realizadas en este trabajo y el de Galindo *et al.* (2001) no se observaron las hemorragias severas

en serosas intestinales, mucosa de la unión proventriculo - molleja, tonsilas cecales, hígado, ni en otros órganos viscerales, que se han descrito comúnmente en la literatura. Por lo anterior, resulta de gran importancia realizar la evaluación patogénica de las cepas velogénicas mexicanas (como Chimalhuacán, Querétaro y Torreón), así como su comparación con otros aislamientos mexicanos ya que estas cepas podrían representar una variante velogénica – endoteliotrópica - mielotrópica del VEN que no ha sido reportada o suficientemente caracterizada en la literatura especializada.

En 2006, Guerrero y colaboradores expresaron ADNc (1850 pb) de la proteína de fusión del VEN en maíz transgénico y realizaron estudios inmunológicos en pollos SPF de 45 días de edad, los cuales recibieron el maíz transgénico por vía oral y posteriormente fueron desafiados por vía intranasal con la cepa Chimalhuacán. Se detectaron anticuerpos contra el VEN por prueba ELISA, a partir de los 15 días postinmunización (dpi) y alcanzaron el máximo a los 45 dpi. Todas las aves inmunizadas sobrevivieron al desafío.

Estudios moleculares y análisis filogenéticos

Las cepas identificadas como 37821-550-1/96 y 37821-550-2/96 resultaron estar relacionadas con virus aislado de loro en 1996 en EUA (Seal *et al.* 1998, Locke *et al.* 2000), las cepas Largo/71 de EUA y 44813/00 y 44814/00 de Honduras (Seal *et al.* 2002), las cepas 44815/00 de Honduras y chicken/US(CA)/211472/02 que fue aislada durante el brote del suroeste de los EU en 2002 (Seal, 2004). Pedersen *et al.* (2004), determinaron la relación filogenética de aislamientos del VEN de los brotes de 2002-2003 en California y otras cepas contemporáneas, que incluyeron los virus de México 5166/98, 6244/98, 3242/99, 4100/99, 6246/99, 1/00, 2/00, 290/00, 3310/00 y 3313/00 las cuales están en el mismo grupo genético que los virus aislados en el sur de los EUA en 2002 y 2003. Miller *et al.* (2007) reportaron que la cepa Mexico/1996 pertenece al genotipo V y está fuertemente relacionada con la cepa CA/212676/2002, aislada en 2002-2003 en California, EUA.

Miller *et al.* (2006) y Lucio y colaboradores (2007, 2008) reportaron aislamientos velogénicos pertenecientes al genotipo 3c de la clasificación de Aldous *et al.* (2003), el cual corresponde al genotipo V en la clasificación de Czeglédi *et al.* (2006). Al comparar la homología entre cepas velogénicas de campo y cepa LaSota, obtuvieron 86.1%, 86.5%, 85.0%, y 86.5% para Chimalhuacán, P2005, A2006 y B2006, respectivamente. La comparación de la cepa P2005 con las otras dio porcentajes de homología de 86.1%, 93.7%, 93.8% y 95.6% para LaSota, Chimalhuacán, A2006 y B2006, respectivamente.

En el cuadro 7 se muestran los aislamientos mexicanos del virus de la EN que han sido incluidos en análisis filogenéticos de diferentes genes del virus.

El análisis filogenético de la proteína F de cepas de Paramixovirus tipo 1 de paloma (Ujvári *et al.* 2003), demostró que la cepa mexicana 220/1998, pertenece al genotipo VI, sublinaje VIb/1, originario de Norteamérica, y está relacionada filogenéticamente con cepas aisladas en los EUA y Canadá.

JUSTIFICACIÓN

Las cepas velogénicas viscerotrópicas mexicanas del virus de la enfermedad de Newcastle estudiadas hasta la fecha han mostrado algunas diferencias en su índice de neuro-patogenicidad en pollitos de 1 día de edad, tiempo medio de mortalidad y su comportamiento frente a glóbulos rojos de diferentes especies animales. Además, la caracterización previa de la cepa Chimalhuacán, resultó compatible con el genotipo II, el cual circuló en México antes de la década de los 70 del siglo pasado. La inoculación experimental de pollos SPF con esta cepa produjo signos clínicos a las 24 horas post infección y a las 48 horas se aisló el virus de la médula ósea; histológicamente, se detectó degeneración y necrosis progresiva de los islotes hematopoyéticos de la médula ósea a partir de las 36 horas, coincidente con trombocitopenia severa detectada en los análisis hematológicos del mismo estudio. Esta trombocitopenia, aunada al daño endotelial severo, explican las hemorragias de las infecciones velogénicas. Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios con otras cepas, de alta virulencia, que permitan identificar el o los grupos genéticos o la relación filogenética que tienen los VEN que circulan en las parvadas comerciales de aves en México.

Lo anterior destaca la importancia de realizar una evaluación molecular y patogénica de las cepas velogénicas mexicanas (como Chimalhuacán, Querétaro y Torreón) y compararlas con otros aislamientos mexicanos, ya que muy probablemente estas cepas representen una variante velogénica – endoteliotrópica - mielotrópica del VEN que no ha sido suficientemente caracterizada en la literatura especializada.

HIPÓTESIS

- Las cepas velogénicas mexicanas del virus de la enfermedad de Newcastle tienen características moleculares y de tropismo por el tejido endotelial, mieloide y linfoide de las aves infectadas, diferente a los descritos en la literatura especializada para las cepas velogénicas viscerotrópicas clásicas.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar las características moleculares y biológicas, con énfasis en el tropismo endotelial, mieloide y linfoide, de aislamientos mexicanos del virus de la enfermedad de Newcastle mediante estudios de biología molecular, infección experimental, virología e histopatología.

Objetivos particulares:

- Identificar la virulencia de aislamientos mexicanos del VEN mediante la prueba de tiempo medio de mortalidad embrionaria e índice de patogenicidad intracerebral
- Establecer la relación filogenética de los aislamientos mexicanos del VEN mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos del gen de la proteína de fusión.
- Evaluar el tropismo endotelial, mieloide y linfoide en pollos de engorda de 5 semanas de edad, mediante histopatología y virología, de las cepas velogénicas identificadas por las pruebas de virulencia y moleculares.

METAS

- Establecer la relación filogenética de los VEN aislados en México y compararla con los reportes de estudios similares realizados en Norteamérica. Con la caracterización biológica y molecular se obtiene información genética que confirma la identidad del virus, con lo que la avicultura se beneficiará por el conocimiento de la epizootiología, al identificar el origen de virus que causan enfermedad, sus reservorios, y disponer de mejores métodos para identificarlos rápidamente.

- Identificar cepas del VEN velogénicas – endotelio, mielo y linfotrópicas, lo cual reviste importancia significativa para el diseño de las estrategias de prevención, control y eventual erradicación de la enfermedad de Newcastle en México. La caracterización de estos virus, así como los estudios de patogenicidad para identificar la virulencia y los tejidos blanco servirán para reconocer la diversidad y el riesgo para la avicultura.

- Actualizar la literatura especializada en cuanto a la clasificación de variantes patogénicas de las cepas del VEN, mediante la inclusión del tipo velogénico – endotelio, mielo y linfotrópico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas virales

Se utilizaron 25 aislamientos del VEN, la mayoría de ellos conservados en ultra congelación desde el año 1997 en el cepario del Departamento de Producción Animal: Aves (DPAA), de la FMVZ-UNAM. Dos de estos aislamientos virales se obtuvieron en el año 2006. La información de cada cepa viral se muestra en el cuadro 9.

Para reactivar las cepas virales ultra congeladas, se emplearon 110 embriones de pollo comerciales. Se inocularon 5 embriones para cada cepa, por vía cavidad alantoidea, para posteriormente confirmar la viabilidad del virus con las pruebas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación con el uso de un suero policlonal, de acuerdo con la metodología descrita en la literatura especializada (Alexander, 1998). Las muestras positivas al VEN se mantuvieron congeladas a -85°C hasta su uso en las pruebas posteriores.

En total, se emplearon 625 embriones de pollo comercial de entre 9 y 11 días de incubación para calcular la dosis letal 50% del líquido alantoideo positivo al VEN de cada cepa. Se realizaron diluciones décuples (10^{-1} a 10^{-10}) de cada muestra en solución amortiguada de fosfatos (PBS) estéril, después se inocularon 5 embriones por cada dilución (10^{-6} a 10^{-10}) por la ruta de la cavidad alantoidea, 0.2 ml / embrión. Los embriones inoculados se mantuvieron en incubación a 37°C por 7 días. La viabilidad de los embriones se determinó por ovoscopia en intervalos de 24 horas hasta el final de la incubación; posteriormente se realizó la prueba de hemaglutinación con glóbulos rojos de pollos al 2% para establecer la presencia de partículas hemaglutinantes en el líquido alantoideo de todos los embriones, los muertos durante la incubación y los sobrevivientes. La identificación del agente hemaglutinante como VEN se hizo mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación con el uso de un suero policlonal hiper-inmune anti-VEN, en algunos embriones de cada cepa elegidos aleatoriamente. El punto final 50% de la dosis letal en embrión de pollo de cada cepa se calculó de acuerdo con el procedimiento descrito por Reed & Muench (1938).

Determinación de la virulencia de los aislamientos virales

Tiempo medio de mortalidad embrionaria (TMME). Una vez reactivadas la cepas, se utilizó el líquido alantoideo embrionario que contenía VEN activo para clasificar al virus como lentogénico, mesogénico o velogénico, de acuerdo con los lineamientos establecidos en la NOM-013-ZOO-1994.

Después de calcular la dosis letal 50%, las cepas virales fueron estandarizadas a una concentración viral de 100 dosis letales en embrión de pollo al 50% (10^2 DLEP₅₀) en 0.2 ml de inóculo, para proceder a la determinación del Tiempo Medio de Mortalidad Embrionaria (TMME). Cada cepa viral fue inoculada en 10 embriones comerciales de pollo de entre 9 y 11 días de incubación por la vía de la cavidad alantoidea y se mantuvieron en incubación a 37° C. Después de las primeras 24 horas de incubación, se realizó la ovoscopia de los embriones en intervalos de 2 a 4 horas.

El TMME se calculó con la fórmula:

$$TME = \frac{(NEX)(X) + (NEY)(Y) + \text{Etc.}}{NEM}$$

En donde:

TME= Tiempo de mortalidad embrionaria.

NEX= Número de embriones muertos a la hora X

X= Hora X

NEY= Número de embriones muertos a la hora Y

Y= Hora Y

ETC= Se aplica el mismo procedimiento para todos las diluciones restantes.

NEM= Número total de embriones muertos.

| TIEMPO DE MORTALIDAD | CLASIFICACIÓN DE LA CEPA |
|----------------------|--------------------------|
| Menos de 60 horas | Velogénico |
| De 60 a 90 horas | Mesogénico |
| Más de 90 horas | Lentogénico |

Análisis estadístico: El TMME de las cepas de VEN se analizó estadísticamente por comparación de medias ($\alpha = 0.05$).

Índice de Patogenicidad Intracerebral (IPIC). Se empleó la metodología descrita por la OIE (2008) con una modificación: Se utilizaron 10 pollitos libres de patógenos específicos de menos de 40 horas de nacidos, inyectados por vía intracerebral con 0.05 ml del fluido alantoideo de cada cepa de virus, en concentración de 32 unidades hemaglutinantes. Los pollitos fueron observados en intervalos de 12 horas (a diferencia de las 24 horas indicadas por la OIE, 2008) durante ocho días. En cada observación los pollitos fueron calificados como 0 si permanecieron sanos, 1 si

enfermaron y 2 si el pollo murió. Los animales agonizantes o incapaces de comer y beber fueron sacrificados por dislocación de las vértebras cervicales y calificados como 2 en la observación siguiente. Los pollitos muertos se registraron como 2 en cada día posterior a la muerte. El IPIIC correspondió al valor medio por ave por observación en el periodo de 8 días.

Pruebas de Biología Molecular

Muestras de líquido alantoideo positivo al VEN se inactivaron en tarjetas FTA[®] (Cat., WB120306, Whatman Inc, NJ 07932, USA) para transportar el ácido nucleico al Poultry Disease Research Center, University of Georgia (Athens, GA, USA). La transportación de las tarjetas se hizo posterior a la notificación a la Dirección General de Sanidad Animal de la SAGARPA y al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA).

Extracción del ARN a partir de las muestras en las tarjetas FTA[®]

El ácido nucleico de la muestra se resuspendió en FTA Purification Reagent (Cat., WB120204 Whatman Inc, NJ 07932, USA). Para extraer el ARN, se utilizó el High Pure RNA Tissue Kit (Cat. 12033674001, Roche Diagnostics Corporation, IN 46205, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se conservó a -80° C hasta su análisis posterior.

RT-PCR

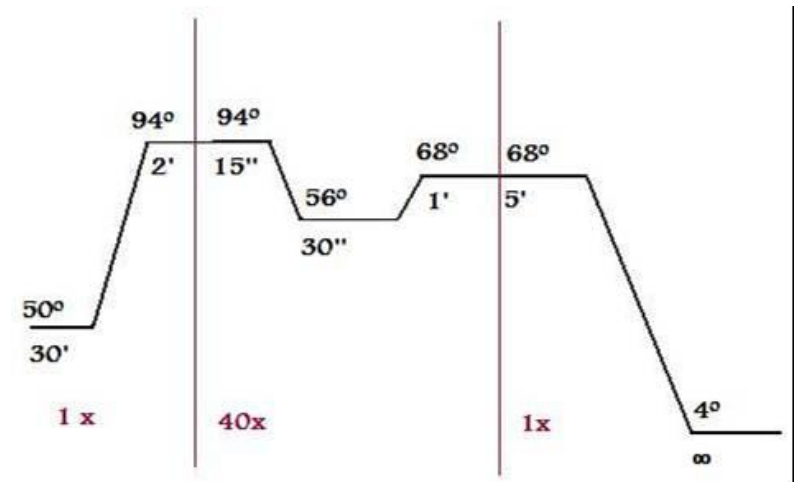
Se realizó la amplificación del gen que codifica para la proteína F del virus de la EN, con el SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Cat. 11922-042, Invitrogen Corporation, CA 92008, USA). Se amplificó un fragmento de 374 pb de la secuencia del gen F que rodea a aquella que codifica el sitio de ruptura de la proteína F, la cual se usa comúnmente para análisis filogenéticos, también se amplificaron dos regiones adicionales para extender la comparación con otros VEN disponibles en el GenBank. Las regiones amplificadas fueron: una porción de 374 pb del gene F (posiciones 4554 a 4971); la región completa que codifica para la proteína F (posiciones 4544 a 6205); y una región de 642 pb que corresponde a las posiciones genómicas 4352 a 4995 y que abarca parte del gen que codifica para la proteína M y del gen de la proteína F del gen completo de la cepa vacunal LaSota. Los iniciadores (Operon Biotechnologies, Inc., AL 35805, USA) para la amplificación y secuenciación de las regiones descritas fueron 4306F-GACCGCTGACCACGAGGTTA, 5005R-AGTCGGAGGATGTTGGCAGC, 4319F-GAGGTTACCTCYACYAAGCTRGAGA; 5106R-TCATTAACAAAYTGCTGCATCTTCCCWA-C, 4957F-GCAGCTCTGATACAAGCCAACC; 5856 (Anhinga) R-AGCCTCAGGGTTATTCCGTCTA-GGG, 4961F-GCTCTGATACARGCMAAMCAAA, 5772R-TGCGATATGATWCCCGGRG, y 5429F-AAYAATATGCGYGCCACCTACYTRG. Las posiciones señaladas fueron las del genoma completo

de la cepa LaSota (número de acceso del GenBank AF077761), excepto donde se indica la cepa Anhinga.

En cada caso, la mezcla maestra estuvo compuesta por:

| Reactivo | Volumen |
|--|---------|
| dNTPs 0.4 mM, MgSO ₄ 2.4 mM, 2x | 25 µl |
| H ₂ O DEPC | 15 µl |
| Enzima SuperScript™ | 1 µl |
| Iniciador Positivo | 1 µl |
| Iniciador Negativo | 1 µl |
| Muestra | 5 µl |

Condiciones para RT-PCR



Se preparó gel de agarosa TAE 1% (Tris, ácido acético glacial, EDTA y agarosa 1%) para separar, por duplicado, los productos de la amplificación por cargas eléctricas. Las muestras (50 µl) se mezclaron con 5 µl de tinción de carga que contenía bromuro de etidio 5 µg / ml, se incluyó un control de peso molecular (100 bp Ladder, Invitrogen Corporation, CA 92008, USA, Cat. 10488-058). La electroforesis se corrió a 150 v durante 25 minutos.

El gel se reveló en un transiluminador de luz ultravioleta para buscar la banda correspondiente al producto de amplificación de PCR.

Secuencia de nucleótidos y análisis filogenético

Se realizó en el Southeast Poultry Research Laboratory, United States Department of Agriculture, Athens, GA, USA.

Después del RT-PCR, se obtuvo el ADNc a partir del gel de electroforesis, con el uso del QuickClean DNA Gel Extraction Kit (Gen Script Corporation, NJ 08854, USA, Cat., L00199), posteriormente se llevó a cabo la secuenciación de las dobles cadenas de 17 cepas del VEN con dideoxinucleótidos fluorescentes en un secuenciador automático (ABI 3700 automated sequencer; Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). La edición y análisis de la secuencia de nucleótidos se completó con el programa de computación para analizar las secuencias LaserGene (LaserGene, version 5.07; DNASTar, Inc., Madison, WI) y completar el estudio filogenético (Kim *et al.* 2007).

Las secuencias de algunos de los virus de este estudio fueron reportadas al GenBank[®] (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894). Para la construcción del árbol filogenético se usaron las secuencias de varios virus cuyas secuencias están disponibles en el GenBank[®], el número de acceso de esos virus, así como las especies aviares y países en donde fueron aislados están disponibles en Perozo *et al.* 2008.

Evaluación de la patogenicidad: tropismo endotelial, mieloide y linfoide de las cepas velogénicas

Obtención del inóculo viral:

Las cepas virales velogénicas relacionadas con las cepas Chimalhuacán y Torreón, además de las cepas Querétaro, y DPAA, pertenecientes a diferentes genotipos y linajes, y la cepa LaSota como control de virus lentogénico, fueron reactivadas por inoculación intranasal (0.05 ml en cada fosa nasal) en 12 pollitos SPF de 10 días de edad (1er pase). La dosis de inoculación y la mortalidad que se presentó en las aves se muestra en el cuadro 9. La mayoría de aves murió entre las 72 y 84 horas post inoculación.

Después de retirar los cadáveres de la unidad de aislamiento, se introdujeron 2 aves SPF de 14 días de edad para ser expuestas al virus que las aves previamente inoculadas excretaron a través de las heces y las secreciones respiratorias, con el fin de dar un segundo pase a cada virus.

Se obtuvieron muestras de pulmón, tráquea y bazo de las aves muertas por la exposición al virus (segundo pase), y se preparó una suspensión al 20% en PBS estéril que fue centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos y posteriormente filtrada a través de membrana de 0.22 μm . Se obtuvo el título de dosis letales en embrión de pollo (DLEP) del inóculo obtenido. A partir de la suspensión se realizó la dilución apropiada para inocular 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml en las aves experimentales.

Animales de experimentación y alojamiento

Se utilizaron 24 pollos de engorda de 5 semanas de edad, de ambos sexos, para el estudio de las cepas virales. Se constató la ausencia de anticuerpos séricos contra la enfermedad de Newcastle mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. Las aves infectadas y testigos se alojaron en diferentes unidades de aislamiento, del DPAA de la FMVZ de la UNAM, las cuales cuentan con medidas de bioseguridad que evitan la entrada o salida de agentes infecciosos. Se les proporcionó alimento comercial y agua a libre acceso.

Diseño experimental:

Para cada cepa velogénica, y la cepa LaSota como cepa lentogénica testigo, las aves se dividieron en 7 grupos de 3 animales que fueron inoculados por vía intranasal con 0.2 ml del inóculo y 3 aves constituyeron el grupo testigo y fueron inoculadas con 0.2 ml de solución salina fisiológica. Las aves se evaluaron en busca de los signos clínicos.

Estudio Histológico

Los grupos de aves infectadas se sacrificaron a las 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 horas post inoculación (hpi), por dislocación de vértebras cervicales, seguida de desangrado durante 30-45 segundos, ocasionado por el corte de la vena yugular y la arteria carótida. Se tomaron muestras para estudio histológico, ultra-estructural y virológico. Las aves testigo se sacrificaron a las 96 hpi y se les realizó el mismo procedimiento que a las aves infectadas. Se realizó la necropsia de los animales sacrificados y se evaluaron las lesiones macroscópicas, asimismo se tomaron muestras de médula ósea de la porción proximal del fémur, de timos, de la bolsa de Fabricio, de tonsilas cecales, de la glándula de Harder y del bazo. Los órganos se fijaron en formol al 10% amortiguado a pH 7.4, se sometieron al proceso convencional para la tinción de hematoxilina y eosina. Las lesiones fueron evaluadas con un microscopio óptico. Se usaron las escalas de lesiones descritas por Henry *et al.* (1980), *Hamid et al.* (1991) y Aung *et al.* (2008), para la evaluación de las lesiones del timo y la bolsa de Fabricio; bazo y tonsila cecal; y glándula de Harder, respectivamente:

Timo. 0= Normal, 1= Corteza con pocos espacios vacíos, 2= Mayor número de espacios en la corteza, infiltración de heterófilos, 3= Corteza con numerosos agregados redondos de detritus celulares con núcleos picnóticos, decremento marcado de la corteza, 4= Atrofia severa de la corteza tímica.

Bolsa de Fabricio. Grado 0= normal, 1= folículos aislados con necrosis leve, 2= depleción linfoide moderada y generalizada o folículos aislados con depleción linfoide severa, 3= depleción linfoide

severa en más del 50% de los folículos, 4= folículos con escasos linfocitos y con quistes, aumento del tejido conectivo, epitelio engrosado y con pliegues, 5= pérdida total de la estructura folicular y marcada fibroplasia.

Bazo. 0= Normal, 1= hipertrofia - hiperplasia leve en elipsoides, 1-2 folículos linfoides proliferativos, 2= degeneración focal leve y varios folículos linfoides activos, 3= necrosis focal diseminada y folículos linfoides moderadamente activos, 4= necrosis difusa y diseminada, folículos linfoides muy activos.

Tonsila cecal. 0= Normal, 1= 1-2 folículos linfoides proliferativos por sección, 2= varios folículos linfoides activos, 3= amplia diseminación de folículos linfoides activos o necrosis focal.

Glándula de Harder: 0= Normal, 1= infiltración de linfocitos, 2= desarrollo de folículos linfoides.

En la búsqueda bibliográfica realizada para el desarrollo de este trabajo, no se encontraron referencias sobre la escala de lesiones aplicable a la médula ósea, por lo que se estableció la siguiente:

Médula ósea: 0= Normal, 1= Degeneración de células endoteliales, 2= Degeneración y necrosis moderada de células linfoides y granulocíticas, depleción linfoide y hemorragia, 3= Degeneración y necrosis severa de células linfoides y granulocíticas.

Análisis estadístico. El grado de lesión de los órganos afectados (médula ósea, timos, bolsa de Fabricio, tonsilas cecales, glándula de Harder y bazo) se comparó mediante las prueba estadísticas no paramétricas de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple por pares de Dunn (alfa= 0.05).

Evaluación de cortes semi-finos y ultraestructurales

Se tomaron muestras de los mismos órganos que para el estudio histológico y se fijaron por 1.5 horas en glutaraldehído al 2.5%, amortiguado con solución de Sorensen, pH 7.4, las muestras fueron cortadas en secciones de 3 a 5 mm. Después de la fijación, se lavaron con solución amortiguadora de Sorensen y se mantuvieron en refrigeración. Posteriormente se procedió a post-fijarlas con tetraóxido de osmio al 1% durante 2 horas, fueron deshidratadas en series de alcoholes a concentraciones crecientes y posteriormente incluidas en resina epóxica (Epon 812). Se realizaron cortes semi-finos de 200 nm aproximadamente y fueron teñidos con azul de toluidina y se evaluaron en el microscopio óptico. Los cortes finos de 60 nm fueron contrastados con acetato

de uranilo y citrato de plomo de Reynold's para ser observados y fotografiados en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 109.

Estudio Viroológico

Para confirmar la presencia del VEN en los diferentes tejidos, se realizó el aislamiento en embrión de pollo de 9 días de edad, a partir de los mismos órganos que se usaron para el estudio histológico. Los embriones inoculados se mantuvieron en incubación a 37° C por 7 días. La viabilidad de los embriones se determinó por ovoscopia en intervalos de tiempo de 24 horas hasta el final de la incubación; posteriormente se realizó la prueba de hemaglutinación con glóbulos rojos de pollos al 2% para establecer la presencia de partículas hemaglutinantes en el líquido alantoideo de todos los embriones, los muertos durante la incubación y los sobrevivientes al séptimo día. La identificación del agente hemaglutinante como VEN se hizo con la prueba de inhibición de la hemaglutinación con el uso de un suero policlonal hiper-inmune anti-VEN (Diagnósticos Clínicos Veterinarios, S.A. de C.V., México, DF), en algunos embriones inoculados de cada cepa y cada órgano, elegidos aleatoriamente.

RESULTADOS

La información de los aislamientos, así como la dosis letal 50% para el embrión de pollo, TMME, IPIC, resultado de RT-PCR, secuencia del sitio de activación de la proteína F, y cepa de referencia del GenBank, de las cepas evaluadas se muestran en el cuadro 8.

Tiempo medio de mortalidad embrionaria (TMME)

De las 25 cepas evaluadas, 18 se clasificaron como velogénicas, 3 mesogénicas y 4 lentogénicas. Se encontró diferencia estadística ($P < 0.05$) en el TMME dentro de las cepas velogénicas. Entre las cepas mesogénicas, las cepas B y G tuvieron TMME menor al de la cepa A ($P < 0.01$). No se encontró diferencia estadística en el TMME de las cepas lentogénicas ($P > 0.05$).

El TMME de la cepa Chimalhuacán fue de 39.7 horas; sólo una cepa, aislada originalmente en el año 2005, tuvo TMME semejante al de esta cepa (37.4 horas). Doce cepas tuvieron TMME entre 41.7 y 48.8 horas, entre ellas la cepa Querétaro (TMME = 43.2 horas) que también es empleada para las prueba de potencia de las vacunas contra la enfermedad de Newcastle. Cuatro cepas ocasionaron la muerte del embrión entre las 50.3 y 59.7 horas. De estas últimas, la cepa Torreón presentó TMME en el límite para ser considerada velogénica (59.7 horas).

Índice de Patogenicidad Intracerebral (IPIC)

El IPIC de varias cepas seleccionadas con base en la historia clínica de las aves de las cuales se aisló originalmente, se muestra en el cuadro 8. El IPIC varió de 1.59 (cepa G), a 1.94 (cepa O) en las cepas velogénicas.

RT-PCR

Todas las muestras fueron positivas por RT-PCR (cuadro 8). En la figura 4 se observa la banda del producto de amplificación del segmento de 374 pb de 6 de los virus analizados en este estudio. También se muestra el resultado del control positivo, control negativo, y el control de peso molecular.

Secuenciación del gen F

Los resultados de la secuencia de aminoácidos en las posiciones 112 a 117 del producto de amplificación del PCR de la proteína F de los aislamientos del virus de la enfermedad de Newcastle se muestran en el cuadro 8. La secuencia de aminoácidos en el sitio de activación de la proteína F muestra aminoácidos básicos correspondientes con cepas virulentas (RRQKRF) en las muestras velogénicas evaluadas. Todos los virus pertenecen a la clase II, y comprenden los genotipos II y V.

Para comparar a los virus de este estudio con las secuencias de otros VEN virulentos disponibles en el GenBank (la lista completa de los virus usados para la comparación, está en el artículo publicado como resultado de este trabajo, Perozo *et al.*, 2008). Se realizó el análisis por separado de los 3 segmentos del genoma señalados anteriormente. La comparación filogenética de la región completa que codifica para el gen de F, a partir de 7 de los virus de este estudio, con VEN publicados previamente de los genotipos I al VII, se muestra en la figura 5a. El análisis de la región de 374 pb del gen F usada previamente para estudios filogenéticos del VEN se muestra en la figura 5b; se observan dos grupos bien definidos dentro de los aislamientos de este estudio. Los virus aislados entre los años 1998 y 2001 se agrupan con los virus de aves de combate aislados en California, EUA, y con un virus aislado en México en 1996. Los virus aislados entre los años 2004 y 2006 están fuertemente relacionados entre ellos.

El análisis de la secuencia de la región de 642 pb que corresponde a las posiciones 4384-4999 del genoma del VEN, con cobertura parcial de los genes de las proteínas M y F permitió la comparación de algunos de los virus de este estudio (representativos de los dos grupos circulantes) con varias secuencias de aislamientos de los EUA y México disponibles en el GenBank (Figura 5c). Los virus aislados entre 1998 y 2001 estuvieron fuertemente relacionados con varios VEN virulentos aislados en México durante el mismo periodo de tiempo, así como con los virus aislados de los brotes de California, EUA, entre los años 2002 y 2003. Por otro lado, los virus aislados entre los años 2004 y 2006 estuvieron relacionados más fuertemente con el virus 71USMXD, aislado de aves exóticas en Florida, EUA, en el año 1971.

La cepa Querétaro es un virus ancestral aislado a principio de la década de los años 50 del siglo XX, y está agrupado en el genotipo II, el cual tiene como referencia a la cepa lentogénica vacunal LaSota, no se encontró ninguna cepa de campo reciente que esté relacionada con la cepa Querétaro. El genotipo V se ha identificado en Centro y Sudamérica desde la década de los 70 del siglo pasado. El análisis filogenético de la secuencia de aminoácidos muestra que los virus velogénicos de la enfermedad de Newcastle circulantes en México de 1998 a 2006 pertenecen a dos linajes del genotipo V, uno que persiste desde los años 70 del siglo XX y otro de mediados de la década pasada.

Caracterización biológica

En el cuadro 10 se muestran los principales signos clínicos observados a las 96 hpi en las aves inoculadas experimentalmente con el segundo pase de diferentes cepas virulentas del virus de la enfermedad de Newcastle que fueron reactivadas en pollitos SPF o la cepa vacunal LaSota.

Lesiones microscópicas

El cuadro 11 muestra los resultados de la evaluación del grado de lesiones encontradas en el timo de aves inoculadas por vía intranasal con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de cada cepa de virus de la enfermedad de Newcastle. El mayor grado de lesión a las 36 hpi fue causado por la cepa Chimalhuacán, a las 60 hpi por Chimalhuacán y DPAA, a las 72 hpi por Chimalhuacán, Torreón y DPAA, a las 84 hpi por Torreón y DPAA y a las 96 hpi por Chimalhuacán y Torreón (Figura 6).

En el cuadro 12 se presentan los resultados de la evaluación del grado de lesiones encontradas en el bazo de aves inoculadas por vía intranasal con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de cada cepa de virus de la enfermedad de Newcastle. El mayor grado de lesión a las 24, 36 y 48 hpi fue causado por la cepa DPAA, a las 60 y 72 hpi Torreón, a las 84 hpi por Torreón, seguida por Chimalhuacán, y a las 96 hpi por Chimalhuacán y DPAA (Figura 7).

Los resultados de la evaluación del grado de lesiones encontradas en la bolsa de Fabricio de aves inoculadas por vía intranasal con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de cada cepa de virus de la enfermedad de Newcastle se muestran en el cuadro 13. A partir de las 84 hpi se encontró diferencia estadística en el grado de lesiones ocasionadas por DPAA, y a las 96 hpi por Chimalhuacán y Torreón, seguidas por DPAA (Figura 8).

Las lesiones encontradas en la tonsila cecal de aves inoculadas por vía intranasal con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de cada cepa de virus de la enfermedad de Newcastle se presentan en el cuadro 14, el mayor grado de lesión fue causado por Chimalhuacán, Torreón y DPAA a las 96 hpi (Figura 9).

La escala de lesiones ocasionadas a la glándula de Harder varió de 1.0 a 1.7 en las muestras tomadas desde las 24 hpi y hasta las 96 hpi. No se encontró diferencia estadística significativa ($P>0.05$) en el grado de lesiones provocado por cualquiera de las cepas inoculadas, cuadro 15, figura 10.

En la médula ósea, el mayor grado de lesiones ($P<0.05$) lo ocasionó la cepa Torreón a las 48 hpi, mientras que a las 84 hpi fue causado por las cepas Torreón y Querétaro, y a las 96 hpi por las cepas Chimalhuacán y DPAA (cuadro 16, figura 11).

Cortes semi-finos

Desde las 36 hpi se observaron lesiones más severas en el timo de los pollos inoculados con la cepa Chimalhuacán; a partir de las 60 hpi, las cepas Chimalhuacán, Torreón y DPAa ocasionaron lesiones similares, entre ellas necrosis difusa en la médula del timo, también se observaron vasos sanguíneos cuyas células endoteliales presentaron degeneración y vacuolas (Figura 12). En la bolsa de Fabricio se observaron con lesiones entre el grado 3 y 4 a las 84 hpi, y las cepas Chimalhuacán y Torreón ocasionaron lesiones de grado 5, atrofia severa, en los folículos linfoides (Figura 13). En el bazo, la cepa DPA causó lesiones de grado 3 desde las 24 hpi, y alcanzó el grado 4 a las 96 hpi, junto con la cepa Chimalhuacán, se observó necrosis diseminada en la pulpa blanca y alrededor de las arteriolas, en las células endoteliales de éstas últimas, también se observó degeneración y vacuolización del citoplasma, así como hemorragias (Figura 14).

En la médula ósea, a partir de las 24 hpi se observó disminución de la línea celular granulocítica; en los pollos inoculados con las cepas, Querétaro y Torreón; además, esta línea presentó degeneración y se apreció *detritus* celular. Unas células granulocíticas presentaron proyecciones de la membrana celular y algunas células endoteliales mostraron el núcleo hinchado. A las 36 hpi los *detritus* celulares fueron más abundantes, también se observó vacuolización del citoplasma, tanto de las células granulocíticas como de las células endoteliales, ocasionados por las cepas Chimalhuacán, Querétaro y Torreón (Figura 15a). Las alteraciones de las células granulocíticas evolucionaron hasta producir necrosis que fue más evidente a partir de las 48 hpi. A las 60 hpi se apreció depleción marcada de las células granulocíticas, acompañada de necrosis y destrucción de los vasos sanguíneos, algunas células endoteliales se observaron con núcleos hinchados (vesiculares), edema perinuclear, además de vacuolización, fragmentación del citoplasma y pérdida de su estructura. A las 72 hpi continuó la degeneración marcada de las células granulocíticas, y se apreció mayor proporción de células de la línea eritropoyética. A las 84 y 96 hpi se observaron células endoteliales con proyecciones de la membrana celular, destrucción de vasos sanguíneos, depleción severa de células granulocíticas y aparición de células blásticas, las lesiones más severas las ocasionaron las cepas Chimalhuacán y DPAa (Figura 15b).

Microscopía electrónica

Hallazgos ultra-estructurales en la médula ósea:

En uno de los cortes de médula ósea se observaron granulocitos, heterófilos y eosinófilos inmaduros, los cuales se diferencian entre ellos porque los mielocitos heterófilos tienen una población heterogénea de gránulos, muestran retículo endoplásmico abundante con ribosomas y

un aparato de Golgi agrandado. Por otro lado, los mielocitos eosinófilos poseen población homogénea de gránulos, todos redondos y de tamaño y contenido relativamente similares. También se observaron células plasmáticas, linfocitos, células pericapilares, macrófagos y promielocitos (Figura 16).

Desde las 24 hpi., se observaron células granulocíticas con degeneración del citoplasma acompañado de edema y vacuolas (Figura 16). En algunas de estas células se observaron núcleos vesiculares con cromatina dispersa y fragmentación del citoplasma. También se apreciaron macrófagos con vesículas en el citoplasma y degeneración de la membrana celular. Además se observaron detritus celulares, los cuales se volvieron más abundantes con el paso del tiempo.

Desde las 24 hpi, en los heterófilos bien diferenciados, los cuales se caracterizan por sus gránulos ovales, se observaron proyecciones de la membrana celular (Figura 17). A partir de este tiempo se observaron partículas electrodensas de alrededor de 200 nm de diámetro, compatibles con partículas virales, entre los detritus celulares. Estas partículas también se observaron adheridas a la membrana celular y en vesículas dentro del citoplasma celular (Figura 18).

De las 48 y hasta las 96 hpi se observó depleción marcada de diferentes líneas celulares, principalmente granulocitos. La necrosis y apoptosis de los granulocitos aumentó con el paso del tiempo. Se observaron partículas virales desde las 24 hpi en el espacio extracelular, en vesículas citoplásmicas en el interior de las células y en los restos de células necróticas (Figura 19).

Aislamiento viral

En los cuadros 17 a 21 se muestran los resultados del aislamiento viral a partir de órganos procedentes de aves inoculadas con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de diferentes cepas del VEN. El aislamiento de la cepa Torreón resultó positivo en las muestras de bazo, tonsila cecal y bolsa de Fabricio, tomadas a las 24 hpi de los pollos; a las 36 hpi se sumó el timo y todas las muestras tomadas entre las 48 y 96 hpi de los pollos resultaron positivas al aislamiento. El aislamiento de las cepas Chimalhuacán y DPAA se logró de las muestras de timo, bazo, tonsila cecal y bolsa de Fabricio tomadas a las 36 hpi, a partir de las 48 hpi todas las muestras resultaron positivas al aislamiento viral. El aislamiento de la cepa Querétaro inició con la muestra de bolsa de Fabricio tomada a las 48 hpi, a partir de las 60 hpi todas las muestras resultaron positivas al aislamiento viral. La cepa LaSota se recuperó de glándula de Harder y tonsila cecal a las 48 horas, a partir de las 60 horas y hasta las 96 horas el virus estuvo presente también en la bolsa de Fabricio.

DISCUSIÓN

En este estudio se determinaron las características moleculares y patogénicas de aislamientos virulentos del VEN. Se puso especial atención al tropismo del virus sobre el tejido linfoide y mieloide, ya que al estar la mayoría de las parvadas vacunadas contra la EN, la tasa de mortalidad observada es baja, pero el efecto inmunodepresor que la infección ocasiona no ha sido suficientemente estudiado.

La cepa Chimalhuacán es altamente virulenta y por ello es la cepa estándar de desafío para realizar la prueba de potencia de las vacunas elaboradas para prevenir la EN. En este estudio se encontró que el TMME de esta cepa es de 39.7 horas, que es significativamente menor que las 55 horas reportadas por Alexander (2003), para la cepa de referencia de los EUA, GB Texas, la cual es considerada de muy alta virulencia. Con este resultado se infiere que la cepa mexicana Chimalhuacán es más virulenta que la cepa estándar de desafío de los EUA.

En este estudio, la cepa Torreón presentó TMME en el límite para ser considerada velogénica (59.7 horas); sin embargo, fue responsable brote de la enfermedad de Newcastle del año 2000 en la región de La Laguna, en los límites entre Durango y Coahuila, que ocasionó graves pérdidas económicas asociadas con la cuarentena y despoblación de más de 13.6 millones de aves de más de 90 granjas comerciales (Shane, 2000).

El TMME de las cepas B y G (61.5 y 62 horas, respectivamente) las ubica como mesogénicas, de acuerdo con la NOM-013-ZOO-1994, sin embargo, la secuencia del sitio de activación de la proteína F identifica a la cepa G como virulenta; la cepa B no fue secuenciada debido a las características epizootiológicas del aislamiento, el cual se consideró relacionado con la cepa C.

A pesar de que la prueba del TMME ha sido eliminada del Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009 de la OIE (2010), los resultados de la prueba en este estudio indican que se puede usar esta metodología para identificar diferencias en la virulencia entre cepas lentogénicas y velogénicas del virus de la enfermedad de Newcastle, cuando se estandariza la dosis de virus que se inocular en el embrión de pollo, pero existe la posibilidad de que no facilite la diferenciación entre cepas mesogénicas y velogénicas. Sin embargo, es necesario realizar estudios de biología molecular para confirmar la validez del TMME al establecer diferencias entre cepas virulentas del virus de la enfermedad de Newcastle. Por otra parte, se debe revisar y en su caso modificar la NOM-013-ZOO-1994, ya que aún no se actualiza con la normatividad internacional en cuanto a la definición de la enfermedad y los criterios para la determinación de la

virulencia de los virus aislados, sin olvidar que la prueba del TMME puede ser más fácil de implementar en laboratorios que no cuentan con instalaciones y equipo adecuados para realizar las pruebas de IPIC o la secuenciación de la proteína F del virus para predecir la virulencia.

La dosis letal en embrión de pollo varió de $10^{8.1}$ a $10^{9.5}$ DL₅₀/ml y no parece estar relacionada con el linaje filogenético del virus. En las pruebas de patogenicidad, la cepa oficial de desafío Chimalhuacán tuvo el menor TMME (39.7 horas). Los valores del TMME fueron menores para los virus aislados después de 2001 (43.9 horas), comparados con el promedio de los virus aislados de 1998-2001 (54.3 horas), lo que sugiere que hay diferencia en la virulencia entre ambos grupos de virus. El IPIC promedio fue mayor (1.92) en los virus aislados durante 2004-2006, que en aquellos aislados antes de 2001 (1.74), lo que también indica una ligera diferencia en la virulencia entre los grupos de virus. Los resultados del TMM e IPIC sugieren que la presión selectiva sobre la cepa Chimalhuacán permitió la aparición del grupo nuevo (semejante a la cepa Torreón) a mediados de la última década del siglo XX (Merino *et al.* 2009a).

Los resultados del análisis filogenético muestran que la avicultura mexicana se enfrenta a dos linajes del genotipo V del virus velogénico de la enfermedad de Newcastle, uno que persiste desde los años 70 del siglo pasado (virus aislados entre 2004 y 2006) relacionado con la cepa Chimalhuacán, asociada a su vez con la cepa Largo71, y otro de finales de la década pasada relacionado con el virus que ocasionó el brote en la Laguna en el año 2000 (aislamientos de 1998 a 2001), el cual aparentemente circula en México por lo menos desde 1996 y que a su vez está filogenéticamente relacionado con la cepa gamefowlUS02, responsable de los brotes del sur de los EUA durante 2002 y 2003. Los resultados de la identificación molecular de algunos de los virus fue publicada por Merino *et al.* 2008 y Perozo, Merino *et al.* (2008).

Esta evidencia indica que el virus Chimalhuacán evolucionó a través del tiempo para dar origen al virus tipo Torreón. Es bien conocido que la evolución del VEN, dependiente de la acumulación de sustituciones de aminoácidos debida a mutaciones puntuales, es un proceso lento (Toyoda *et al.* 1989). Sin embargo, la presión inmune del hospedero inducida por la vacunación puede acelerar la tasa de evolución (Yu *et al.* 2001). La secuencia GGRRQKRF encontrada en el sitio de activación de la proteína de fusión de todos los virus velogénicos de este estudio revela que los cambios evolutivos de la cepa Chimalhuacán que llevaron a la aparición de la cepa Torreón ocurrieron en un sitio diferente. Es importante considerar que en la evolución del VEN puede influir la recombinación del gen de la proteína F, no sólo entre poblaciones naturales de VEN circulantes, sino incluso entre virus de diferente genotipo (Qin *et al.*, 2008), y también entre virus circulantes y el linaje vacunal (Han *et al.* 2008).

El aislamiento de virus estrechamente relacionados con la cepa Chimalhuacán, más de 30 años después del primer aislamiento de ésta, no es extraño, ya que los virus con características genéticas específicas no necesariamente son reemplazados por las variantes emergentes, y pueden ser aislados muchos años después de su primera aparición (Lomniczi *et al.* 1998). Los resultados filogenéticos de este trabajo han servido para demostrar la persistencia del virus velogénico en nuestro país y cómo éste está en constante evolución (Miller *et al.* 2009a, 2010). El amplio rango de células que pueden infectarse con virus velogénicos puede contribuir a expandir la diversidad de la población viral, y por lo tanto mejorar la capacidad de virus para adaptarse y evolucionar.

Aunque la secuencia de aminoácidos en el sitio de activación de la proteína F no mostró diferencias entre los virus relacionados con las cepas Chimalhuacán y Torreón, no es de sorprender que en este estudio se hayan encontrado diferencias en la virulencia, ya que es sabido que la patogenicidad del virus está determinada por varios factores, algunos de ellos bien estudiados y otros por dilucidar. Panda *et al.*, (2004) evaluaron el papel de la secuencia del sitio de activación de la proteína F sobre la virulencia del VEN. Usaron técnicas de ingeniería genética para mutar la secuencia GRQGR del sitio de activación de la cepa LaSota a la secuencia RRQKR, la cual está presente en el sitio de activación de la cepa neuro-virulenta Beaudette C (BC). La cepa mutante LaSota VF no requirió de proteasas exógenas para infectar cultivos celulares. Al evaluar *in vitro* la virulencia del virus mutante y sus virus parentales, la cepa mutante incrementó IPIC de 0.0 (LaSota) a 1.12 (LaSota VF), el cual no fue tan alto como el de Beaudette C (1.58). Por otro lado, el IPIV fue 0.0 para LaSota y LaSota VF, mientras que fue 1.45 para Beaudette C. Sus resultados demostraron que la activación de la proteína F tiene actividad importante si se inocula directamente al cerebro de los pollos, pero hay otros factores del virus, lo cuales no fueron explicados, que afectan la replicación periférica, la viremia o la entrada al sistema nervioso central.

En el estudio de Huang *et al.*, (2004), donde se insertó el gen HN de la cepa LaSota en la cepa Beaudette y viceversa, se observó que el virus recombinante Beudette C con gen HN de LaSota fue menos virulento que el virus Beaudette C y, por el contrario, el virus recombinante LaSota con gen HN de Beaudette C fue más virulento que LaSota, cuando se realizaron las pruebas de IPIC y TMME. Estos resultados indican que las características biológicas *in vitro* de la HN son buenos indicadores de la patogenicidad *in vivo* y que sus genes contribuyen de manera importante a la virulencia de los aislamientos y que determina el tropismo viral en embriones de pollo, independientemente de la activación de la proteína F, lo que puede estar asociado con diferencias en el reconocimiento del receptor y la actividad de la NA. En sus estudios, de Leeuw *et al.* (2005) y

Wakamatsu *et al.* (2006), encontraron los mismos resultados, sólo que ellos trabajaron con la cepa Herts33 en lugar de Beaudette C. En 2006, Römer-Oberdörfer *et al.* confirmaron que la modificación del sitio de corte de la proteína de fusión hacia una secuencia poli-básica, incrementa el IPIC de la cepa Clon 30 de 0.0 a 1.28 y demostraron además que el cambio adicional en el aminoácido 123 de HN, de triptófano a cisteína, en combinación con la alteración del aminoácido 27 de F, de cisteína a arginina, incrementa el índice de patogenicidad intracerebral a 1.5. La mutación en la HN modificó su conformación, lo que resultó en la formación de dímeros de HN unidos por puentes disulfuro, lo cual aparentemente da una conformación de la proteína que es benéfica para el fenotipo virulento. Estevez *et al.* (2007) a su vez, confirmaron que la virulencia y patogenicidad del VEN tiene una base multigénica, ya que ellos no lograron incrementar la virulencia de la cepa mesogénica Anhinga al insertarle HN de virus velogénico viscerotrópico o neurotrópico. Rout y Samal (2008), reemplazaron la proteína L del virus BC con la de LaSota, y observaron un incremento significativo de la virulencia del BC recombinante, lo que sugiere que la proteína L polimerasa del VEN, en adición a la secuencia del sitio de activación de F y otras proteínas virales o secuencias de nucleótidos en el ARN genómico del VEN, también es un determinante de la virulencia. Además, Yan y Samal (2008) demostraron que la patogenicidad de la cepa BC puede modularse al cambiar la longitud de las regiones no codificadoras del genoma del VEN, ya que virus recombinantes con secuencias intergénicas acortadas o extendidas en F-HN o en HN-L alteran su transcripción del gen, lo cual afecta la virulencia. Del mismo modo, Yan *et al.* (2009) demostraron que las regiones no traducidas del gen HN pueden no ser necesarias para la replicación del virus *in vitro*, pero sí tienen participación importante en la replicación y patogenicidad *in vivo*.

De acuerdo con Lamb *et al.* (2006), para entender la virulencia, asociada con la fusión de la envoltura viral y la membrana celular, se requiere de estudios que incluyan la obtención de la estructura no activada de F, así como el entendimiento de la conformación de F ya activada, cómo la HN activa a F y estudiar la interacción entre ambas, para lo que se requiere de experimentos bioquímicos e información estructural. En este sentido, Kim *et al.* (2009) demostraron que la porción citoplásmica de HN tiene una función crucial en el ciclo de replicación del VEN. Su trabajo sugiere que los dos primeros aminoácidos de la porción citoplásmica no son absolutamente necesarios para la replicación viral, pero los aminoácidos de las posiciones 4 a 6 son esenciales para la inserción de la proteína HN a los viriones, y que este extremo citoplásmico de la proteína HN modula la actividad de fusión del VEN, pero aún es necesario determinar qué efecto tiene la modificación de este extremo sobre la interacción entre HN y F. Del mismo modo, se ha estudiado el efecto de la actividad antagonista de la proteína V del VEN sobre el interferón y su participación en la virulencia (Alamares *et al.* 2009).

Al evaluar las bases moleculares del incremento en la virulencia de aislamientos de paramixovirus de las palomas (PPMV1) Collins *et al.* (1994, 1996) concluyen que la amplia variación en la patogenicidad de aislamientos de PPMV-1 para los pollos está relacionada con factores de virulencia desconocidos, además de la diferencia en la secuencia de aminoácidos en el sitio de activación de la proteína F y la extensión de la proteína HN. De acuerdo con Kommers *et al.* (2003), la naturaleza de la adaptación específica, selección o mutación en sitios diferentes al de la activación F permanecen sin definir.

Las lesiones microscópicas ocasionadas por el aislamiento tipo cepa Chimalhuacán en los órganos linfoides de los pollos de engorda inoculados fueron ligeramente más severos que aquellas ocasionadas por la cepa Torreón. En comparación, el IPIC medio de varios aislamientos de China pertenecientes a los genotipos VIIa y VIII fue 1.7 (rango 1.48 – 1.83) y 1.81 (rango 1.74 – 1.93), respectivamente (Liang *et al.* 2002). Esto sugiere que se pueden encontrar diferencias en la virulencia de aislamientos pertenecientes a diferentes genotipos y dentro del mismo genotipo, cuando se mide por el IPIC. Los resultados de las lesiones microscópicas ocasionadas por algunos de los virus analizados en este estudio, ya fueron publicadas (Merino *et al.* 2009)

Las lesiones microscópicas en el timo y la bolsa de Fabricio, causadas por la cepa Torreón, fueron similares a las reportadas por Okoye *et al.* (2000) y Wakamatsu *et al.* (2006) para cepas virulentas, estas lesiones fueron depleción linfóide severa acompañada de necrosis linfocelular y apoptosis. La depleción linfóide se observó primero en la bolsa a los 2 - 3 dpi, fue severa a partir del 6º dpi y la atrofia fue evidente al 7º dpi. Observaron también el bazo con necrosis linfóide de leve a moderada y depleción a partir del 3er dpi, las cuales se hicieron severas a partir del 4º dpi, el incremento en el número de centros germinales lo observaron a partir de los 10 dpi. El timo y las tonsilas cecales mostraron necrosis linfóide al 3er dpi y la lesión fue severa al 4º dpi, estas lesiones en las tonsilas cecales también coinciden con las descritas por Sun *et al.* (2008). Las lesiones en el timo son semejantes a las reportadas por Lam *et al.* (1995) quienes observaron abundantes células apoptóticas y varias formas de cuerpos apoptóticos, en embriones de pollo inoculados experimentalmente con la cepa GB. La atrofia y depleción linfóide en el timo, tonsila cecal y bazo fueron más severas que las observadas generalmente en la infección de la bolsa de Fabricio (IBF), lo que difiere de lo reportado por Hamid *et al.* (1991) y Okoye *et al.* (2000) quienes consideran que las lesiones en la BF son menos severas que en el caso de IBF.

Los hallazgos histológicos y ultra estructurales en la médula ósea por microscopía electrónica son de destacar. Como resultado de la infección por el virus, los macrófagos pueden producir progenie

del VEN y sufren apoptosis y necrosis, Lam *et al.* (1996) reportaron alteraciones similares en cultivos de macrófagos inoculados con VEN. Por su parte, Ravindra *et al.* (2009a, 2009b) concluyen que el efecto citopático del VEN en cultivo celular es causado por la inducción de apoptosis por diferentes mecanismos a través del tiempo, y que, aunque varios mecanismos más contribuyen a la patogenicidad del virus *in vivo*, además de la apoptosis, el descubrimiento de las causas de la patología ocasionada por el VEN *in vivo* ayuda a entender mejor la patogénesis de la enfermedad. La observación de partículas virales dentro de vesículas presentes en el citoplasma de algunas células granulocíticas coincide con los hallazgos de Cantin *et al.* (2007) quienes confirman que el VEN puede penetrar e infectar a las células a través de diferentes vías, y que, además de la fusión directa con la membrana plasmática, algunos viriones pueden ser endocitados en endosomas, donde puede ocurrir la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular.

Galindo *et al.* (2001), reportaron lesiones en la médula ósea similares a las observadas en este estudio, incluida la observación de partículas electrodensas en los restos de células destruidas y en vesículas dentro del citoplasma de células mononucleares. La morfología de estas partículas electrodensas es compatible con el VEN, el cual aparece en la microscopía electrónica como esferas pleomórficas de 100-500 nm de diámetro, con una membrana densa y cubierta por una envoltura (Alexander y Senne, 2008). El aislamiento del virus a partir de las muestras de médula ósea confirmó que las partículas electrodensas observadas con el microscopio electrónico corresponden con el VEN. Esta observación de partículas virales concuerda con las observaciones de Ojok y Brown (1996), quienes encontraron daño severo en la médula ósea, caracterizado por necrosis de los islotes hematopoyéticos, y determinaron la presencia del virus por medio de inmunohistoquímica.

Las células endoteliales, que también tienen funciones fagocitarias de microorganismos, son afectadas por virus con tropismo por los endotelios. En la evaluación de la médula ósea, estas células endoteliales presentaron degeneración y necrosis desde las 24 hpi, que a su vez puede ser responsable de hemorragias y la necrosis del tejido adyacente. Este daño también fue descrito por Ojok y Brown (1996).

Las lesiones ocasionadas por la cepa LaSota empleada en este estudio como virus lentogénico de referencia para comparar la intensidad del daño, coinciden con las observadas por Ezema *et al.* (2009) quienes reportaron depleción linfoide moderada y degeneración en la médula de los folículos de la BF, la cual estuvo atrófica a los 3 dpi. El bazo mostró picnosis linfoide leve y depleción del 3er al 5º dpi, mientras que tanto el timo como las tonsilas cecales tuvieron depleción linfoide leve entre los 3 y 5 dpi.

En México, el último brote de campo importante en la avicultura comercial lo ocasionó la cepa Torreón en el año 2000, en la región de la Comarca Lagunera, una de las áreas más productivas en el sector pecuario del norte de México. El brote causó importantes pérdidas económicas en 93 granjas debido a que su control implicó la muerte o sacrificio de más de 13.6 millones de aves. Los resultados del TMME, IPIC y desafío de pollos de engorda indican que la presión selectiva que los intensos programas de vacunación han ejercido sobre la cepa Chimalhuacán, aislada originalmente en 1973, pudo permitir la aparición de este linaje ligeramente menos virulento, pero aún velogénico (relacionado con la cepa Torreón) a mediados de la década de los 90 del siglo pasado. De acuerdo con los resultados de TMME e IPIC de este estudio, la cepa Torreón fue una de las menos virulentas de las cepas velogénicas estudiadas. Los resultados del IPIC de la cepa Torreón son semejantes a los reportados por Seal *et al.* (1998), 1.75, y Pedersen *et al.* (2004), 1.67, para aislamientos de México realizados entre los años 1996 y 2000, respectivamente, los cuales están relacionados filogenéticamente con esta cepa.

Es interesante el hallazgo de que el virus aislado de paloma en el año 2004 y relacionada filogenéticamente a la cepa Chimalhuacán sea capaz de inducir EN velogénica en palomas, ya que la infección por este virus en esa especie generalmente se identifica como mesogénica. El IPIC 1.93 de la cepa de paloma es mayor que el reportado por Kim *et al.* (2008) para 15 virus aislados de palomas en los EUA (0.98 – 1.35).

Debe destacarse la importancia que tienen las especies de aves diferentes al *Gallus gallus* como fuente potencial de VEN que puede transmitirse a la avicultura comercial. En este estudio se aisló el VEN de palomas y codornices. El estudio de Nishizawa *et al.* (2007) demostró que el pato Pekín no desarrolla signos clínicos de EN cuando se desafía con VEN velogénico, lo cual es importante epizootiológicamente, ya que esta especie de pato puede diseminar el virus por 20 o 30 días después del desafío; por lo tanto, la vacunación contra EN puede ser necesaria para reducir la excreción del virus en aquellas especies de aves refractarias a la enfermedad y que pueden estar cercanas o en contacto con empresas avícolas. En contraste, el faisán puede infectarse y manifestar signos clínicos de diferente intensidad, al ser vacunados la infección puede ser inaparente o de intensidad leve, pero estas aves vacunadas pueden comportarse como diseminadores asintomáticos del virus velogénico (Aldous y Alexander, 2007). Del mismo modo, pichones infectados con virus altamente virulento para los pollos pueden no mostrar signos clínicos de la enfermedad y al mismo tiempo ser capaces de diseminar al virus hasta por 24 días (Torres *et al.* 2008). Además, el estudio de Zanetti *et al.* (2008), muestra cómo un virus avirulento aislado de un ganso silvestre modificó su virulencia y secuencia de aminoácidos en el sitio de activación de la

proteína F, al ser pasado 20 veces en embrión de pollo, con lo que adquirió características de virus mesogénico. Estos estudios realzan la importancia de la vigilancia constante en los sistemas de producción de especies de aves como palomas, faisanes, patos, etc. (también conocida como avicultura alternativa) y también en aves migratorias, para minimizar el riesgo de la transmisión del VEN a los pollos comerciales, como se hace actualmente para la vigilancia de la influenza aviar.

Finalmente, los resultados de este estudio son de gran importancia para el conocimiento de la epizootiología de la EN, así como para el entendimiento de las posibles causas de brotes de la EN en parvadas comerciales de aves vacunadas contra esta enfermedad. Los calendarios de vacunación han demostrado su eficacia para proteger a las aves contra la mortalidad, sin embargo, aún hace falta la realización de trabajos que evalúen las consecuencias del daño que ocasiona el virus patógeno de campo en los órganos linfoides y médula ósea hematopoyética. Indudablemente, éstos VEN velogénicos aislados en México ocasionan un grave daño a los órganos linfoides de aves no inmunizadas y aunque la infección de campo no ocasione grandes pérdidas económicas asociadas con la mortalidad de las aves, seguramente las aves sobrevivientes tendrán comprometida la respuesta inmune, porque el virus sí ocasiona lesiones en los órganos linfoides de aves vacunadas. Por ejemplo, Hamid *et al.* (1991) encontraron atrofia severa de la bolsa que persistió por 20 dpi en algunas aves, así como necrosis focal y transitoria de los linfocitos de la BF y también reportaron atrofia de otros órganos linfoides en aves inmunizadas y desafiadas, por lo que deben evaluarse las implicaciones de las lesiones, especialmente en aves jóvenes. Nakamura *et al.* (2008) reportaron brotes de EN en parvadas de pollo de engorda vacunados contra esta enfermedad, las lesiones microscópicas en los órganos linfoides de las aves incluyeron depleción linfóide de la BF, también se demostró la presencia de antígenos del VEN en este órgano por inmunoperoxidasa.

Cho *et al.* (2008) y Hu *et al.* (2010) explican la presentación de brotes de EN en parvadas vacunadas como consecuencia de la acumulación de mutaciones tanto en el epítipo lineal de la HN (residuos 354 al 353) como alrededor del mismo, por lo que consideran que la selección antigénica como consecuencia de la vacunación intensiva es muy probable. Del mismo modo, y de acuerdo con Hughes (2009), las cepas vacunales pueden acumular numerosas diferencias en la secuencia de aminoácidos, comparadas con las cepas de campo, lo que puede afectar potencialmente sus propiedades biológicas, incluidas la antigenicidad y efectividad de la vacuna. La acumulación selectiva de mutaciones neutrales o casi neutrales se incrementa con el número de generaciones de replicación que sufre el virus vacunal; por lo tanto, el minimizar el número de generaciones entre la semilla maestra original y las cepas usadas en la vacunación parece ser una medida práctica para disminuir esta acumulación de mutaciones. Este fenómeno fue descrito

también por Mohan *et al.* (2005, 2006) cuando al atenuar un virus velogénico en cultivo celular, el análisis de la secuencia de F reveló un total de 134 substituciones de nucleótidos, lo cual resultó en el cambio de 41 aminoácidos entre el virus original y el obtenido luego de 50 pasajes. Lo que quiere decir que al perder virulencia, también es posible que el virus presente cambios antigénicos que pueden ocasionar fallas en la vacunación, si se quisiera usar un virus homólogo atenuado para proteger a las aves contra el virus patógeno de campo.

CONCLUSIONES

Este estudio demostró que los virus velogénicos que circulan en México pertenecen a dos linajes del genotipo V, y que afectan tanto a granjas comerciales como a aves de combate y otras especies animales como la paloma y codorniz.

Además, la información genética obtenida en este estudio ya ha servido para demostrar la persistencia de virus velogénico en México por más de 35 años y también se ha demostrado que el virus ancestral altamente virulento Chimalhuacán aislado en 1973 evolucionó para dar origen al virus Torreón el cual aunque es ligeramente menos virulento, sigue siendo velogénico, de acuerdo con los resultados de TMME, IPIC y desafío de pollos de engorda, y sigue en proceso evolutivo.

Las lesiones encontradas en los órganos linfoides demuestran claramente que estos virus velogénicos aislados en México tienen tropismo por los órganos linfoides, tanto primarios como secundarios, así como por las líneas celulares granulocíticas y los endotelios, en los cuales ocasionan daño severo.

Este tropismo es de particular importancia en la médula ósea, donde se demostró que el virus destruye de manera importante a las células mieloides granulocíticas, particularmente a los heterófilos y eosinófilos, además de los macrófagos. También se confirmó que hay destrucción de las células endoteliales, con las consecuentes hemorragias y necrosis tisular.

El tropismo endotelial, mieloide y linfoide del virus velogénico confirmados en este estudio no ha sido de gran interés en los países donde estos virus se consideran exóticos, porque al reportarse un brote se toman medidas inmediatas para la cuarentena, sacrificio humanitario, limpieza y desinfección de las instalaciones. En cambio, el efecto del virus sobre el tejido linfoide y endotelial debe ser causa de especial atención en países como México, donde se presentan brotes esporádicos de la enfermedad, aun en parvadas comerciales vacunadas, por lo que las aves que sobreviven al desafío tienen, además de pérdidas económicas asociadas con esta infección, predisposición a otros padecimientos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abolnik C, Horner RF, Bisschop SP, Parker ME, Romito M, Viljoen GJ. A phylogenetic study of South African Newcastle disease virus strains isolated between 1990 and 2002 suggests epidemiological origins in the Far East. *Arch. Virol.* 2004, 149: 603–619.

Alamares JG, Elankumaran S, Samal SK, Iorio RM. The interferon antagonistic activities of the V proteins from two strains of Newcastle disease virus correlate with their known virulence properties. *Virus Research* 2010, 147: 153–157

Al-Garib SO, Gielkens ALJ, Gruys E and Koch G. Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination. *World's Poultry Sc J*, 2003 (59): 185-200.

Aldous EW, Mynn JK, Banks J and Alexander DJ. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathology*, 2003, 32(3):239-257.

Aldous EW, Alexander DJ, Newcastle disease in pheasants (*Phasianus colchicus*): A review. *The Veterinary Journal* 2008, 175: 181–185.

Alexander DJ, Campbell G, Manvell RJ, Collins MS, Parsons G, McNulty MS. Characterisation of an antigenically unusual virus responsible for two outbreaks of Newcastle disease in the Republic of Ireland in 1990. *Vet. Rec.* 1992, 130(4): 65–68.

Alexander DJ, Manvell RJ, Lowings P, Frost KM, Collins MS, Russell P & Smith J. Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 1997, 26: 399-418

Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev Sci Tech*, 2000 (9): 443-462.

Alexander DJ and Senne DA. Newcastle disease virus and other paramyxoviruses. In: Dufour-Zavala L, Swayne DE, Glisson JR, Pearson JE, Reed WM, Jackwood MW and Woolcock PR, editors. *A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens*. Fifth edition. The American Association of Avian Pathologists, Athens, GA, USA, 30602-4875. 2008a: 135-141.

Alexander DJ and Senne DA. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Saif YM, editor. Diseases of Poultry. 12th Edition. Blackwell Publishing, 2008b, pp 75-100.

Antillón A. Observaciones patológicas e inmunológicas de un aislamiento viscerotrópico de la enfermedad de Newcastle en México. Memorias del IV Ciclo Internacional de Conferencias sobre Avicultura. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, México DF, 1978, pp 52-59.

Antillón RA. Enfermedad de Newcastle. Memorias del XVII Curso Avimex: Enfermedades de alto impacto en la avicultura. Laboratorio Avi-Mex SA de CV. México DF, Julio 29, 2005:27-43.

Asplin FD. Immunization against Newcastle disease with a virus of low virulence (Strain F) and observations on subclinical infection in partially resistant fowls. Vet Rec. 1952 (64):245-249

Aung YH, Liman M, Neumann U and Rautenschlein S. Reproducibility of swollen sinuses in broilers by experimental infection with avian metapneumovirus subtypes A and B of turkey origin and their comparative pathogenesis. 2008. Avian Pathology 37(1):65-74

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.

Beach JR. Avian pneumoencephalitis. Proc Annu Meet US Livestock Sanit Assoc. 1942, 46:203-223.

Beach JR. The neutralization *in vitro* of avian pneumoencephalitis virus by Newcastle disease immune serum. Science. 1944, 100:361-362.

Beaudette FR and Black JJ. Newcastle Disease in New Jersey. Proc Annu Meet US Livestock Sanit Assoc. 1946, 49:49-58.

Berinstein A, Sellers HS, King DJ, and Seal BS. Use of a heteroduplex mobility assay to detect differences in the fusion protein cleavage site coding sequence among Newcastle disease virus isolates. J Clin Microbiol, 2001, (39)9:3171–78

Bogoyavlenskiy A, Berezin V, Prilipov A, Usachev E, Lyapina O, Korotetskiy I, Zaitceva I, Asanova S, Kydyrmanov A, Daulbaeva K, *et al.* Newcastle disease outbreaks in Kazakhstan and Kyrgyzstan during 1998, 2000, 2001, 2003, 2004, and 2005 were caused by viruses of the genotypes VIIb and VIId. *Virus Genes* 2009, 39: 94–101.

Calderón AL, Galindo MF, Ortiz M, Lomniczi B, Féhérvári T and Paasch LH. Thrombocytopenia in Newcastle disease: Hematological evaluation and histological study of bone marrow. *Acta Veterinaria Hungarica*; 2005 53(4):507-513.

Camacho E, Sarfati D, Soto E, Murillo M, Lozano B. Inmunización y causas de brote de la enfermedad de Newcastle. *Memorias del XVIII Curso Avimex: Laringotraqueítis, Influenza y Newcastle hoy.* Laboratorio Avi-Mex SA de CV. México DF, Julio 28, 2006:15-32.

Cantin C, Holguera J, Ferreira L, Villar E, Muñoz BI. Newcastle disease virus may enter cells by caveolae-mediated endocytosis. *J Gen Virol.* 2007, 88: 559–569

Cheville NF, Stone H, Riley J and Ritchie EA. Pathogenesis of virulent Newcastle disease in chickens. *JAVMA.* 1972, 161:169-179.

Cho SH, Kwon HJ, Kim TE, Kim JH, Yoo HS, Kim SJ. Variation of a Newcastle disease virus Hemagglutinin-Neuraminidase linear epitope. *J Clinical Microb.* 2008, 46(4): 1541–1544

Czeglédi A, Ujvári D, Somogyia E, Wehmanna E, Werner O, Lomniczi B. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Research* 2006, 120: 36–48.

de Leeuw O, Peeters B. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily *Paramyxovirinae*. *J Gen Virol.* 1999, 80(1):131-6.

de Leeuw OS, Koch G, Hartog L, Ravenshorst N, Peeters B. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin–neuraminidase protein. *J Gen Virol.* 2005, 86: 1759–1769.

Doyle TM. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. *J Comp Pathol Therap.* 1927, 40:144-169.

Estevez C, King D, Seal B, Yu Q. Evaluation of Newcastle disease virus chimeras expressing the Hemagglutinin-Neuraminidase protein of velogenic strains in the context of a mesogenic recombinant virus backbone. *Virus Research* 2007, 129: 182–190

Estudillo J. Algunas consideraciones sobre la enfermedad de Newcastle. Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal [serial on line] 2000 [citado 24 de marzo de 2009]; [7 páginas]. Disponible en: URL <http://www.conasamexico.org/mesa3ALGUNAS%20%20CONSIDERACIONES%20SOBRE%20%20LA%20%20ENFERMEDAD.pdf>

Ezema WS, Okoye JOA, Nwanta JA. LaSota vaccination may not protect against the lesions of velogenic Newcastle disease in chickens. *Trop Anim Health Prod.* 2009, 41:477–484

Galindo MF, Calderón NL, Charles NM, Téllez IG, Fortoul TI. Haematological and histological findings in experimental Newcastle disease. *Acta Vet. Brno* 2001, 70: 185-189

Gallili GE and D Ben-Nathan D. Newcastle disease vaccines. *Biotechnol Adv.* 1998. 16: 343-366.

Gould AR, Kattenbelt JA, Selleck P, Hansson E, la-Porta A, Westbury HA. Virulent Newcastle disease in Australia: Molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998–2000. *Virus Res.* 2001, 77 (1): 51–60.

Guerrero AO, Loza RE, Olivera FT, Féhérvári BT, Gómez LMA. Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies. *Transgenic Res*, 2006, 15:455–463

Hamid H, Campbell RST, Parede L. Studies of the pathology of velogenic Newcastle disease virus: Virus infection in immune and non-immune birds. *Avian Pathol.* 1991, 20:561-575.

Han GZ, He CQ, Ding NZ, Ma LY. Identification of a natural multi-recombinant of Newcastle disease virus. *Virology* 2008, 371: 54–60

Heneidi A, León A. Enfermedad de Newcastle ¿Una enfermedad emergente en México? Memorias en CD-ROM de las XXVIII Convención Nacional ANECA. 30 de abril al 3 de mayo, 2003. Boca del Río, Veracruz.

Herczeg J, Pascucci S, Massi P, Luini M, Selli L, Capua I, Lomniczi B. A longitudinal study of velogenic Newcastle disease virus genotypes isolated in Italy between 1960 and 2000. *Avian Pathol.* 2001, 30(2):163-168.

Hitchner SB and Johnson EP. A virus of low virulence for immunizing fowls against Newcastle disease (avian pneumoencephalitis). *Vet Med.* 1948, 43(12):525-530.

Hu S, Wang T, Liu Y, Meng C, Wang X, Wu Y, Liu X. Identification of a variable epitope on the Newcastle disease virus hemagglutinin–neuraminidase protein. *Vet Microbiol* 2010, 140 (1-2): 92-97

Huang Z, Panda A, Elankumaran S, Govindarajan D, Rockemann DD, and Samal SK. The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. *J Virol.* 2004 (78)8: 4176–84.

Hughes AL. Relaxation of purifying selection on live attenuated vaccine strains of the family Paramyxoviridae. *Vaccine* 2009, 27(11): 1685–1690

Juárez M, Petrone V y Fehervari T. Caracterización biológica de cuatro cepas veolgénicas y una lentogénica del virus de la enfermedad de Newcastle. Memorias de la XXVII Convención Anual ANECA & 51st Western Poultry Disease Conference. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas – Western Poultry Disease Conference, Jalisco, México, 2002, p:79 – 81.

Ke GM, Liu HJ, Lin MY, Chen JH, Tsai SS and Chang PC. Molecular characterization of Newcastle disease viruses isolated from recent outbreaks in Taiwan. *J Virol Methods* 2001, 97: 1–11

Kim LM, King DJ, Curry PE, Suarez DL, Swayne DE, Stallknecht DE, Slemons RD, Pedersen JC, Senne DA, Winker K, Afonso CL. Phylogenetic diversity among low virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. *J Virol* 2007a, 81(22): 12641-12653.

Kim LM, King DJ, Suarez DL, Wong CW, Afonso CL. Characterization of class I Newcastle disease virus isolates from Hong Kong live bird markets and detection using real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2007b, 45(4):1310-1314

Kim SH, Yan Y, Samal SK. Role of the cytoplasmic tail amino acid sequences of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein in virion incorporation, cell fusion, and pathogenicity. *J Virol* 2009, 83(19): 10250–10255

Kinde H, Utterback W, Takeshita K, McFarland M. Survival of exotic Newcastle disease virus in commercial poultry environment following removal of infected chickens. *Avian Dis.* 2004, 48:669–674.

Kommers GD, King DJ, Seal BS, and Brown CC. Virulence of six heterogeneous-origin Newcastle disease virus isolates before and after sequential passages in domestic chickens. *Avian Pathology* (2003) 32: 81-93

Kouwehoven B. Newcastle Disease. In: McFerran JB and McNulty MS, editors. *Virus Infections of Birds*. New York, United States of America: Elsevier Science Publishers, 1993: 341-361.

Lam KM, Vasconcelos AC, Bickford AA. Apoptosis as a cause of death in chicken embryos inoculated with Newcastle disease virus. *Microbial Pathogenesis* 1995, 19: 169–174

Lam KM. Growth of Newcastle disease virus in chicken macrophages. *J Comp. Path.* 1996, 115: 253-263.

Lamb RA, Patersson RG, Jardetzky TS. Paramyxovirus membrane fusion: Lessons from the F and HN atomic structures. *Virology* 2006, 344: 30 – 37

Liu H, Wang Z, Wu Y, Wu Y, Sun C, Zheng D, Xu T, Li T. Molecular characterization and phylogenetic analysis of new Newcastle disease virus isolates from the mainland of China. *Res. Vet. Sc.*, 2008, 85(3): 612-616

Locke DP, Sellers HS, Crawford JM, Shultz-Cherry S, King DJ, Meinersmann DJ, Seal BS. Newcastle disease virus phosphoprotein gene analysis and transcriptional editing in avian cells. *Virus Research* 2000, 69(1): 55–68.

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.

Lucio E, Morales A, Ortega R, Rodríguez A, Absalón A. Características de los virus de enfermedad de Newcastle que circulan en México y sus repercusiones en protección y persistencia en las zonas afectadas. Memorias en CD-ROM del Simposio de Enfermedades Emergentes Avícolas. Noviembre 9, 2007. Querétaro, Qro., México. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, AC. 2007.

Lucio E. Enfermedad de Newcastle. Engormix [serial on line] 12 de agosto, 2008 [citado 24 de marzo de 2009]; [2 páginas]. Disponible en: URL http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?art=2049&AREA=AVG-154.

Márquez MA. Historia de la enfermedad de Newcastle en México. Memorias de la III Convención Nacional ANECA. Mazatlán, Sinaloa, México. Abril 5-8, 1978. pp: 1-18.

Mase M, Imai K, Sanada Y, Sanada N, Yuasa N, Imada T, Tsukamoto K and Yamaguchi S. Phylogenetic analysis of Newcastle disease virus genotypes isolated in Japan. J Clin Microbiol. 2002 (40)10: 3826–30

McFerran JB and Nelson R. Some properties of an avirulent Newcastle disease virus. Arch Ges Virusforsch 1971, 34:64-74.

Merino R, Calderon N, Perozo F, Villegas P, and Afonso CL. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Mexican Newcastle disease virus isolates. Proceedings of the 2008 International Poultry Scientific Forum. Southern Poultry Science Society – Southern Conference on Avian Diseases – US poultry & Egg Association. Atlanta, Georgia, USA. January 21 – 22, 2008, p: 33.

Merino R, Calderon NL. Velogenic Newcastle disease viruses from Mexico belonging to two lineages of genotype V have difference in virulence. Proceeding of the 2009 International Poultry Scientific Forum. Southern Poultry Science Society – Southern Conference on Avian Diseases – US poultry & Egg Association. Georgia World Congress Center, Atlanta, Georgia. January 26–27, 2009a, p: 46

Merino R, Villegas H, Quintana JA, Calderon N. Characterization of Newcastle disease viruses isolated from chicken, gamefowl, pigeon and quail in Mexico. Vet Res Commun. 2009b, 33:1023-1030.

Miller PJ, King DJ, Suarez DL. Protection against Ca/02 (exotic NDV) challenge of chickens vaccinated with inactivated vaccines of Newcastle disease virus (NDV) from different genetic lineages. Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Avian Pathologists. July 15-19, Honolulu, Hawaii. 2006.

Miller PJ, King DJ, Afonso CL, Suarez DL. Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine* 2007, 25:7238–7246.

Miller PJ, Kim LM, Ip HS, Afonso CL. Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus. *Virology* 2009a, 391:64–72.

Miller PJ, Estevez C, Yu Q, Suarez DL, King DJ. Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. *Av Dis* 2009b, 53:39–49.

Miller PJ, Lucio DE, Afonso CL. Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infection, Genetics and Evolution* 2010, 10: 26–35.

Mohan CM, Dey S and Kumanan K. Molecular changes of the fusion protein gene of chicken embryo fibroblast-adapted velogenic Newcastle disease virus: effect on its pathogenicity. *Av Dis*. 2005, 49:56–62.

Mohan CM, Sohini D, Kumanan K. Restriction enzyme analysis of tissue culture adapted velogenic Newcastle disease virus. *Vet Res Commun* 2006, 30(3): 455-466.

Nakamura K, Ohtsu N, Nakamura T, Yamamoto Y, Yamada M, Mase M, Imai K. Pathologic and immunohistochemical studies of Newcastle disease (ND) in broiler chickens vaccinated with ND: severe nonpurulent encephalitis and necrotizing pancreatitis. *Vet Pathol*. 2008, 45:928–933

Nishizawa M, Paulillo AC, Nakaghi LSO, Nunes AD, Campioni JM, Doretto L. Newcastle disease in white Pekin ducks: Response to experimental vaccination and challenge. *Brazilian Journal of Poultry Science* 2007, 9(2): 77-79.

Norma Oficial Mexicana NOM-013-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Enfermedad De Newcastle Presentación Velogénica. México (DOF): 7 de febrero de 1995.

Norma Oficial Mexicana NOM-052-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las vacunas empleadas en la prevención y control de la enfermedad de Newcastle. México (DOF): 24 de abril, 1997.

OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. Enfermedad de Newcastle. Organización Mundial de Sanidad Animal [serial on line] 22 de abril, 2002 [citado 24 de noviembre de 2005]; [4 páginas]. Disponible en: URL http://www.oie.int/esp/maladies/fiches/e_A160.htm

OIE, World Organisation for Animal Health. Newcastle Disease. World Organisation for Animal Health [serial on line] 23 july, 2007 [citado 10 de marzo de 2008]; [26 pantallas]. Disponible en: URL http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00038.htm

Ojok L, Brown C. An immunohistochemical study of the pathogenesis of virulent viscerotropic Newcastle disease in chickens. *J. Comp. Path.* 1996, 115: 221-227

Okoye JOA, Agu AO, Chineme CN, Echeonwu GON. Pathological characterization in chicken of a velogenic Newcastle disease virus isolated from Guinea fowl. *Revue Elev Méd Vet Pays Trop* 2000, 53: 325–330

Ortiz M, Fehervari T, Huerta B, Lomniczi B, Ledesma N, Hargis B, Alonso R, and Tellez G. Molecular characterization of Mexican isolates of Newcastle disease virus from 1997-2001. Abstracts from Concurrent Meeting of The Southern Poultry Science Society, 23rd Annual Meeting The Southern Conference on Avian Diseases, 43rd Annual Meeting, January 14 - 15, 2002: 52

Olvera HM. Enfermedad de Newcastle (Tesis de Licenciatura). México (Distrito Federal), México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1948.

Panda A, Huang Z, Elankumaran S, Rockemann DD, Samal SK. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microb Pathogenesis* 2004, 36: 1–10

Pedersen JC, Senne DA, Woolcock PR, Kinde H, King DJ, Wise MG, Panigrahy B and Seal BS. Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. *J Clin Microbiol* 2004, 42: 2329 - 2334.

Perozo F, Merino R, Afonso CL, Villegas P, Calderon N. Biological and phylogenetic characterization of virulent Newcastle disease virus circulating in Mexico. *Avian Dis* 2008, 52: 472-479.

Qin Z, Sun L, Ma B, Cui Z, Zhu Y, Kitamura Y, Liu W. F gene recombination between genotype II and VII Newcastle disease virus. *Virus Research* 2008, 131: 299–303.

Ravindra PV, Tiwari AK, Ratta B, Chaturvedi U, Palia SK, Chauhan RS. Newcastle disease virus-induced cytopathic effect in infected cells is caused by apoptosis. *Virus Research* 2009a, 141: 13–20

Ravindra PV, Tiwari AK, Ratta B, Bais MV, Chaturvedi U, Palia SK, Sharma B, Chauhan RS. Time course of Newcastle disease virus-induced apoptotic pathways. *Virus Research* 2009b, 144: 350–354

Reed LJ and Muench H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938, 27:493-497.

Rivera CE. La enfermedad de Newcastle, viscerotrópica velogénica, en la Región Lagunera. Marzo de 2000. *Memorias del Curso Enfermedades emergentes: criterios generales sobre problemas respiratorios de las aves*. ANECA. México, DF, Octubre 6, 2000:32-34.

Römer-Oberdörfer A, Veits J, Werner O, Mettenleiter TC. Enhancement of pathogenicity of Newcastle disease virus by alteration of specific amino acid residues in the surface glycoproteins F and HN. *Av Dis*. 2006, 50:259–263.

Rout SN, Samal SK. The large polymerase protein is associated with the virulence of Newcastle disease virus. *J. Virology* 2008, 82(16): 7828–7836

Seal BS, King DJ, Locke DP, Senne DA, Jackwood MW. Phylogenetic relationships among highly virulent Newcastle disease virus isolates obtained from exotic birds and poultry from 1989 to 1996. *J Clin Microb*, 1998, 36 (4): 1141–1145

Seal BS, King DJ, Sellers HS. The avian response to Newcastle disease virus. *Developmental and Comparative Immunology* 2000, 24:257-268

Seal BS, Crawford JM, Sellers HS, Locke DP, King DJ. Nucleotide sequence analysis of the Newcastle disease virus nucleocapsid protein gene and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Virus Res.* 2002, 83: 119–129

Seal BS. Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates. Phylogenetic relationships among the Paramyxovirinae based on attachment glycoprotein sequences. *Funct Integr Genomics* 2004, 4: 246–257

Servan de Almeida R, Maminiaina OF, Gil P, Hammoumi S, Molia S, Chevalier V, Koko M, Andriamanivo HR, Traoré A, Samaké K, Diarra A, Grillet C, Martinez D, Albina E. Africa, a reservoir of new virulent strains of Newcastle disease virus?. *Vaccine* 2009, 27: 3127–3129.

SENASICA, Dirección de planeación, recursos presupuestados y ejercidos. Programa de soporte componente de sanidad e inocuidad y de usos (T.I.F.) 2009. SAGARPA. Disponible en URL: <http://148.243.71.63/>

Shane SM. The velogenic Newcastle disease outbreak in Mexico, implications for the US poultry industry. *Merial Select News*, June 2000, 32 pages.

Simmons GC. The isolation of Newcastle disease virus in Queensland. *Aust Vet J.* 1967, 43:29-30.

Snoeck CJ, Ducatez MF, Owoade AA, Faleke OO, Alkali BR, Tahita MC, Tarnagda Z, Ouedraogo JB, Maikano I, Mbah PO, Kremer JR, Muller CP. Newcastle disease virus in West Africa: New virulent strains identified in non-commercial farms. *Arch Virol* 2009, 154:47–54.

Solís S. Situación de la campaña nacional contra la enfermedad de Newcastle: Memorias curso de enfermedades emergentes ANECA; México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2000: 20-28.

Soto E, Sarfati D, Lozano B. Enfermedad de Newcastle, mitos y realidades. Memorias del XVIII Curso Avimex: Laringotraqueítis, Influenza y Newcastle hoy. Laboratorio Avi-Mex SA de CV. México DF, Julio 28, 2006:33-41.

Sun Q, Wang D, She R, Li W, Liu S, Han D, Wang Y, Ding Y. Increased mast cell density during the infection with velogenic Newcastle disease virus in chickens. *Avian Pathology* 2008, 37(6): 579-585

Survashe BD, Desmukh SG: Newcastle disease, prevention and control. *Poultry International*. 1998, 2: 26-28

Thompson CH, Osteen OL. Immunological and pathological findings on a highly virulent strain of Newcastle disease virus from Mexico. *Am. J. Vet. Res.* 1952, 13(48): 407-416.

Torres CA, Seki MC, de Freitas RT, Paulillo AC, Augusto PA. Experimental infection of Newcastle disease virus in pigeons (*Columba livia*): Humoral antibody response, contact transmission and viral genome shedding. *Vet Microbiol* 2008, 129: 89–96

Tsai HJ, Chang KH, Tseng CH, Frost KM, Manvell RJ, Alexander DJ. Antigenic and genotypical characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan between 1969 and 1996. *Vet. Microbiol.* 2004, 104: 19–30.

Ujvári D, Wehmann E, Kaleta EF, Werner O, Savic V, Nagy E, Czifra G, Lomniczi B. Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission. *Virus Res*, 2003, 96: 63-73.

van Boven M, Bouma A, Fabri THF, Katsma E, Hartog L, Koch G. Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. *Avian Pathology*, 2008, 37(1):1-5

Wakamatsu N, King DJ, Seal BS, Samal SK, Brown CC. The pathogenesis of Newcastle disease: A comparison of selected Newcastle disease virus wild-type strains and their infectious clones. *Virology* 2006, 353: 333–343.

Wang Z, Liu H, Xu J, Bao J, Zheng D, Sun C, Wei R, Song C, Chen J. Genotyping of Newcastle disease viruses isolated from 2002 to 2004 in China *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006, 1081: 228–239.

Wakamatsu N, King DJ, Seal BS, Peeters BPH, Brown CC. The effect on pathogenesis of Newcastle disease virus LaSota strain from a mutation of the fusion cleavage site to a virulent sequence. *Avian Dis.* 2006, 50:483–488.

Westbury HA, Duration of excretion of virulent Newcastle disease virus following challenge of chickens with different titres of serum antibody to the virus. *Australian Vet J.* 1989, 61(2):44-46.

Wise MG, Sellers HS, Alvarez R, Seal BS. RNA-dependent RNA polymerase gene analysis of worldwide Newcastle disease virus isolates representing different virulence types and their phylogenetic relationship with other members of the paramyxoviridae. *Virus Res* 2004, 104: 71-80.

Yan Y, Samal SK. Role of intergenic sequences in Newcastle disease virus RNA transcription and pathogenesis. *J Virol* 2008, 82(3): 1323–1331

Yan Y, Rout SN, Kim SH, Samal SK. Role of untranslated regions of the hemagglutinin-neuraminidase gene in replication and pathogenicity of Newcastle disease virus. *J Virol* 2009 83(11): 5943–5946

Yu L, Wang Z, Jiang Y, Chang L, Kwang J. Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan. *J Clin Microbiol* 2001, 39: 3512-3519.

Zanetti F, Berinstein A, Carrillo E. Effect of host selective pressure on Newcastle disease virus virulence. *Microb Pathogenesis* 2008, 44: 135–140.

CUADROS

Cuadro 1. Cepas velogénicas del VEN aisladas en México de 1946 a 1975.

| Cepa | Aislada por | Especie | Año |
|--------------|------------------|---------|------|
| Ixtapalapa | Bankowski | Pollo | 1946 |
| Querétaro | Ramírez V. | Pollo | 1950 |
| Zamora | Hurtado | NR | 1956 |
| CU | Estudillo | Pollo | 1959 |
| Guadalajara | Vázquez V. | Pollo | 1960 |
| Tulyehualco | Vázquez V. | Pollo | 1960 |
| Chiconautla | Vázquez V. | Pollo | 1960 |
| Norte DF | Vázquez V. | Pollo | 1960 |
| Tacuba | Vázquez V. | Pollo | 1961 |
| DF | Vázquez V. | Pollo | 1961 |
| Jilotepec | Antillón y Lucio | Pollo | 1970 |
| Jalisco | Antillón y Lucio | Pollo | 1972 |
| Chimalhuacán | Antillón y Lucio | Pollo | 1973 |
| Hermosillo | Moreno | Pollo | 1974 |
| Culiacán | Zavaleta | Pollo | 1975 |

Tomado de Márquez, 1978. NR = No reportado

Cuadro 2. Reporte oficial de focos de EN velogénico en México, de 1996 a noviembre de 2009.

| | 1990 | | | | 2000 | | | | | | | | | |
|-------|------|----|----|----|------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Año | 96 | 97 | 98 | 99 | 00 | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 |
| Focos | 11 | 6 | 30 | 20 | 137 | 20 | 4 | 14 | 9 | 41 | 78 | 14 | 45 | 51 |

Cuadro 3. Presupuesto destinado a la Campaña contra la Enfermedad de Newcastle, en millones de pesos (SENASICA).

| Origen | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 |
|-------------|-------|--------|--------|--------|-------|
| Federal | 6.99 | 9.30 | 9.51 | 9.80 | 14.66 |
| Estatal | 4.29 | 4.61 | 6.82 | 7.51 | 8.66 |
| Productores | 18.21 | 202.78 | 204.62 | 204.73 | ND |
| Total | 29.50 | 216.70 | 220.96 | 222.06 | 23.32 |

ND= No disponible

Cuadro 4. Programas de vacunación para pollo de engorda

| Antes de 2000 | A partir de 2000 (Programa oficial de la SAGARPA) |
|---|--|
| 1 día. Cepa B1, aspersion en incubadora | 1 día. B1 aspersion, emulsion LaSota 0.2 ml |
| 8-12 días. Simultáneo, B1 o LaSota | 10-12 días. LaSota aspersion u ocular, emulsion 0.3-0.5 ml |
| 21-28 días B1 o LaSota en el agua de bebida | 21-25 días. LaSota, aspersion u ocular |
| | 35 días LaSota, agua de bebida. Opcional |

Tomado de Antillón, 2005

Cuadro 5. Programas de vacunación para gallinas de postura y reproductoras

| Antes de 2000 | A partir de 2000 (Programa oficial de la SAGARPA) |
|--|---|
| 8-12 días. B1 o LaSota, ocular | 1 día. B1 aspersion, emulsion LaSota 0.2 ml |
| 28-30 días. Simultáneo, B1 o LaSota | 10 días. LaSota aspersion u ocular, emulsion 0.3 ml |
| 9-11 semanas. Simultáneo, B1 o LaSota | 4 semanas. Simultáneo LaSota aspersion u ocular, emulsion 0.3 ml |
| 16-22 semanas. Simultáneo, B1 o LaSota | 10 semanas. Simultáneo LaSota aspersion u ocular, emulsion 0.3 ml – 0.5 ml. |
| Postura. Revacunación cada 4-8 sem. B1 o LaSota, agua de bebida o aspersion. | 18 semanas. Simultáneo LaSota aspersion u ocular, emulsion 0.3 ml – 0.5 ml. |
| | Postura. Revacunación cada 4-8 semanas. LaSota, agua de bebida o aspersion. |

Tomado de Antillón, 2005

Cuadro 6. Cepas de virus usados para la elaboración de vacunas (15 laboratorios) contra la enfermedad de Newcastle.

| Virus activo | | Vacunas de virus inactivo | | Recombinantes* |
|--|--|---|---|---|
| Monovalentes | Polivalentes | | Combinadas* | |
| | Bivalentes | | Bivalentes | |
| B1 B1 (C2) LaSota Clone30 PHY.LMV42 VG/GA | B1-Mass48 Clone30-Ma5 LaSota-Mass LaSota-MassII LaSota-Mass48 | B1 Clone30 Kimber LaSota Ulster | EN-BI, EN-Coli, EN-CI, EN-Ga, EN-HCI, EN-IA, EN-IBF, EN-SBP, | B1-IA, LaSota-IA, HVT-EN, HVT-ND |
| | Trivalentes | | Trivalentes | |
| | B1-Conn-M41 B1-Mass-Conn B1-Mass48-Conn B1-Mass41-Conn Clone30-Mass-Conn LaSota-B1-Mass | | EN-BI-CI EN-BI-IBF EN-BI-SBP EN-CI-Past. EN-IA-SBP EN-Past-Sg | |
| | | | Tetravalentes | |
| | | | EN-CI-BI-SBP EN-IBF-BI-Reo | |

* BI = bronquitis infecciosa; Coli = *Escherichia coli*; CI = coriza infecciosa; Ga= *Gallibacterium anatis*; HCI= hepatitis con cuerpos de inclusión; IA= influenza aviar; IBF= infección de la bolsa de Fabricio; SBP= síndrome de la baja de postura; Past. = *Pasteurella*; Sg = *Salmonella gallinarum*; Reo= Reovirus; HVT= Herpesvirus del pavo; DB26= antígeno de Newcastle

Cuadro 7. Análisis filogenético de cepas velogénicas mexicanas del virus de la EN.

| Cepa/año | Cepa relacionada | Gen secuenciado | Autor, año |
|--|---|---|---|
| MixSp/Mx/37821-550-1/96 Ck/Mx/37821-550-2/96 Chicken/Mexico/6244/98 Chicken/Mexico/5166/98 Chicken/Mexico/3242/99 Chicken/Mexico/6246/99 Chicken/Mexico/4100/99 Chicken/Mexico/3310/00 Chicken/Mexico/3313/00 Chicken/Mexico/290/00 Chicken/Mexico/1/00 Chicken/Mexico/2/00 | MixSp/US/Largo/71 Parrot/US(CT)/36501/89 Parrot/US(IN)/27492/91 Parrot/US(IL)/27994/91 Parakeet/Myanmar/11592/91 Parrot/US/31378/96 YellowCheek/US/27345/96 Parrot/U.S.(OK)/32932/96 Ck/Honduras/44813/00 Ck/Honduras/44814/00 Ck/Honduras/44815/00 Ck/US(CA)/211472/02 Pet bird/U.S.(CA)/169302/02 Game fowl/U.S.(TX)248306/03 Dove/U.S.(CA)/9547-3/03 Chicken/U.S.(CA)/5634/03 Chicken/U.S.(CA)/5634/03 Game fowl/U.S.(NV)232947/03 Game fowl/U.S.(AZ)236498/03 | F-M, P, N, HN, M-F, | Seal, 1998 Locke, 2000 Seal, 2002 Seal, 2004 Pedersen, 2004 |
| Mexico/1996 | CA/212676/2002 Honduras/2000 FL/Largo/1971 Turkey/ND/1992 Anhinga/FL/1993 | HN, F; Genotipo V (3c) | Miller, 2007 |

Cuadro 8. Características de 25 aislamientos del VEN y resultados de las pruebas de TMME, IPIC, RT-PCR, secuenciación del gen F, virulencia, genotipo y cepa relacionada.

| Aislamiento (cepa) | Año | Especie | Lugar | DLEP 50% | TMME (horas) ^a | IPIC | RT-PCR | Secuencia aa 112-117 | Virulencia | Genotipo | Cepa referencia |
|--------------------|------|----------|------------|----------|---------------------------|------|--------|----------------------|------------|----------|-------------------|
| La Sota | 1946 | Pollo | New Jersey | 7.5 | 133.9 bcd | ND | + | GRQGRL | L | II | LaSota |
| Chimalhuacán | 1973 | Pollo | Edo. Mex | 9.2 | 39.7 e | 1.89 | + | RRQKRF | V | V | Largo71 |
| Querétaro | 1950 | Pollo | Querétaro | 8.9 | 43.2 e | 1.73 | + | RRQKRF | V | VIII | Argentina/malasia |
| Torreón | 2000 | Pollo | Coahuila | 8.1 | 59.7 de | 1.64 | + | RRQKRF | V | V | gamefowlUS02 |
| V4 | 1967 | ND | Queensland | 8.7 | 184.3 ab | ND | + | GKQGRL | L | I | Ulster |
| DPAa | ND | ND | ND | 9.2 | 53 de | ND | + | RRQKRF | V | II | Beaudette C |
| CLAM | ND | ND | ND | 8.7 | 44.9 e | 1.80 | + | RRQKRF | V | V | Largo71 |
| Miyadera | 1951 | Pollo | Japón | 9.7 | 57.4 de | ND | + | RRQKRF | V | II | Beaudette C |
| 048 2 | ND | ND | ND | 9.4 | 48.8 e | 1.83 | + | RRQKRF | V | V | gamefowlUS02 |
| A | 1997 | Pollo | DF | 8.7 | 84.85 cde | ND | + | | L | | |
| B | 1998 | Pollo | Edo Mex | 8.4 | 61.5 de | ND | + | RRQKRF | V | V | gamefowlUS02 |
| C | 1998 | Pollo | Morelos | 9.1 | 45.2 e | 1.88 | + | RRQKRF | V | V | gamefowlUS02 |
| D | 1998 | Pollo | Morelos | 8.8 | 242.4 a | ND | + | | L | | |
| E | 1998 | Pollo | Morelos | 9.5 | 164.2 bc | ND | + | GRQGRL | L | II | LaSota |
| F | 2000 | Combate | DF | 9.2 | 50.3 e | 1.83 | + | RRQKRF | V | V | gamefowlUS02 |
| G | 2001 | Combate | DF | 9.5 | 62 de | 1.59 | + | RRQKRF | V | V | gamefowlUS02 |
| H | 2001 | ND | DF | 9.3 | 44.1 e | ND | + | RRQKRF | V | | |
| I | 2004 | Pollo | DF | 8.1 | 46.7 e | ND | + | RRQKRF | V | V | Largo71 |
| J | 2004 | Gallina | DF | 8.9 | 44.5 e | ND | + | | V | | |
| K | 2004 | Paloma | DF | 8.4 | 44.6 e | 1.93 | + | RRQKRF | V | V | Largo71 |
| L | 2005 | Pollo | DF | 9.4 | 37.4 e | ND | + | | V | | |
| M | 2005 | Pollo | DF | 8.5 | 41.7 e | ND | + | | V | | |
| N | 2005 | Pollo | DF | 9.1 | 44.3 e | 1.91 | + | RRQKRF | V | V | Largo71 |
| O | 2006 | Codorniz | Edo Mex | 8.9 | 47 e | 1.94 | + | RRQKRF | V | V | Largo71 |
| P | 2006 | Pollo | Edo Mex | 8.7 | 44.4 e | ND | + | | V | | |

DLEP₅₀ (Log₁₀)= Logaritmo de base 10. TMME = Tiempo medio de mortalidad embrionaria, ^a Diferente letra dentro de la misma columna indica diferencia estadística, p<0.05. IPIC = Índice de patogenicidad intra-cerebral. RT-PCR (+) = Positivo. Virulencia: L = lentogénico, V = virulento

Cuadro 9. Resultado de la reactivación de las cepas virales usadas para la prueba biológica.

| Cepa viral | Dosis de desafío | Mortalidad (horas post inoculación) | | |
|------------------|---|-------------------------------------|-------|------|
| | | 72 | 84 | > 84 |
| Chimalhuacán | ≈ 10 ⁸ DIEP ₅₀ / 0.1 ml | 2/12 | 9/10 | 1/1 |
| Querétaro | ≈ 10 ⁸ DIEP ₅₀ / 0.1 ml | 2/12 | 10/10 | - |
| Torreón | ≈ 10 ⁷ DIEP ₅₀ / 0.1 ml | 0/12 | 10/12 | 2/2 |
| Beaudette C | ≈ 10 ⁷ DIEP ₅₀ / 0.1 ml | 7/12 | 5/5 | - |
| Testigo negativo | 0.1 mL SSF | 0/12 | 0/12 | 0/12 |

(-) = No hubo sobrevivientes.

Cuadro 10. Intensidad de los principales signos clínicos observados a las 96 hpi en pollos de engorda inoculados experimentalmente con diferentes cepas del VEN.

| Cepa viral | Depresión | Plumas erizadas | Postración | Edema periocular | Diarrea verde esmeralda |
|--------------|-----------|-----------------|------------|------------------|-------------------------|
| Chimalhuacán | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Querétaro | ++ | + | ++ | ++ | - |
| Torreón | ++ | ++ | + | ++ | - |
| DPAa | ++ | ++ | ++ | ++ | - |
| LaSota | - | - | - | + | - |

(-) = Inaparente; (+) = leve; (++)= moderado; (+++)= severo

Cuadro 11. Evaluación de las lesiones en el timo de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10⁶ DLEP₅₀/0.2 ml de diferentes cepas de VEN.

| Cepa virus | Timo | | | | | | |
|--------------|------------------------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|
| | Horas post-inoculación | | | | | | |
| | 24 | 36* | 48 | 60* | 72* | 84* | 96* |
| Chimalhuacán | 1.7 | 2.7b | 2.0 | 3.0b | 3.0b | 2.7ab | 3.7b |
| Querétaro | 1.3 | 1.7ab | 2.3 | 2.7ab | 2.7ab | 2.7ab | 3.3b |
| Torreón | 1.0 | 1.3a | 2.0 | 2.7ab | 3.3b | 3.3b | 3.3ab |
| DPAa | 1.7 | 1.7ab | 2.3 | 3.0b | 3.0b | 3.0b | 3.3ab |
| LaSota | 1.0 | 1.3a | 2.0 | 1.7a | 1.3a | 1.7a | 1.3a |

* Diferente literal en la misma columna indica diferencia estadística significativa, P < 0.05.

Cuadro 12. Evaluación de las lesiones en el bazo de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de diferentes cepas de VEN.

| Cepa virus | Bazo | | | | | | |
|--------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Horas post-inoculación | | | | | | |
| | 24* | 36* | 48* | 60* | 72** | 84* | 96* |
| Chimalhuacán | 1.0a | 1.3a | 1.7a | 1.7ab | 2.3ab | 3.7bc | 4.0b |
| Querétaro | 1.3a | 1.3a | 1.7a | 1.3a | 1.7a | 2.0ab | 3.0ab |
| Torreón | 2.0ab | 3.0ab | 2.7ab | 3.3b | 3.7b | 4.0c | 3.7ab |
| DPAa | 3.3b | 3.3b | 3.3b | 2.7ab | 3.0ab | 3.7bc | 4.0b |
| LaSota | 1.3a | 1.3a | 1.7a | 1.3a | 1.7a | 1.7a | 1.3a |

Diferente literal en la misma columna indica diferencia estadística significativa; * $P < 0.05$; ** $P = 0.053$

Cuadro 13. Evaluación de las lesiones en la bolsa de Fabricio de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de diferentes cepas de VEN.

| Cepa virus | Bolsa de Fabricio | | | | | | |
|--------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-------|-------|
| | Horas post-inoculación | | | | | | |
| | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 | 84* | 96** |
| Chimalhuacán | 2.0 | 2.0 | 3.3 | 2.7 | 2.7 | 3.3ab | 5.0c |
| Querétaro | 1.7 | 2.7 | 3.0 | 2.7 | 2.7 | 2.3a | 3.3ab |
| Torreón | 2.3 | 3.0 | 3.0 | 2.3 | 3.7 | 3.7ab | 5.0c |
| DPAa | 2.3 | 2.7 | 3.3 | 3.0 | 2.7 | 3.7b | 4.7bc |
| LaSota | 2.0 | 1.7 | 2.3 | 2.3 | 3.0 | 2.3a | 2.3a |

Diferente literal en la misma columna indica diferencia estadística significativa; * $P < 0.1$; ** $P < 0.05$

Cuadro 14. Evaluación de las lesiones en la tonsila cecal de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de diferentes cepas de VEN.

| Cepa virus | Tonsila cecal | | | | | | |
|--------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| | Horas post-inoculación | | | | | | |
| | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 | 84 | 96* |
| Chimalhuacán | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 2.0 | 3.0 | 2.0 | 3.0b |
| Querétaro | 2.7 | 2.0 | 2.7 | 2.0 | 2.7 | 2.7 | 2.3ab |
| Torreón | 2.7 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 2.0 | 2.7 | 3.0b |
| DPAa | 3.0 | 3.0 | 2.7 | 2.3 | 3.0 | 3.0 | 3.0b |
| LaSota | 2.3 | 2.3 | 2.7 | 2.3 | 2.7 | 2.0 | 1.7a |

Diferente literal en la misma columna indica diferencia estadística significativa; * P< 0.05;

Cuadro 15. Evaluación de las lesiones en la glándula de Harder de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de diferentes cepas de VEN.

| Cepa virus | Glandula de Harder | | | | | | |
|--------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Horas post-inoculación | | | | | | |
| | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 | 84 | 96 |
| Chimalhuacán | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.7 | 1.7 |
| Querétaro | 1.3 | 1.0 | 1.7 | 1.0 | 1.0 | 1.7 | 1.7 |
| Torreón | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.3 | 1.3 | 1.7 |
| DPAa | 1.3 | 1.3 | 1.0 | 1.3 | 1.0 | 1.7 | 1.3 |
| LaSota | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |

No se encontró diferencia estadística significativa, P> 0.05;

Cuadro 16. Evaluación de las lesiones en la médula ósea de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de diferentes cepas de VEN.

| Cepa virus | Médula ósea | | | | | | |
|--------------|------------------------|------|-------|------|------|--------|--------|
| | Horas post-inoculación | | | | | | |
| | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 | 84 | 96 |
| Chimalhuacán | 0.33 | 0.67 | 1.00a | 1.67 | 1.67 | 2.67b | 3.00b |
| Querétaro | 0.67 | 1.33 | 1.33a | 1.67 | 1.33 | 2.67b | 2.33ab |
| Torreón | 0.67 | 1.00 | 2.00b | 1.67 | 2.00 | 2.00ab | 2.33ab |
| DPAa | 0.33 | 0.33 | 0.67a | 1.33 | 2.33 | 2.00ab | 2.67b |
| LaSota | 0.00 | 0.00 | 0.33a | 0.33 | 1.00 | 1.00a | 1.00a |

Diferente literal en la misma columna indica diferencia estadística significativa, P< 0.05.

Cuadro 17. Aislamiento viral a partir de órganos de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de la cepa tipo Torreón del VEN.

| Muestra | Aislamiento viral ¹ | | | | | | |
|--------------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Horas post-inoculación de la aves | | | | | | |
| | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 | 84 | 96 |
| Glándula de Harder | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Timo | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Bazo | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Tonsila cecal | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Bolsa de Fabricio | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Médula ósea | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |

1 (+) = Positivo al aislamiento viral, (-) = negativo al aislamiento viral

Cuadro 18. Aislamiento viral a partir de órganos de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de la cepa tipo Chimalhuacán del VEN.

| Muestra | Aislamiento viral ¹ | | | | | | |
|--------------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Horas post-inoculación de la aves | | | | | | |
| | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 | 84 | 96 |
| Glándula de Harder | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Timo | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Bazo | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Tonsila cecal | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Bolsa de Fabricio | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Médula ósea | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |

1 (+) = Positivo al aislamiento viral, (-) = negativo al aislamiento viral

Cuadro 19. Aislamiento viral a partir de órganos de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de la cepa Querétaro del VEN.

| Cepa virus | Aislamiento viral ¹ | | | | | | |
|--------------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Horas post-inoculación de la aves | | | | | | |
| | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 | 84 | 96 |
| Glándula de Harder | (-) | (+) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Timo | (-) | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Bazo | (-) | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Tonsila cecal | (-) | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Bolsa de Fabricio | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Médula ósea | (-) | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) |

1 (+) = Positivo al aislamiento viral, (-) = negativo al aislamiento viral

Cuadro 20. Aislamiento viral a partir de órganos de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de la cepa DPAA del VEN.

| Cepa virus | Aislamiento viral ¹ | | | | | | |
|--------------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Horas post-inoculación de la aves | | | | | | |
| | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 | 84 | 96* |
| Glándula de Harder | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Timo | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Bazo | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Tonsila cecal | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Bolsa de Fabricio | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Médula ósea | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |

1 (+) = Positivo al aislamiento viral, (-) = negativo al aislamiento viral

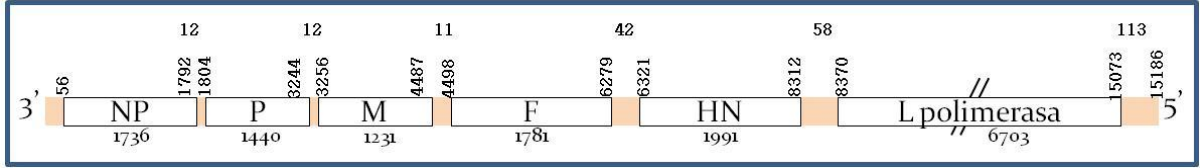
Cuadro 21. Aislamiento viral a partir de órganos de aves inoculadas a las 5 semanas de edad con 10^6 DLEP₅₀/0.2 ml de la cepa LaSota del VEN.

| Cepa virus | Aislamiento viral ¹ | | | | | | |
|--------------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Horas post-inoculación de la aves | | | | | | |
| | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 | 84 | 96* |
| Glándula de Harder | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Timo | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| Bazo | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| Tonsila cecal | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Bolsa de Fabricio | (-) | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Médula ósea | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |

1 (+) = Positivo al aislamiento viral, (-) = negativo al aislamiento viral

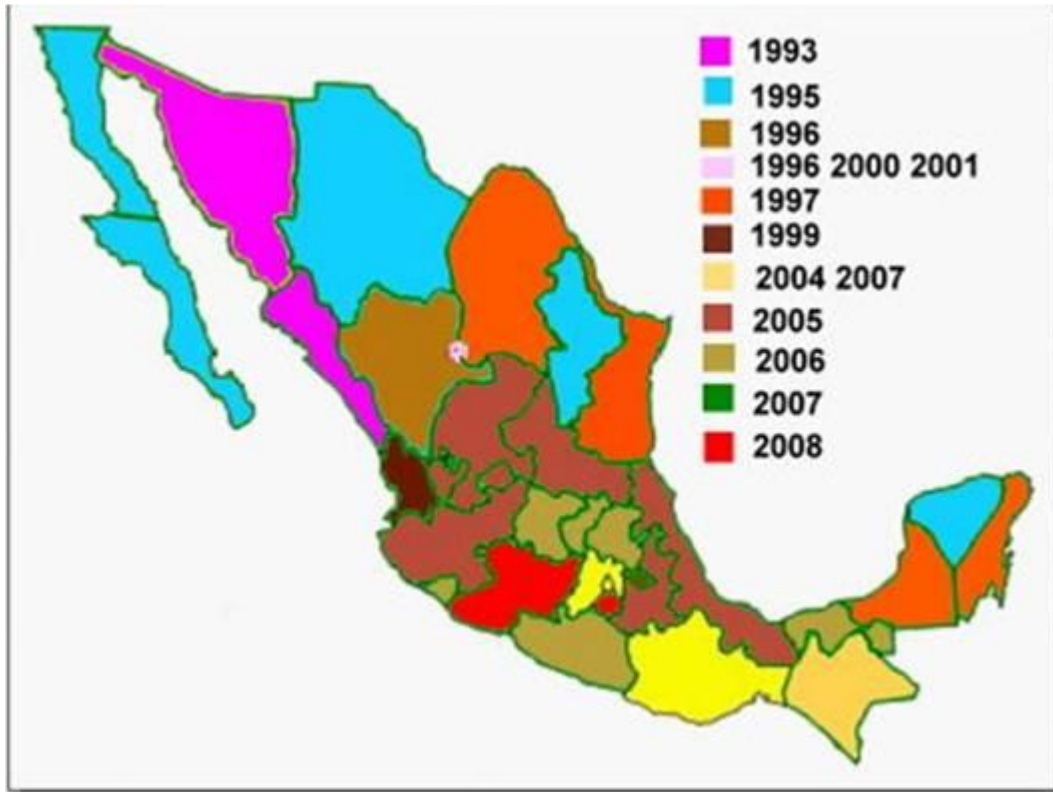
FIGURAS

Figura 1. Genoma del virus de la EN



Basado en de Leeuw OS and Peeters BPH , 1994, Acceso GenBank AF077761

Figura 2. Cronología de la declaración de Estados Libres de la EN, presentación velogénica.



La comarca Lagunera, así como Chiapas, perdieron temporalmente la calidad de Estado Libre, la cual recuperaron en el año indicado en el mapa.

Figura 3. Inversiones de Alianza para la Campaña contra la EN, 1996 – 2003, y aportaciones estatales, federales y de los productores de 2004 a 2008.

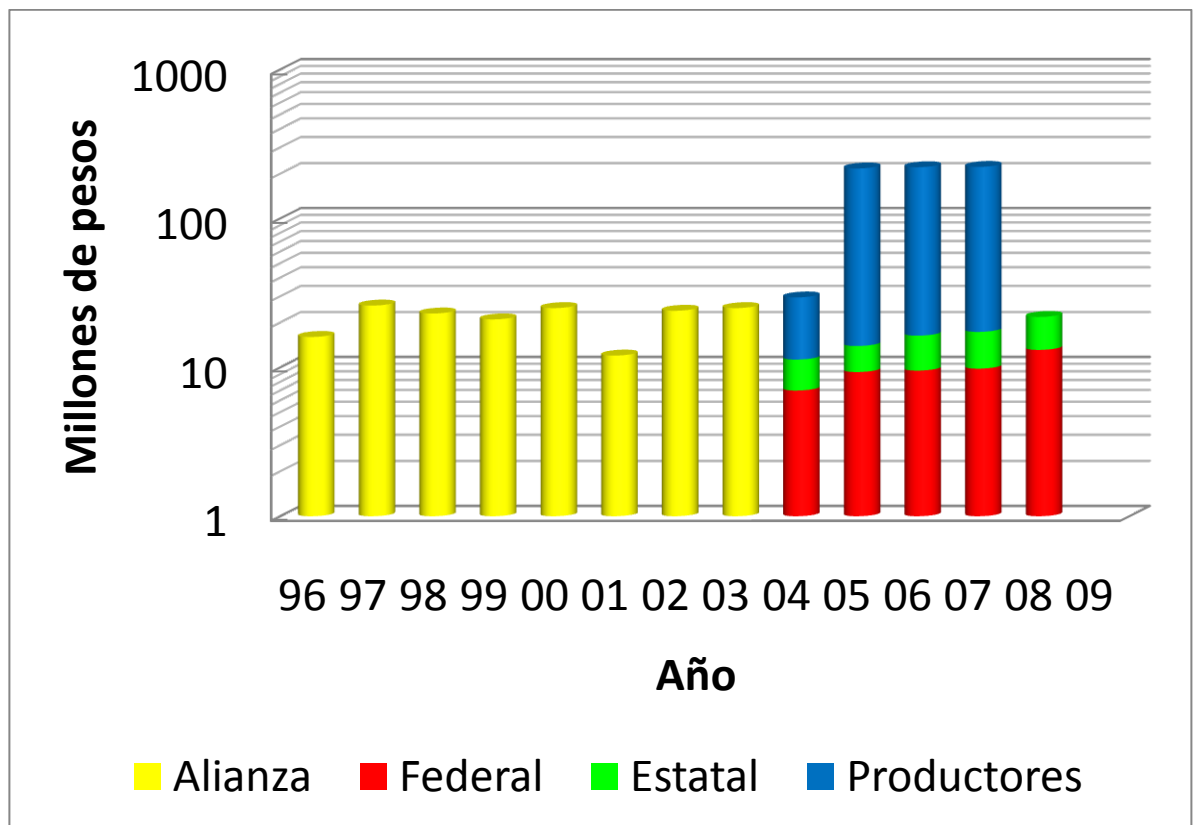
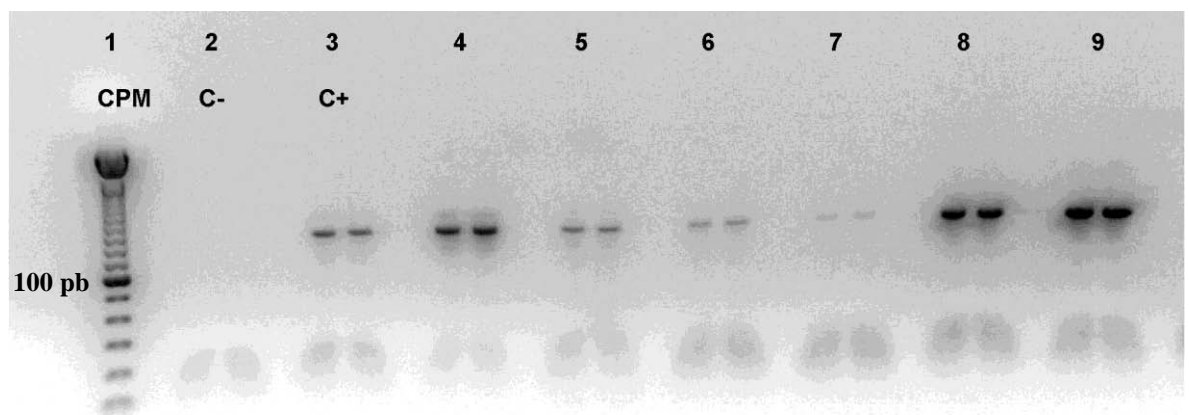
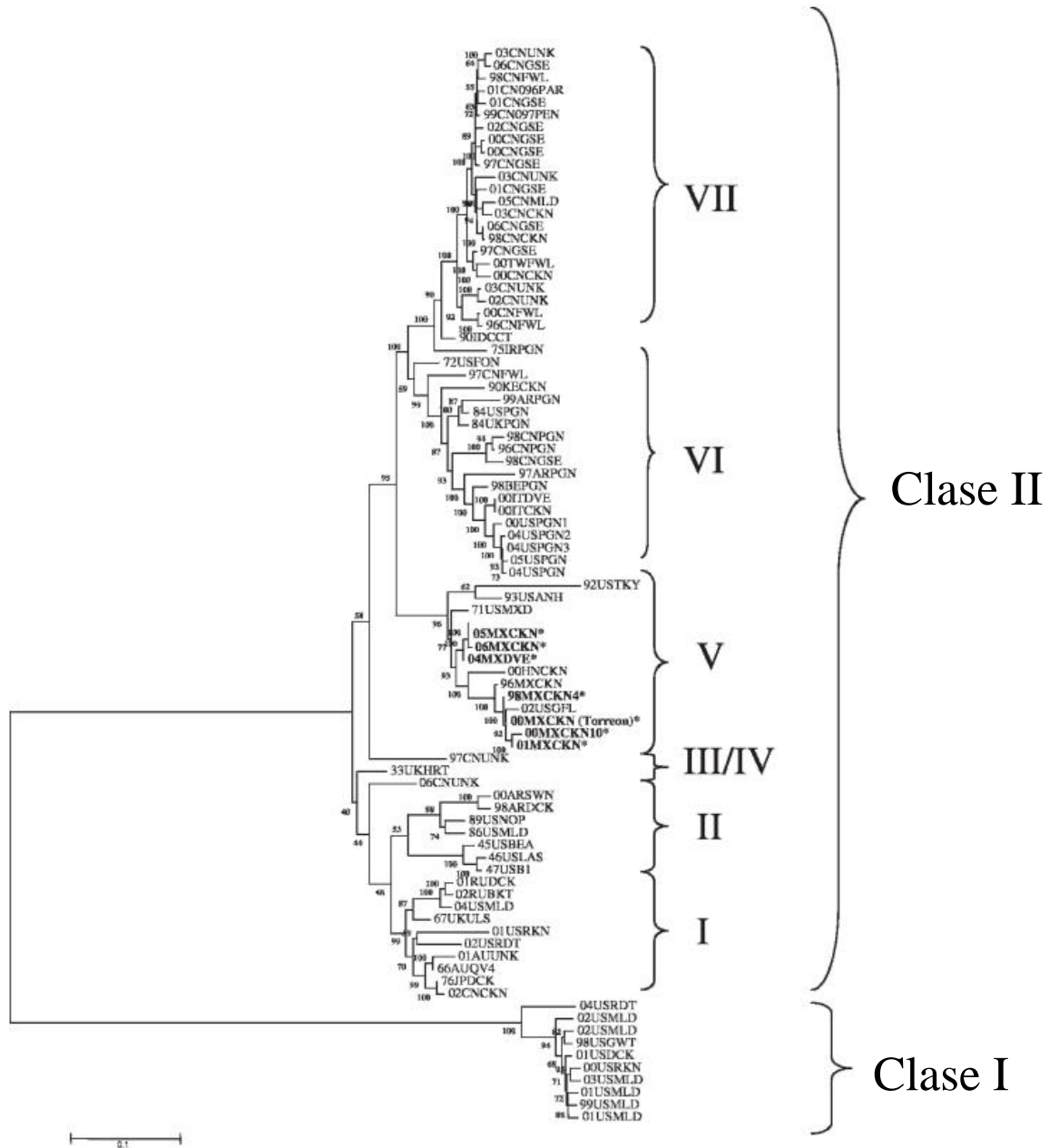


Figura 4. Resultado del RT-PCR de la amplificación del segmento de 374 pb del gen de la proteína F de algunos aislamientos del VEN, revelado del gel de electroforesis en un transiluminador ultravioleta.



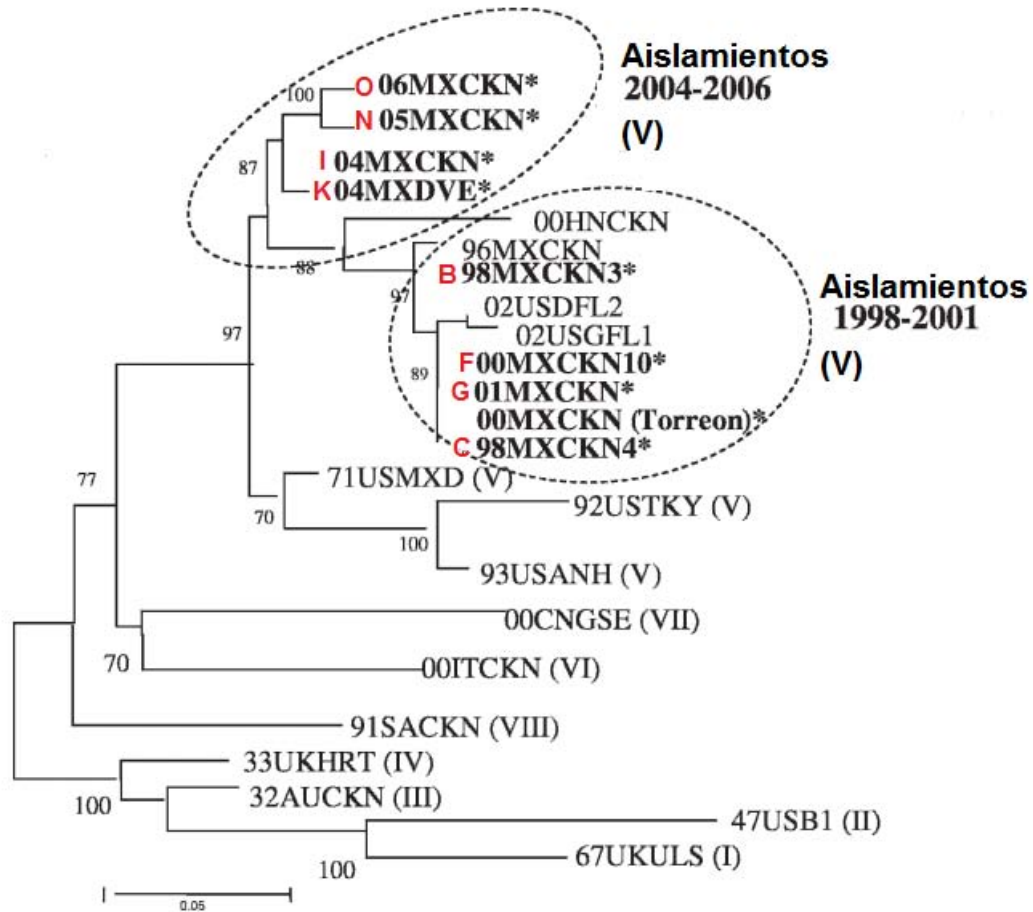
CPM= Control de peso molecular (pb= pares de bases); C- = Control negativo; C+ = Control positivo. Carriles 4 al 9 = Muestras. Todos se corrieron en dos carriles.

Figura 5a. Comparación filogenética de la región completa que codifica en gen F de los virus de este estudio con otros VEN de la clase I y Clase II, genotipos I al VII publicados previamente.



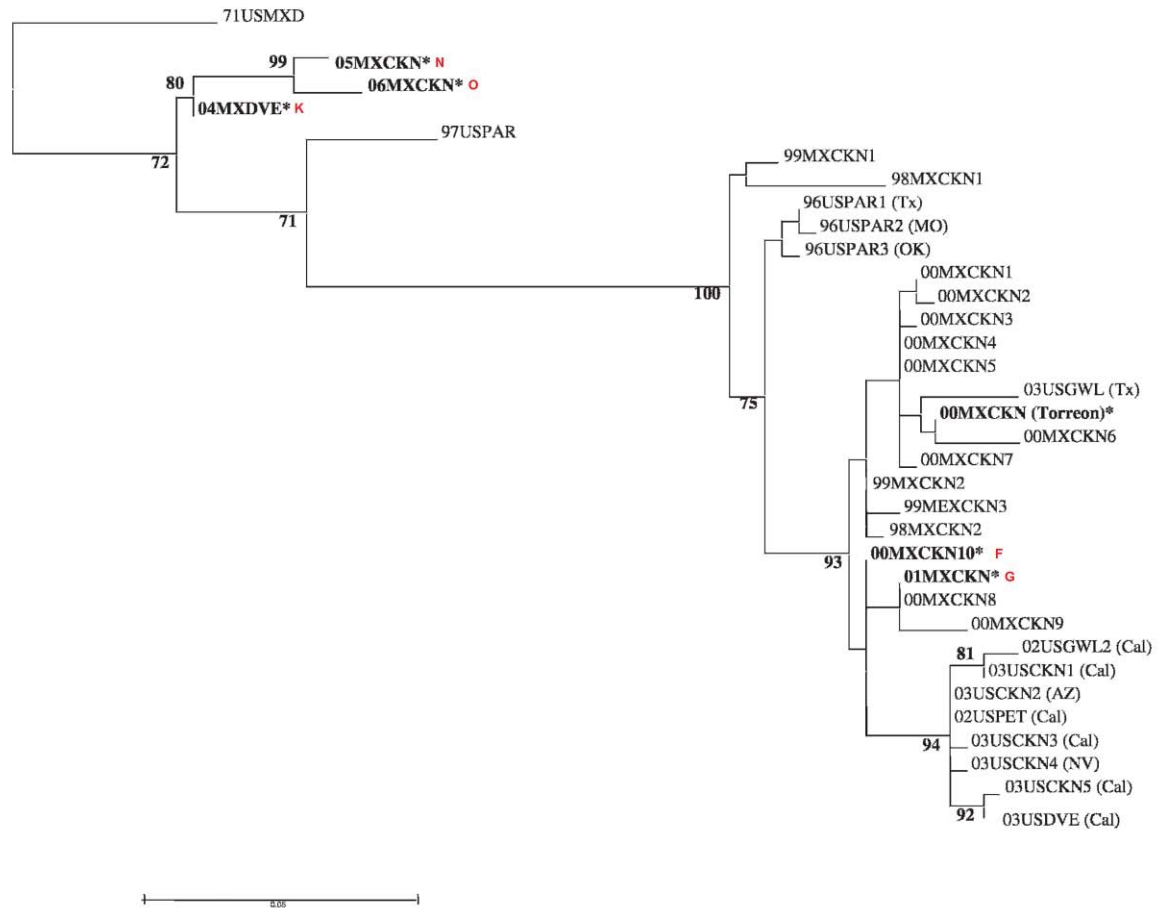
Los virus de este estudio están marcados en negritas y con un asterisco. La identificación incluye el año de aislamiento, el país de origen y la especie de ave de donde se aisló el virus.

Figura 5b. Análisis filogenético de máxima probabilidad del fragmento de 374 pb del gen F de los virus de este estudio y su comparación con secuencias publicadas previamente en el GenBank.



Los virus representativos de los genotipos I al VIII se incluyen como referencia (consultar Perozo *et al.* 2008, para la descripción completa). Los virus de este estudio están en negritas, con un asterisco y en rojo se muestra la identificación usada en el trabajo.

Figura 5c. Análisis filogenético de 642 pb de los segmentos contiguos de los genes de las proteínas M y F de los virus de este estudio y su comparación con secuencias de referencia publicadas previamente en el GenBank.



Los virus de este estudio están en negritas, con un asterisco y en rojo se muestra la identificación usada en el trabajo.

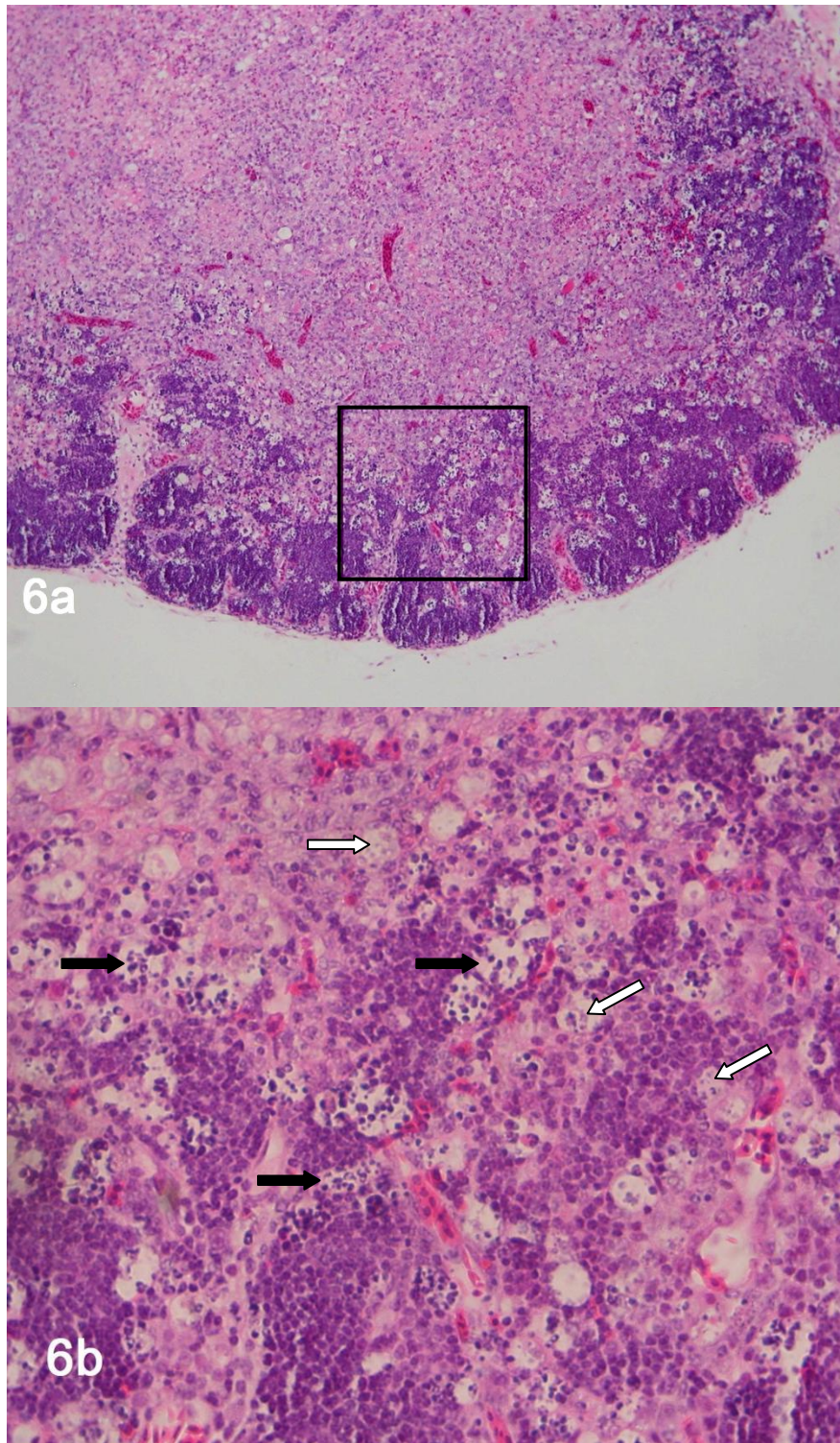


Figura 6. Timo de pollo de engorda desafiado con la cepa Chimalhuacán del VEN, 96 hpi, hematoxilina y eosina. 6a) Se observa atrofia severa de la corteza tímica, que corresponde al grado 4 en la escala de lesiones, así como apariencia de “cielo estrellado” debida a la necrosis, también se aprecian hemorragias tanto en la médula como en la corteza del órgano, 10x; 6b) Se observa necrosis (flechas blancas) y apoptosis (flechas negras) en la corteza tímica, 40x.

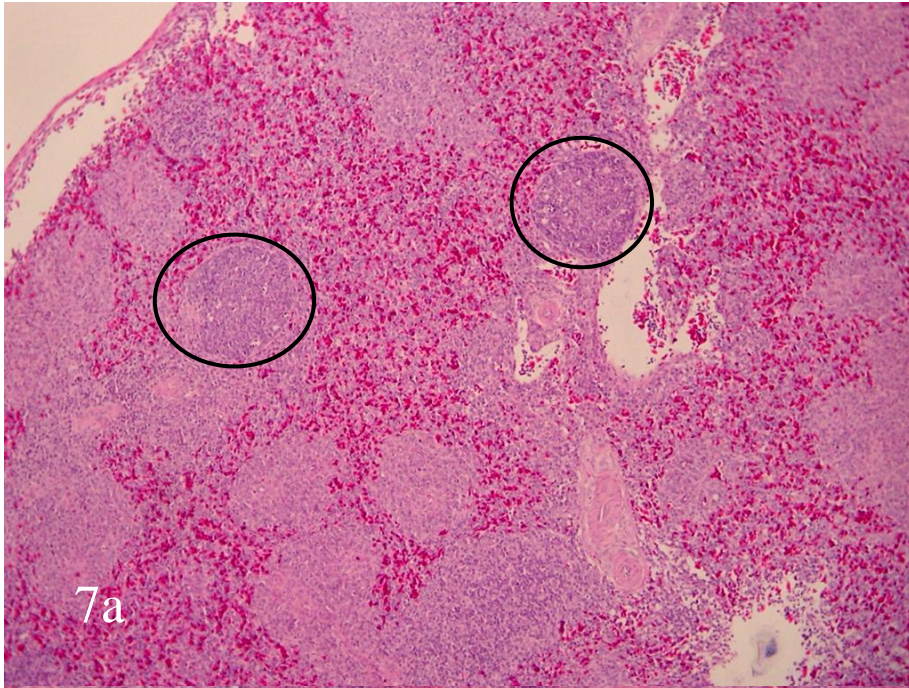


Figura 7a. Bazo de pollo de engorda desafiado con la cepa DPAa del VEN, 48 hpi, hematoxilina y eosina, 20x. Se observan folículos linfoides activos (círculos), correspondientes con el grado 2 en la escala de lesiones.

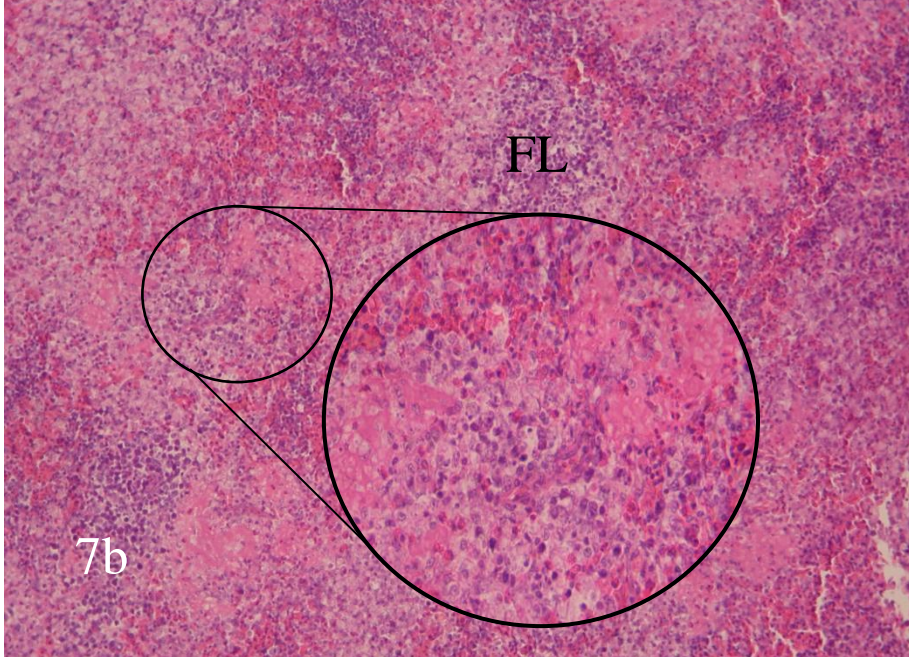


Figura 7b. Bazo de pollo de engorda desafiado con la cepa Torreón del VEN, 84 hpi, hematoxilina y eosina, 20x. Se observan folículos linfoides activos (FL), así como necrosis difusa y diseminada (círculo, 100x), correspondientes con el grado 4 en la escala de lesiones.

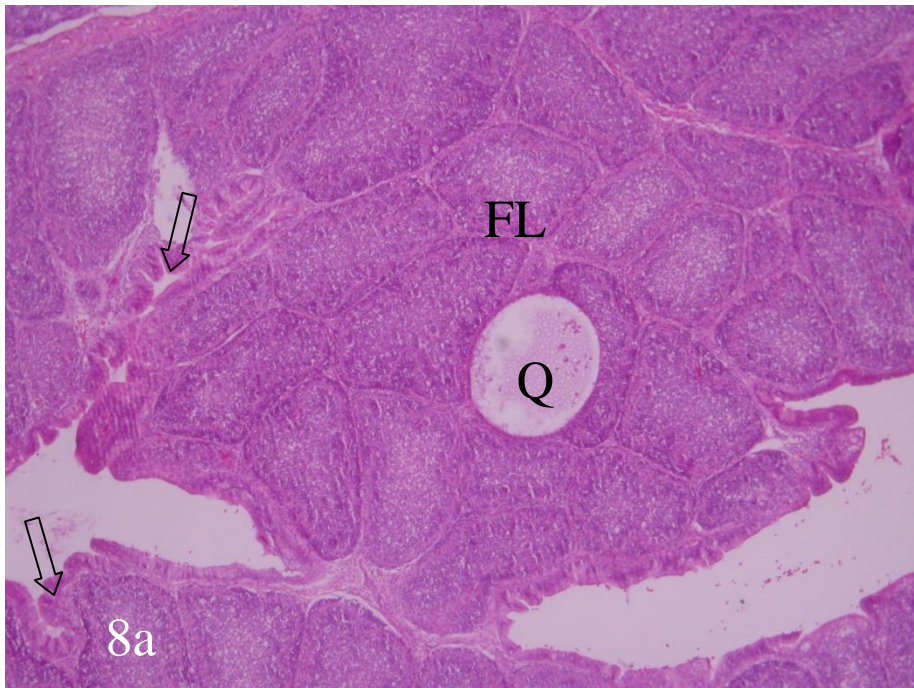


Figura 8a. Bolsa de Fabricio de pollo de engorda desafiado con la cepa DPAA del VEN, 84 hpi, hematoxilina y eosina, 10x. Se observa un quiste (Q), depleción linfoide severa en la médula de la mayoría de los folículos linfoides (FL), así como engrosamiento y formación de pliegues en el epitelio (flechas), compatibles con el grado 4 de la escala de lesiones.

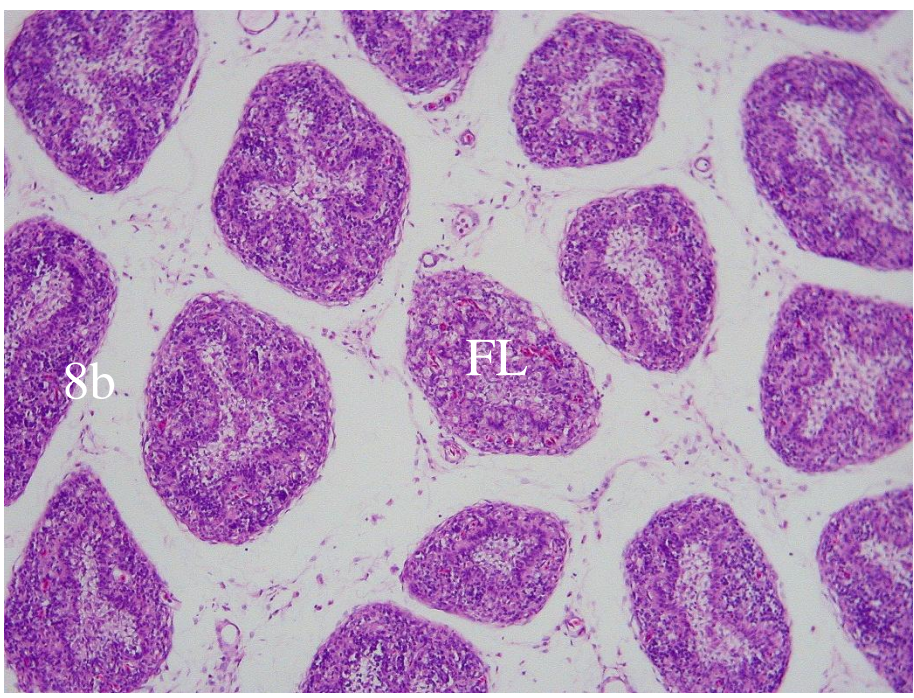


Figura 8b. Bolsa de Fabricio de pollo de engorda desafiado con la cepa Chimalhuacán del VEN, 96 hpi, hematoxilina y eosina, 20x. Se observa atrofia severa de los folículos linfoides (FL), con depleción de la médula, compatible con el grado 5 de la escala de lesiones.

Figura 9a. Tonsila cecal de pollo de engorda desafiado con la cepa LaSota del VEN, 96 hpi, hematoxilina y eosina, 20x. Se observan varios folículos linfoides activos (FL), lo que corresponde al grado 2 en la escala de lesiones.

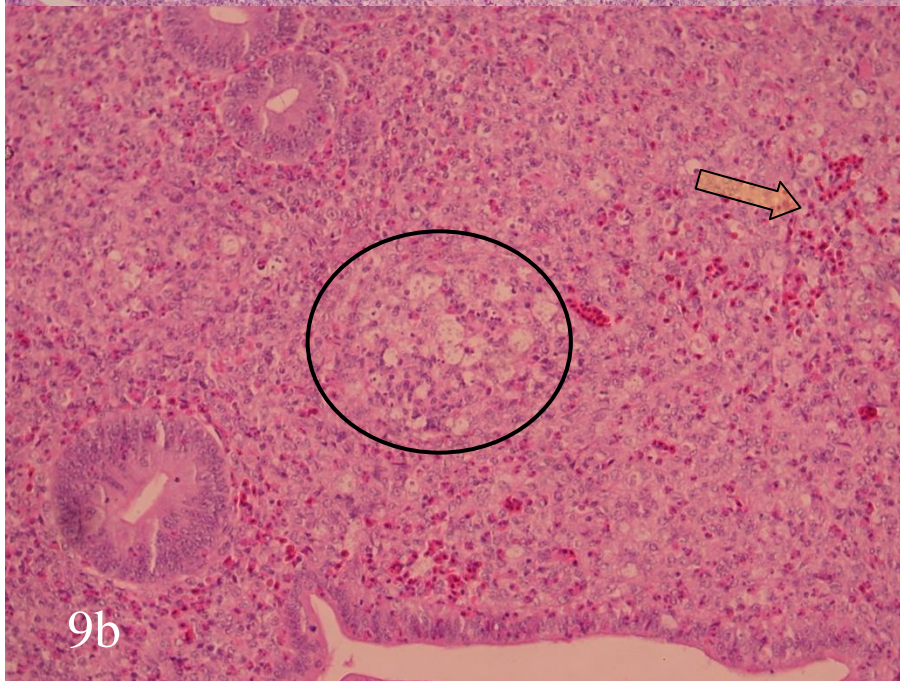
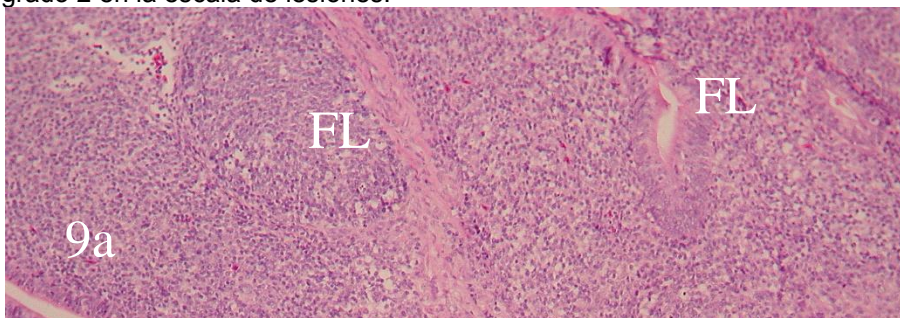


Figura 9b. Tonsila cecal de pollo de engorda desafiado con la cepa Torreón del VEN, 96 hpi, hematoxilina y eosina, 40x. Se observa un folículo linfoide necrótico, y hemorragia (flecha), lo que corresponde al grado 3 en la escala de lesiones.

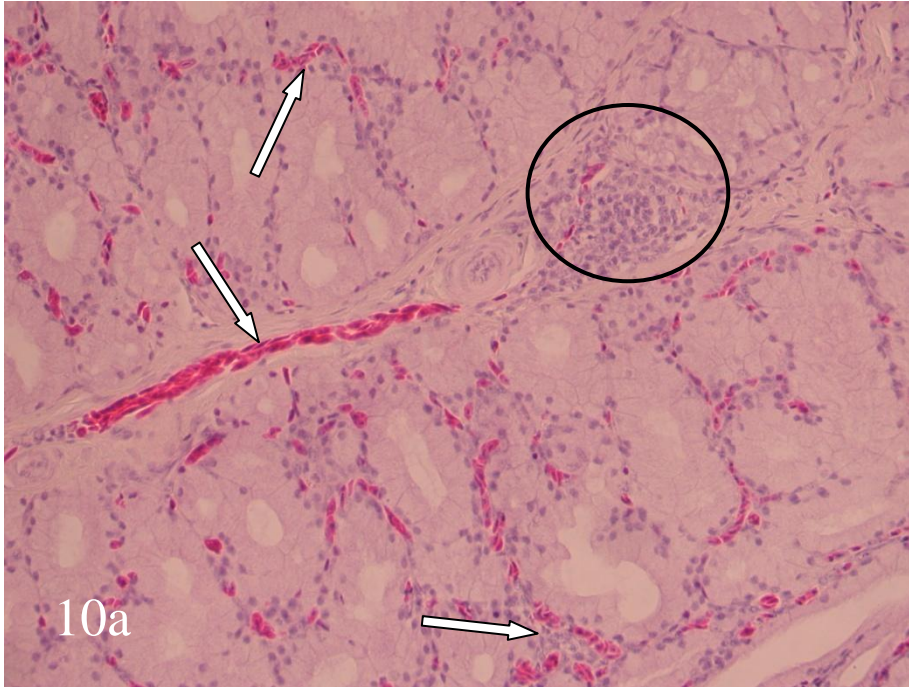


Figura 10a. Glándula de Harder de pollo de engorda inoculado con la cepa LaSota del VEN, 72 hpi, hematoxilina y eosina, 20x. Se observa infiltración linfocitaria (círculo) y hemorragias (flechas), correspondientes con el grado 1 en la escala de lesiones.

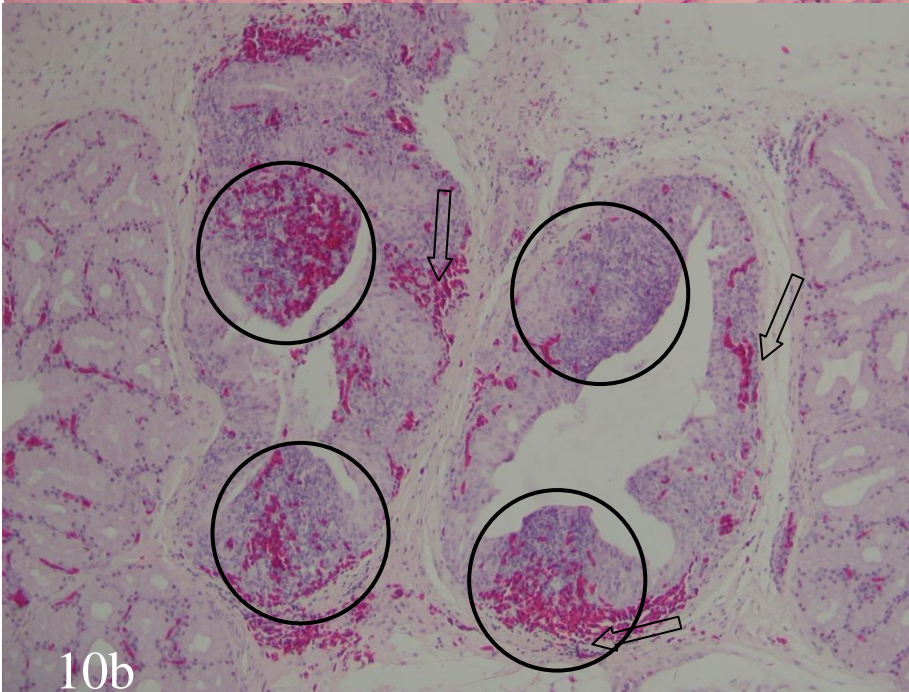


Figura 10b. Glándula de Harder de pollo de engorda inoculado con la cepa Chimalhuacán del VEN, 96 hpi, hematoxilina y eosina 20x. Se observan folículos linfoides (círculos) y hemorragias (flechas), correspondientes con el grado 2 en la escala de lesiones.

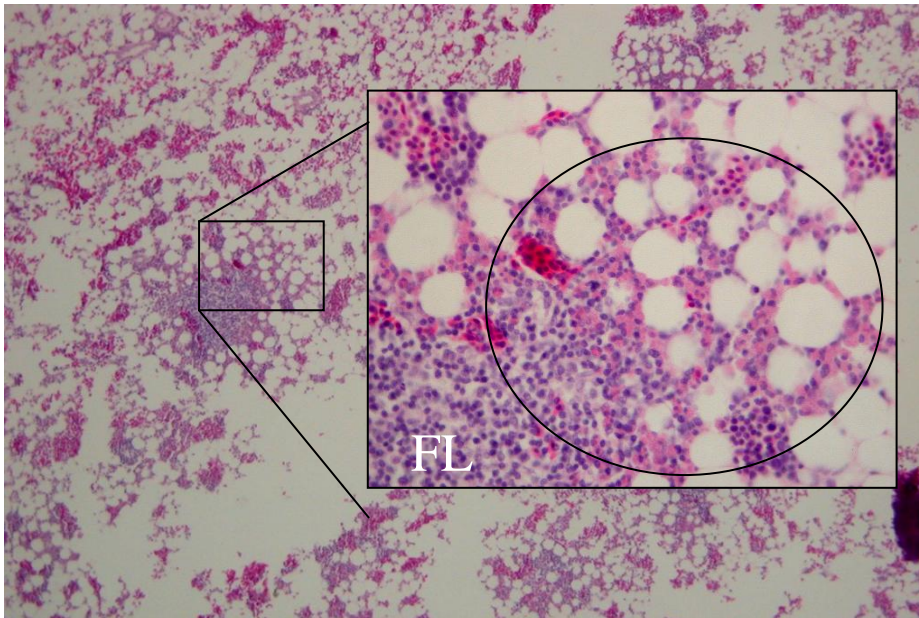


Figura 11a. Médula ósea de pollo de engorda inoculado con la cepa Torreón del VEN, 48 hpi, hematoxilina y eosina, 5x. Se observa un folículo linfóide activo (FL) y depleción celular, tanto de linfocitos como de las células granulocíticas (círculo en el recuadro, 40x), correspondiente con el grado 2 en la escala de lesiones.

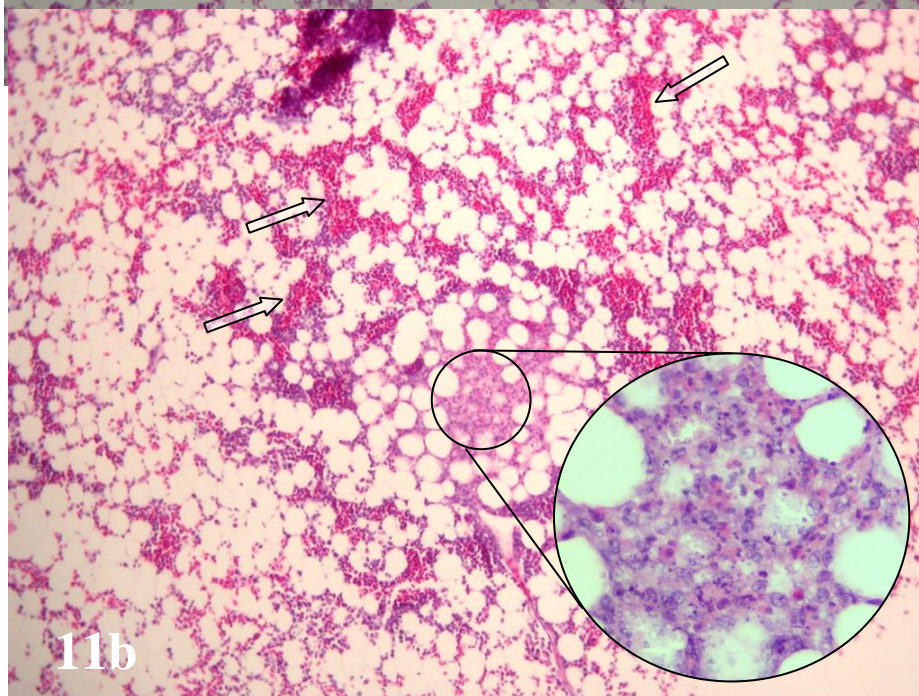


Figura 11b. Médula ósea de pollo de engorda inoculado con la cepa Querétaro del VEN, 84 hpi, hematoxilina y eosina, 10x. Se observa depleción de linfocitos y células granulocíticas, así como un foco de necrosis (círculo, 100x), y hemorragia (flechas), correspondiente con el grado 3 en la escala de lesiones.

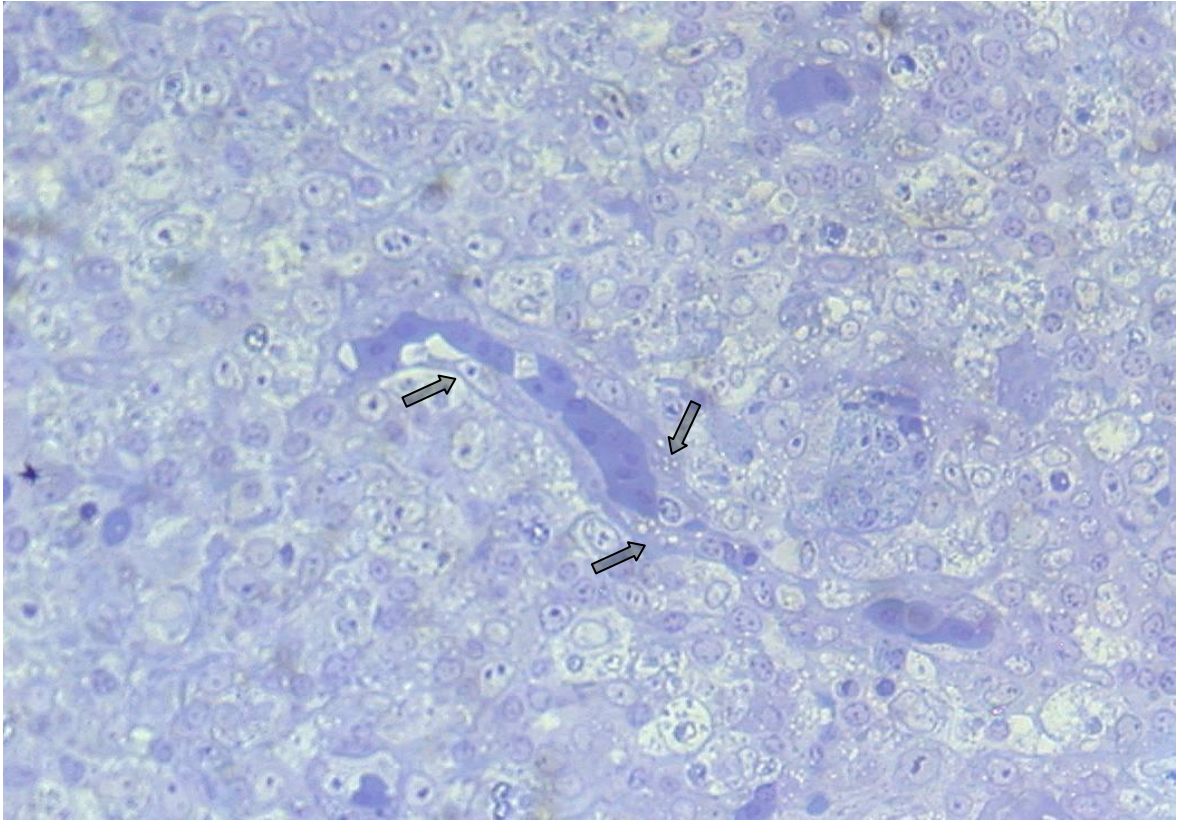


Figura 12. Médula del timo de pollo de engorda inoculado con la cepa DPAA del VEN, 72 hpi, Azul de toluidina 40x. Se observa necrosis difusa, y en el vaso sanguíneo las células endoteliales muestran hinchazón importante del núcleo y vacuolización del citoplasma (flechas).

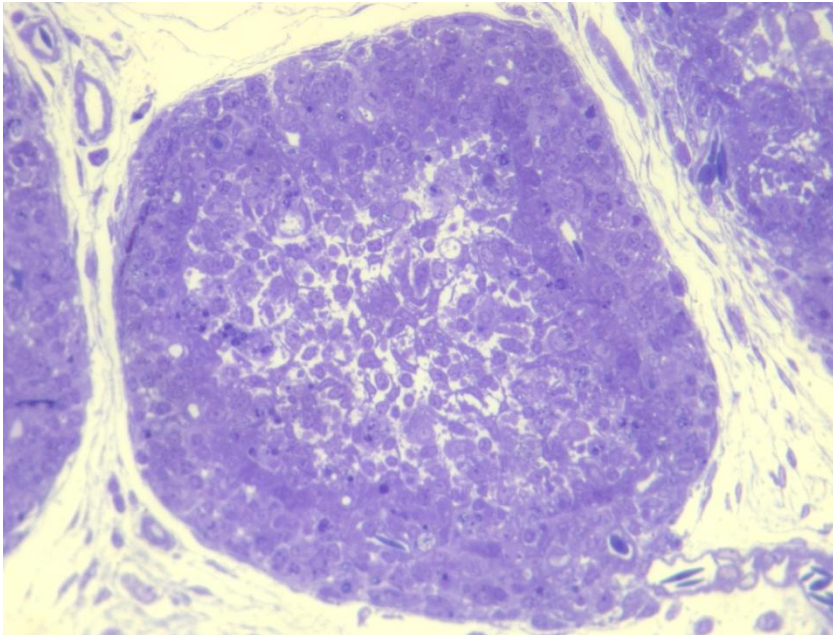


Figura 13. Folículo linfoide de la bolsa de Fabricio de pollo de engorda inoculado con la cepa DPAA del VEN, 84 hpi, Azul de toluidina 40x. Se observa atrofia con necrosis y depleción linfoide severa de la médula del folículo y escasa corteza

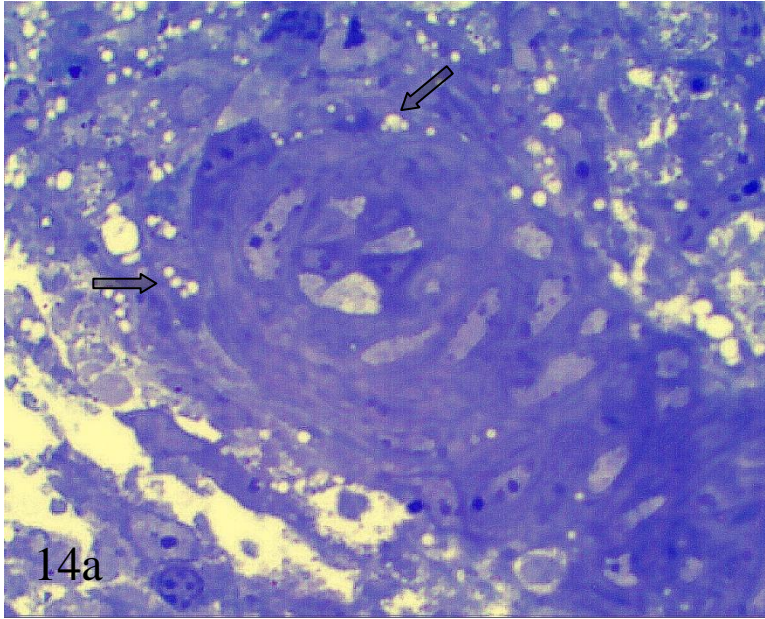


Figura 14a. Bazo de pollo de engorda inoculado con la cepa DPAA del VEN, 96 hpi, Azul de toluidina 100x. Se observa necrosis severa alrededor de una arteriola, la cual a su vez presenta células endoteliales con degeneración y vacuolas (Flechas).

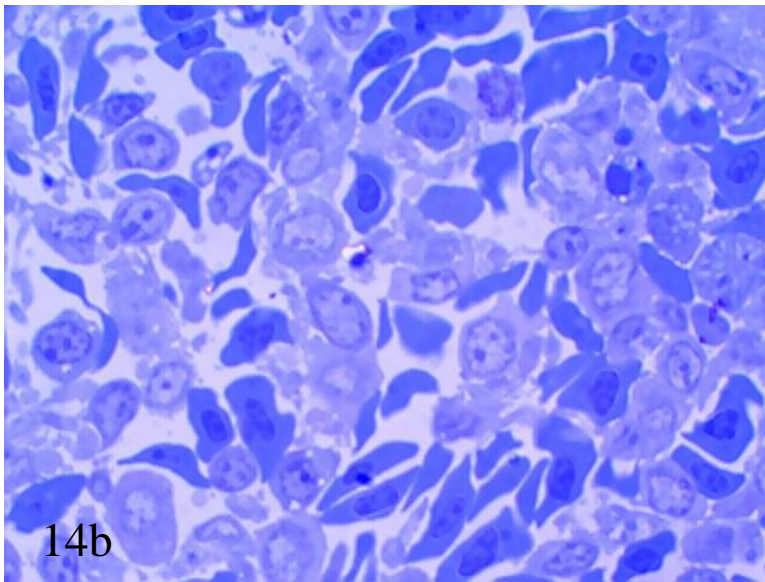


Figura 14b. Bazo de pollo de engorda inoculado con la cepa DPAA del VEN, 96 hpi, Azul de toluidina 100x. Se observa degeneración celular y necrosis, así como hemorragia.

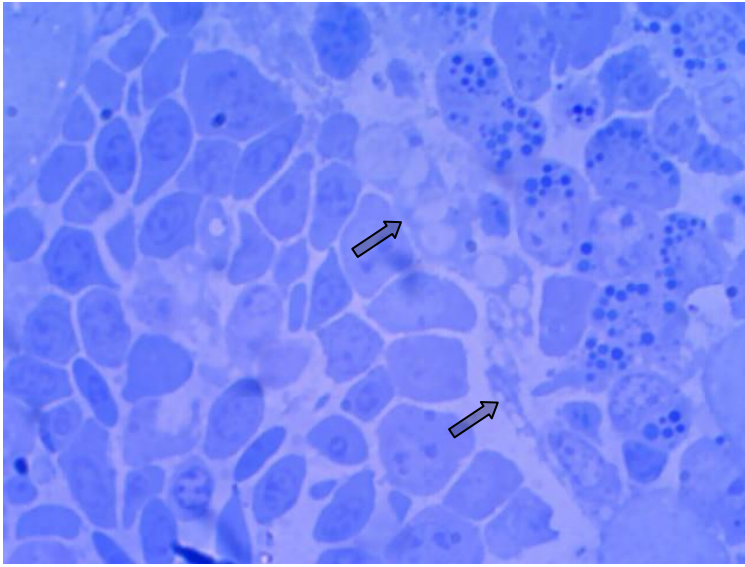


Figura 15a. Médula ósea de pollo de engorda inoculado con la cepa Querétaro del VEN, 36 hpi, Azul de toluidina 100x. Se observan detritus celulares, degeneración de células granulocíticas y vacuolización del citoplasma de células endoteliales (Flechas)

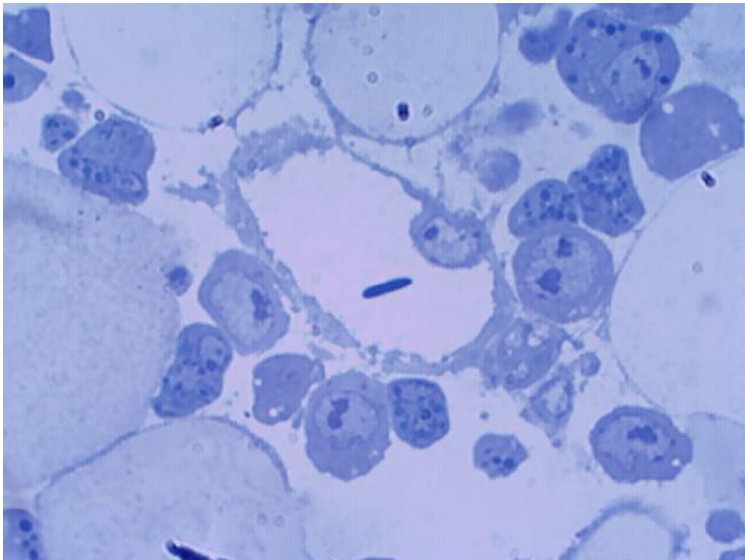


Figura 15b. Médula ósea de pollo de engorda inoculado con la cepa Querétaro del VEN, 84 hpi, Azul de toluidina 100x. Se observa destrucción del vaso sanguíneo, con degeneración y necrosis de las células endoteliales, así como depleción severa de las células granulocíticas.

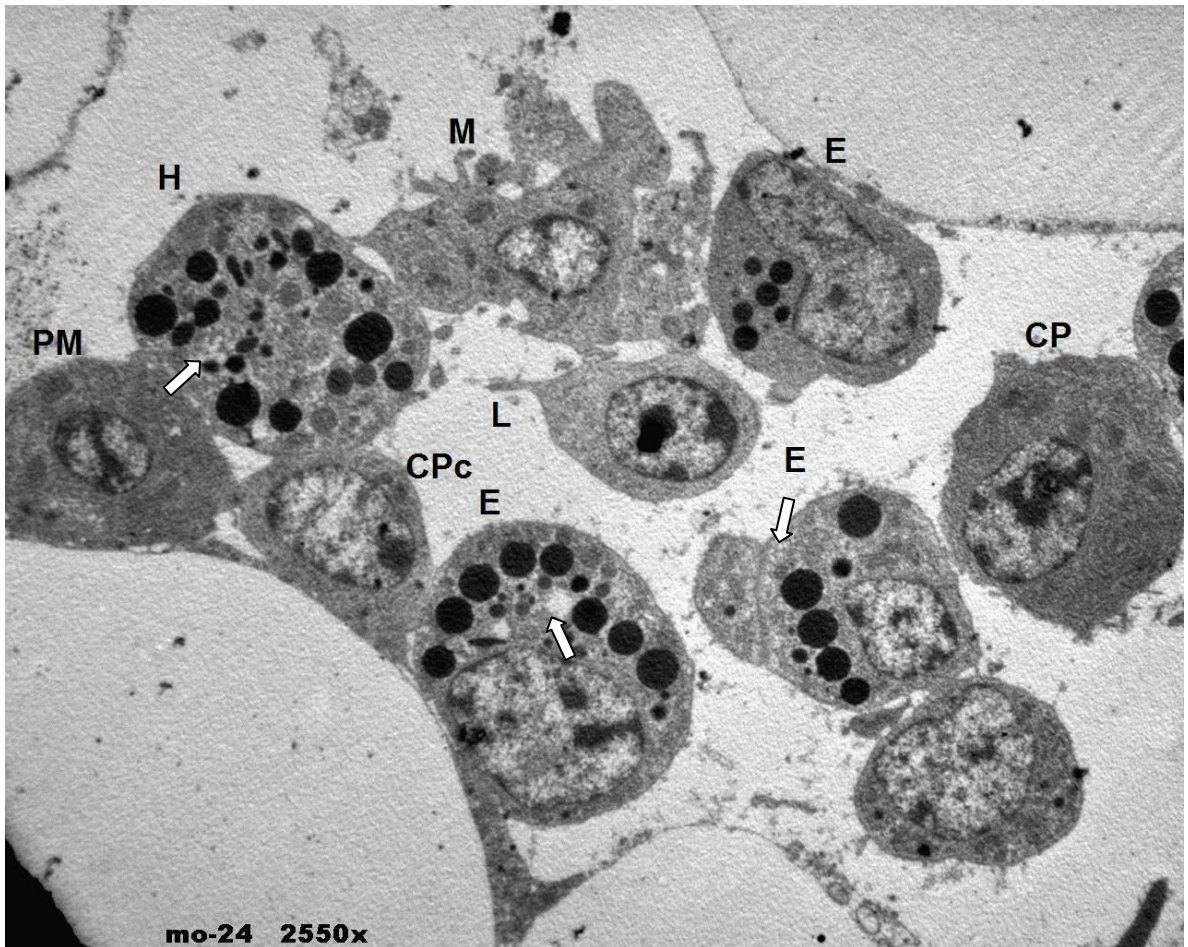


Figura 16: Fotografía de microscopio electrónico donde se muestra un corte de médula ósea de pollo inoculado con el VEN Chimalhuacán a las 24 hpi. Se observan heterófilos (H), eosinófilos (E), linfocito (L), célula plasmática (CP), células pericapilares (CPc), promielocito (PM) y macrófago (M). Los granulocitos (H y E) muestran edema y vacuolas (flechas), mientras que el macrófago tiene ruptura de la membrana citoplásmica, proyecciones de la misma y degeneración nuclear. ME 2550x, contraste con citrato de plomo y acetato de uranilo.

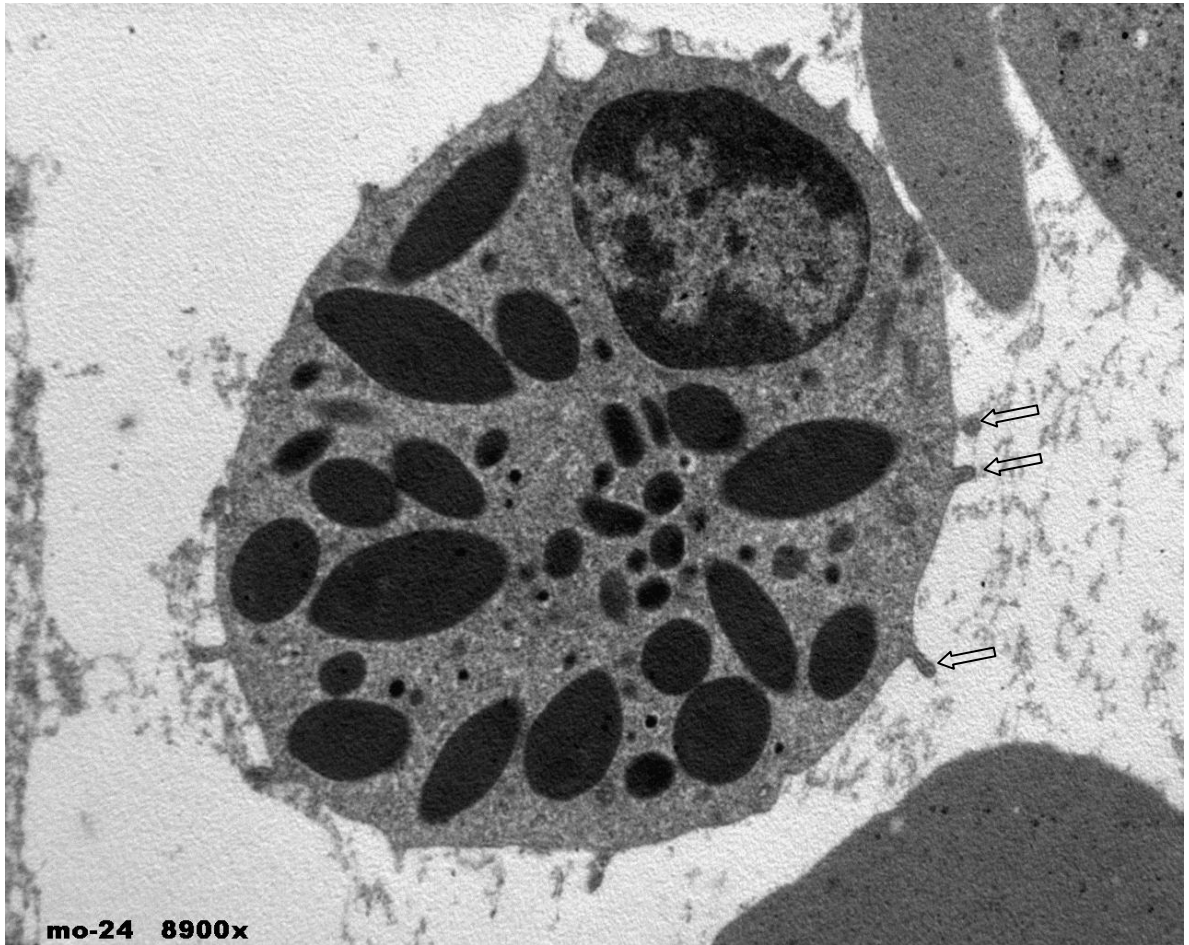


Figura 17. Fotografía de microscopio electrónico donde se muestra un corte de médula ósea de pollo inoculado con el VEN Chimalhuacán a las 24 hpi. Heterófilo maduro, se observan gránulos ovales de contenido fibrilar, así como proyecciones de la membrana celular (flechas) las cuales se asocian con la liberación de partículas virales. ME 8900x, contraste con citrato de plomo y acetato de uranilo.

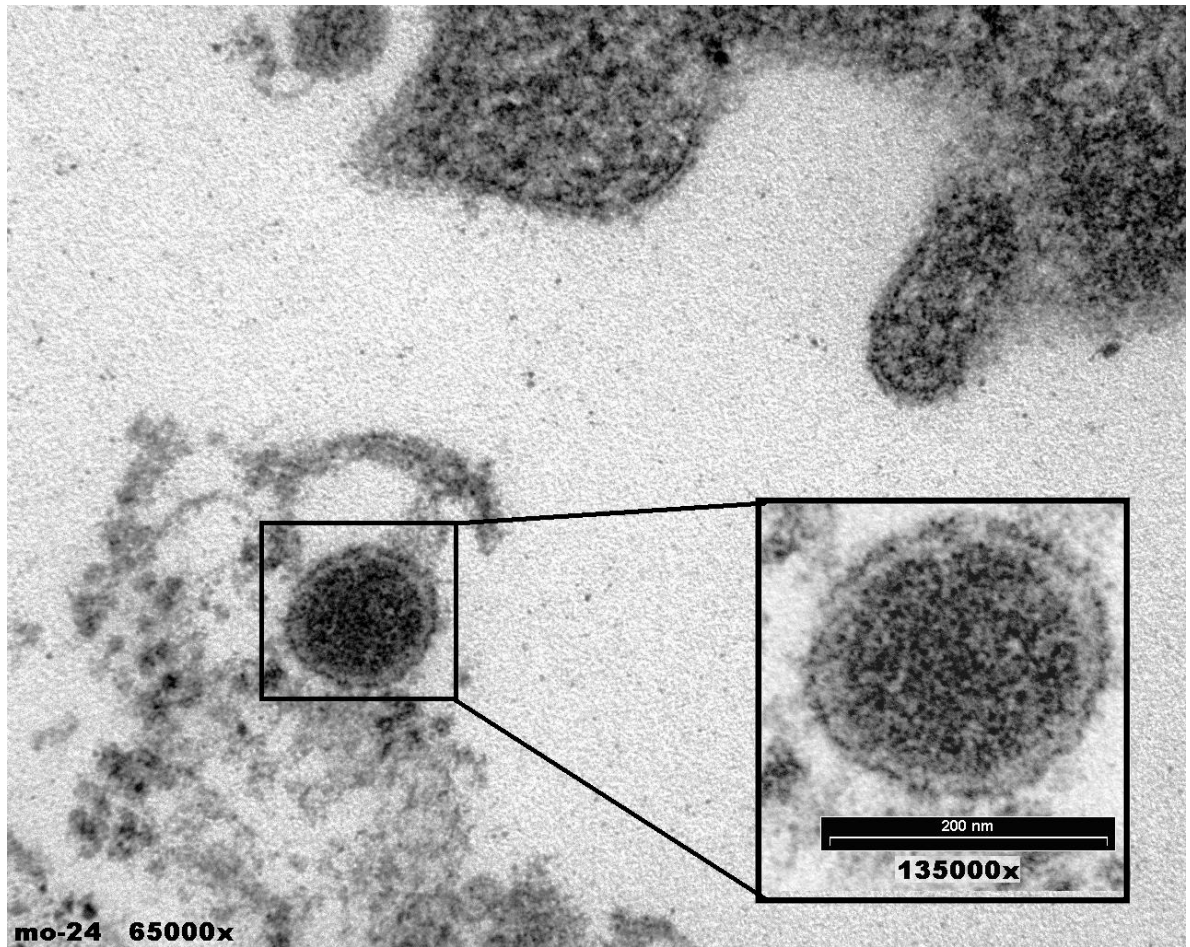


Figura 18. Fotografía de microscopio electrónico donde se muestra un corte de médula ósea de pollo inoculado con el VEN Chimalhuacán a las 24 hpi. Partícula electrodensa de aproximadamente 200 nm de diámetro en detritus celular, con características compatibles con el virus de la enfermedad de Newcastle. El recuadro muestra la partícula aumentada 135000x. ME 65000x, contraste con citrato de plomo y acetato de uranilo.

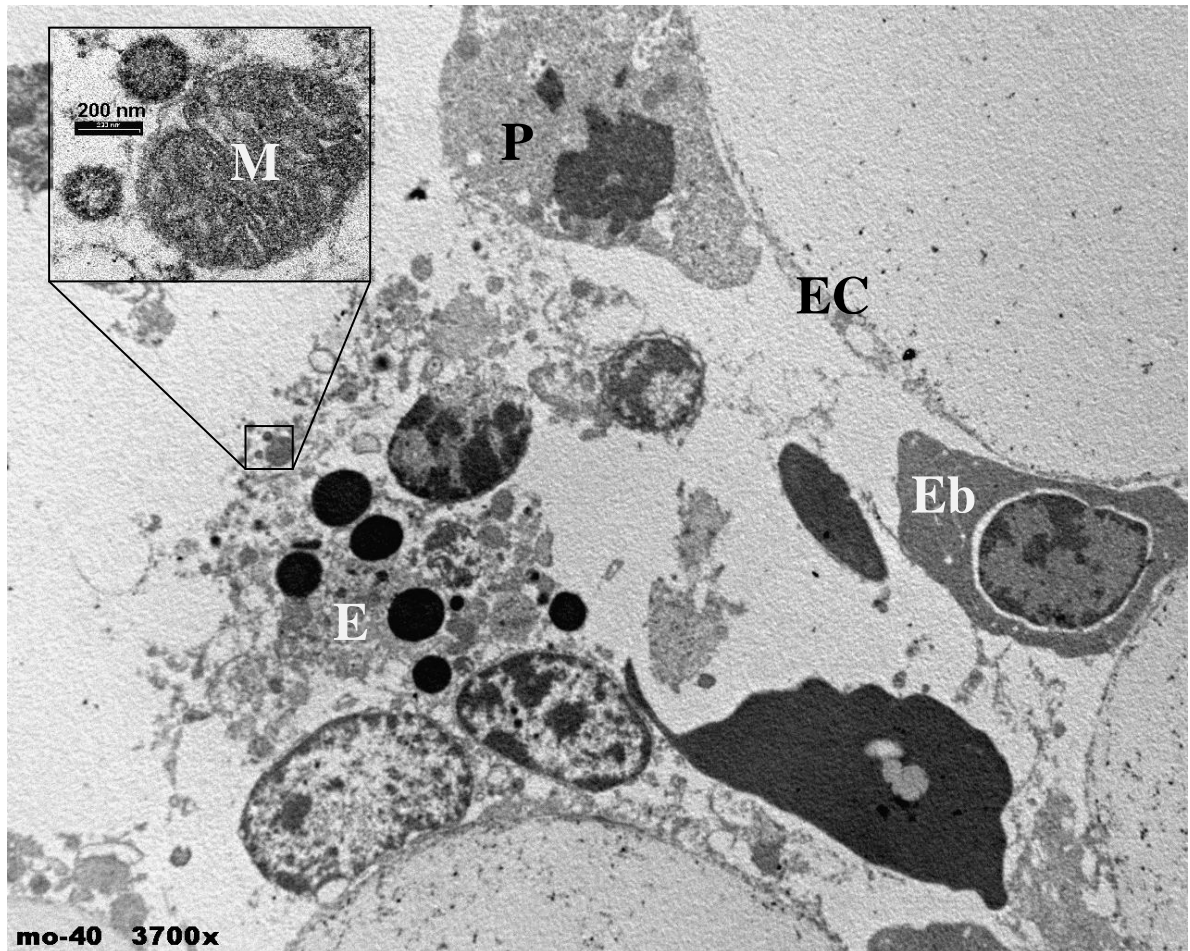


Figura 19. Fotografía de microscopio electrónico donde se muestra un corte de médula ósea de pollo inoculado con el VEN Chimalhuacán a las 48 hpi. Se observa necrosis celular. Se distinguen detritus de eosinófilo (E) en el cual la membrana celular ha desaparecido, el citoplasma se encuentra disperso, y la membrana del núcleo se ha roto, lo que permite la salida del contenido. En el recuadro se muestran dos partículas virales de aproximadamente 200 nm de diámetro (65000x), adheridas a la membrana de una mitocondria (M). También se observan degeneración y necrosis del pericito (P), endotelio capilar (Ec) y eritroblasto (Eb). ME 3700x, contraste con citrato de plomo y acetato de uranilo.

APENDICE

Publicaciones científicas derivadas del estudio

Biological and Phylogenetic Characterization of Virulent Newcastle Disease Virus Circulating in Mexico

F. Perozo,^A R. Merino,^B C. L. Afonso,^C P. Villegas,^{AD} and N. Calderon^B

^AUniversity of Georgia, Poultry Diagnostic and Research Center, Athens, GA 30602

^BDepartamento de Producción Animal: Aves–Facultad de Medicina Veterinaria, UNAM, Mexico DF, 04510 Mexico

^CSoutheast Poultry Research Laboratory, United States Department of Agriculture, Athens, GA 30605

Received 29 February 2008; Accepted and published ahead of print 8 May 2008

SUMMARY. In 2002–2003, velogenic Newcastle Disease Virus outbreaks, closely related to the Mexican isolates, were confirmed in the United States (U.S.) in southern California, Arizona, Nevada, and Texas. In this report, virulent NDVs isolated in Mexico between 1998 and 2006 were subjected to biologic characterization, using standard pathogenicity tests, and to phylogenetic analysis. Chicken embryo mean death time (MDT) test results ranged from 39.7 to 61.5 hours, and intracerebral pathogenicity index (ICPI) values were between 1.59 and 1.94, compared to a possible maximum value of 2.0. These isolates showed a dibasic amino acid motif at the fusion protein cleavage site sequence required for host systemic replication. Phylogenetic analysis indicated that the Mexican virulent NDVs belong to the class II, genotype V viruses and can be clearly divided in two groups as follows: isolates from 1998 to 2001 with close epidemiologic relationship with the latest U.S. NDV outbreaks, and phylogenetically distinct viruses, isolated from 2004 to 2006, which showed higher virulence. The assessment of the evolution of viruses from Mexico and other neighboring countries will aid in the U.S. surveillance efforts for early detection of highly virulent NDV.

RESUMEN. Caracterización biológica y filogenética de virus virulentos de la enfermedad de Newcastle circulando en México. Durante los años 2002 y 2003, se confirmaron en los Estados Unidos, específicamente en el sur de California, en Arizona, Nevada y Texas, brotes de virus velogénicos de la enfermedad de Newcastle cercanamente relacionados con aislamientos Mexicanos. En el presente reporte, virus velogénicos de la enfermedad de Newcastle aislados en México entre los años 1998 y 2006 fueron sometidos a caracterización biológica utilizando pruebas estándar de patogenicidad y análisis filogenéticos. Los resultados de la prueba de tiempo promedio de muerte embrionaria se ubicaron en un rango de 39.7 a 61.5 horas, mientras que los valores para el índice de patogenicidad intracerebral fueron entre 1.59 y 1.94, comparados con un valor máximo de 2.0. Molecularmente, los aislamientos mostraron un motivo dibásico de aminoácidos en la secuencia del sitio de corte de la proteína de fusión requerido para la replicación sistémica en el huésped. El análisis filogenético indicó que los virus virulentos de la enfermedad de Newcastle originados en México pertenecen a los virus de la clase II en el genotipo V y pueden dividirse claramente en dos grupos: virus aislados entre los años 1998 y 2001, con una relación epidemiológica cercana con los virus responsables de los últimos brotes de la enfermedad de Newcastle ocurridos en los Estados Unidos, y un grupo de virus filogenéticamente distintos aislados desde el año 2004 hasta el año 2006 que mostraron una mayor virulencia. La evaluación de la evolución de los virus de México y otros países vecinos ayudará en los esfuerzos de vigilancia y detección temprana de virus de la enfermedad de Newcastle de alta patogenicidad adelantada por los Estados Unidos.

Key words: Newcastle disease virus, phylogenetic analysis, Mexico

Abbreviations: bp = base pair(s); END = exotic Newcastle disease; ICPI = intracerebral pathogenicity index; MDT = mean death time; ML = maximum likelihood; NDV = Newcastle diseases virus; OIE = World Organisation for Animal Health; RT-PCR = reverse transcriptase- polymerase chain reaction; SPF = specific pathogen free

Newcastle disease virus (NDV) is a single-stranded negative-sense RNA virus member of the *Paramyxoviridae* family in the genus *Avulavirus* (17). Due to variation in viral virulence and host susceptibility, the symptoms of NDV infection in domestic species (chicken, turkey, goose, duck, and pigeon) range from unapparent to severe, the later including respiratory, enteric, and nervous system disease (3). Even though vaccination using live and killed vaccines is widespread as management practice, the velogenic strains are endemic in the commercial poultry of many countries and are responsible for direct and indirect economic losses (28).

Biologic tests using live virus, such as embryo mean death time (MDT) and the intracerebral pathogenicity index (ICPI), can be useful to characterize the pathogenicity of NDV field isolates (2). The molecular approach for NDV identification and pathotyping, using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by direct sequencing and analysis of the fusion protein gene cleavage site, has been used for NDV research and surveillance

(15,21,25,32). The current World Organisation for Animal Health (OIE) definition of virulence is based on the intracerebral pathogenicity index (>0.7) and the presence of basic amino acids at the cleavage site (30).

Both antigenic (6) and genetic diversity (1) are recognized within the NDV isolates, all of which are all members of the APMV-1 serotype. Based on nucleotide sequence, at least eight distinct lineages of NDV of class II, and possibly nine of class I, have been identified (1,8,11). For instance, the United States isolates of NDV (identified in the 1940s), and most of the respirotropic vaccines used today to control Newcastle disease, are class II, genotype II. In U.S. commercial poultry, the vast majority of field isolates are lentogenic strains (14,26). However, NDV isolates of intermediate to high virulence have also been recovered from both poultry and other avian species, including wild birds and turkeys (13,14,20). Virulent viruses are not normally found in the U.S. and are referred to as exotic Newcastle disease (END) (5). Most of the recent Mexican and U.S. virulent NDV isolates belong to the class II, genotype V group (22).

^DCorresponding author. E-mail: pedrov@uga.edu.

Table 1. Biological characterization of Mexican NDV isolates obtained between 1998 and 2006.

| Identification ^A | Isolation place | Isolation year | MDT ^B (hours) | ICPI ^C |
|-----------------------------|-----------------|----------------|--------------------------|-------------------|
| 73MXCKN | Chimalhuacan | 1973 | 37.9 | 1.89 |
| 00MXCKN | Torreon | 2000 | 59.7 | 1.64 |
| 04MXCKN | Mexico DF | 2004 | 44.9 | 1.80 |
| 98MXCKN3 | Mexico DF | 1998 | 48.8 | 1.83 |
| 98MXCKN4 | Morelos | 1998 | 61.5 | 1.88 |
| 00MXCKN10 | Mexico DF | 2000 | 45.2 | 1.83 |
| 01MXCKN | Mexico DF | 2001 | 62.0 | 1.59 |
| 04MXDVE | Mexico DF | 2004 | 44.6 | 1.93 |
| 05MXCKN | Mexico DF | 2005 | 44.3 | 1.91 |
| 06MXCKN | Mexico State | 2006 | 47.0 | 1.94 |
| 01MXCKN1 | Mexico DF | 2001 | 44.1 | 1.89 |

^AAbbreviations: the first two digits are the year of isolation, followed by two positions for country of origin, and the last three–five positions for avian species (CKN = chicken, DVE = dove).

^BMean death time test using 9- to 11-day-old SPF chicken embryos.

^CIntracerebral pathogenicity index (2).

Recently, END was introduced into California, resulting in the destruction of over 3.5 million birds and a federal control cost of over 180 million dollars (19,20). The virus was also detected in backyard fowl in southern Nevada and southern Texas, along with the northwestern corner of Arizona (20,22). Fortunately, eradication efforts were successful for the outbreak, but END is endemic around the world and reintroduction of the virus is likely to happen. Phylogenetic analyses have demonstrated that the viruses causing the mentioned outbreaks were closely related to viruses isolated at the same time from Mexico and Central America (22). In Mexico, NDV was isolated for the first time in 1946, and the last report of a field outbreak caused by a highly virulent strain dates from the year 2000, when 13.6 million birds were slaughtered and 93 farms quarantined (29).

Based on the close phylogenetic relationship between the U.S. 2002–2003 virulent NDV isolates and the Mexican NDV isolates, adequate surveillance for early detection and control of END along the Mexican border is of paramount importance. This manuscript describes the biologic and molecular characterization of virulent NDV circulating in Mexico and an assessment of their phylogenetic associations with other North and Central American viruses.

MATERIALS AND METHODS

Virus isolation. Between 1998 and 2006, swabs and tissue samples from Mexican broilers field cases, and from one dove with Newcastle disease (ND) clinical signs, were processed following standard NDV isolation procedures (2). NDV isolates were initially identified by hemagglutination-inhibition assay using polyclonal anti-NDV chicken serum (5). Positive samples were kept at -80°C until further use.

Biologic pathotyping. The virulence level of each isolate was initially measured by MDT of chicken embryos and by ICPI, as described by Alexander (2). A total of 11 isolates, including the Mexican reference strain Chimalhuacan (7,10), were tested. Information on the viruses is provided in Table 1.

Viral RNA extraction and amplification. NDV-positive allantoic fluid from nine of the Mexican samples was inactivated and transported to the Southeast Poultry Research Laboratory (Athens, GA) for molecular studies using Flinders technology filter paper (FTA[®] cards; Whatman International Ltd., Springfield Mill, U.K.). Fifty microliters of each NDV-positive allantoic fluid sample were added to the matrix in the card. The RNA extraction from the FTA[®] cards was performed as previously explained (23). The 73MXCKN (Chimalhuacan strain) and the virus designated 01MXCKN1 were not included in the molecular study. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification was performed using the QIAGEN one-step RT-PCR kit (QIAGEN, Valencia, CA). Initial amplification targeted a 374-base

pair (bp) region of the F protein, which has commonly been used for phylogenetic analysis of NDV (1), but two additional regions were sequenced to extend our comparison to additional NDV isolates available in GenBank. The homologous regions sequenced were as follows: a 374-bp partial F gene (positions 4554 to 4917); the complete coding region for the F gene (positions 4544 to 6205); and a 642-bp region corresponding to genomic positions 4352 to 4995 of the NDV LaSota vaccine strain complete genome (accession number AF077761) that included partial sequences of the matrix and fusion genes. Primer sets used for the sequencing of the above-described regions were: 4306F-GACCGCTGACCACGAGGTTA, 5005R-AGTCGGGAGGATGTTGGCAGC, 4319F-GAGGTTACCTCYACYAAGCTRGAGA; 5106R-TCATTAACAAAYTGCTGCATCTTCCCWAC, 4957F-GCAGC-TCTGATACAAGCCAACC; 5856 (Anhinga) R-AGCCTCAGGGT-TATTCCGCTTAGGG, 4961F-GCTCTGATACARGCMAAMCAA-A, 5772R-TGCCGATATGATWCCCGGRG, and 5429F-AYYAATAT-GCGYGCCACCTACYTRG. Positions were those of the NDV LaSota complete genome (GenBank accession number AF077761), except where indicated. Amplified products were separated on a 1% agarose gel; the bands were excised and eluted using the QIAquick gel extraction kit (QIAGEN).

Sequence data, nucleotide sequencing, and phylogenetic analysis.

All nucleotide sequencing reactions were performed with fluorescent dideoxynucleotide terminators in an automated ABI sequencer (ABI 3700 automated sequencer; Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). The abbreviation used for the phylogenetic trees assembly, and the sequence accession numbers of the viruses used for comparison and alignments, are summarized in Table 2. Maximum likelihood (ML) phylogenetic analysis with bootstrap values for $n = 100$ replicates was performed using PhyML under the general time reversible model of nucleotide substitutions, ML estimates of base frequencies, estimated transition/transversion ratio, and proportions of invariable sites with four categories of substitution rates (9). Similar topologies were obtained using the neighbor-joining method (data not shown).

RESULTS

Biologic pathotyping. Chicken embryo MDT test results ranged between 39.7 and 61.5 hours. The lowest and highest ICPI values were 1.59 and 1.94, respectively. The summary of the MDT and ICPI results for the Mexican isolates are shown in Table 1. Results show that the ICPI values in the most recent isolates increased an average of 1.89 for viruses isolated during 2004–2006, compared with 1.75 for viruses isolated before 2001. MDT values were shorter for the viruses isolated after 2001 (45.2 hours) when compared with the 1998–2001 average (51.8 hours). These results suggest an evolutionary trend for increased virulence in the Mexican isolates.

Table 2. Abbreviations used for the phylogenetic trees, and sequence accession numbers of the viruses used for comparison and alignments.

| Abbreviation [^] | Species | Location | Accession no. |
|---------------------------|------------|--------------|---------------|
| 32AUCKN | Chicken | Australia | M21881 |
| 33UKHRT | Chicken | U.K. | AY741404 |
| 45USBEA | Beaudette | U.S. | X04719 |
| 46USLAS | Chicken | U.S. | AY845400 |
| 47USB1 | Chicken | U.S. | M24695 |
| 66AUQV4 | Chicken | Australia | AF217084 |
| 67UKULS | Ulster | U.K. | AY562991 |
| 71USMXD | Mixed sp. | U.S. | AY288987 |
| 72USFON | Chicken | U.S. | AY562988 |
| 75IRPGN | Pigeon | Iran | AY928933 |
| 76JPDCK | Duck | Japan | M24705 |
| 84UKPGN | Pigeon | U.K. | AF109885 |
| 84USPGN | Pigeon | U.S. | EF520716 |
| 86USMLD | Mallard | U.S. | EF564832 |
| 89USNOP | N. Pintail | U.S. | EF564826 |
| 90KECKN | Chicken | Kenya | AY288997 |
| 90IDCCT | Cockatoo | Indonesia | AY562985 |
| 91SACKN | Chicken | South Africa | AF532752 |
| 92USTKY | Turkey | U.S. (ND) | AY289001 |
| 93USANH | Anhinga | U.S. (FL) | AY562986 |
| 96MXCKN | Chicken | Mexico | AY288999 |
| 96CNFWL | Fowl | China | AY028995 |
| 96CNPGN | Pigeon | China | DQ417113 |
| 96USPAR1 | Parrot | U.S. (TX) | AY444499 |
| 96USPAR2 | Parrot | U.S. (MO) | AY444498 |
| 96USPAR3 | Parrot | U.S. (OK) | AY444500 |
| 97CNFWL | Fowl | China | AF458015 |
| 97CNGSE | Goose | China | EF540729 |
| 97CNGSE | Goose | China | AF162714 |
| 97ARPGN | Pigeon | Argentina | AY734536 |
| 97CNUNK | Unknown | China | AF400615 |
| 97USPAR | Parrot | U.S. | AY444496 |
| 98CNCKN | Chicken | China | AY338284 |
| 98ARDCK | Duck | Argentina | AY727881 |
| 98CNFWL | Fowl | China | AF364835 |
| 98CNGSE | Goose | China | AF456439 |
| 98USGWT | Teal | U.S. | EF564813 |
| 98BEPGN | Pigeon | Belgium | EF026579 |
| 98CNPGN | Pigeon | China | AF358785 |
| 98MXCKN1 | Chicken | Mexico | AY246042 |
| 98MXCKN2 | Chicken | Mexico | AY246047 |
| 98MXCKN3 | Chicken | Mexico | EU518679 |
| 98MXCKN4 | Chicken | Mexico | EU518680 |
| 99USMLD | Mallard | U.S. | EF565079 |
| 99CNPEN | Penguin | China | DQ080015 |
| 99ARPGN | Pigeon | Argentina | AY734535 |
| 99MXCKN1 | Chicken | Mexico | AY246039 |
| 99MXCKN2 | Chicken | Mexico | AY246048 |
| 99MXCKN3 | Chicken | Mexico | AY246044 |
| 00CNCKN | Chicken | China | DQ067447 |
| 00CNGSE | Goose | China | AF431744 |
| 00HNCKN | Chicken | Honduras | AY288993 |
| 00ITCKN | Chicken | Italy | AY288994 |
| 00HNCKN | Chicken | Honduras | AY288993 |
| 00ITCKN | Chicken | Italy | AY288994 |
| 00ITDVE | Dove | Italy | AY288995 |
| 00CNFWL | Fowl | China | AF458010 |
| 00TWFWL | Fowl | Taiwan | AF358786 |
| 00CNGSE | Goose | China | AF456438 |
| 00CNGSE | Goose | China | AF534997 |
| 00USPGN | Pigeon | U.S. | EU477188 |
| 00USRKN | Red Knot | U.S. | EF564819 |
| 00ARSWN | Swan | Argentina | AY727882 |
| 00MXCKN | Chicken | Mexico | EU518677 |
| 00MXCKN1 | Chicken | Mexico | AY246035 |
| 00MXCKN2 | Chicken | Mexico | AY246037 |

Table 2. Continued.

| Abbreviation ^A | Species | Location | Accession no. |
|---------------------------|-------------|-----------|---------------|
| 00MXCKN3 | Chicken | Mexico | AY246036 |
| 00MXCKN4 | Chicken | Mexico | AY246040 |
| 00MXCKN5 | Cockatoo | Mexico | AY246038 |
| 00MXCKN6 | Chicken | Mexico | AY246046 |
| 00MXCKN7 | Chicken | Mexico | AY246045 |
| 00MXCKN8 | Chicken | Mexico | AY246041 |
| 00MXCKN9 | Chicken | Mexico | AY246043 |
| 00MXCKN10 | Chicken | Mexico | EU518681 |
| 01RUDCK | Duck | Russia | DQ439947 |
| 01USDCK | Duck | U.S. | AY626266 |
| 01CNGSE | Goose | China | AF456442 |
| 01CNGSE | Goose | China | AF456443 |
| 01USMLD | Mallard | U.S. | EF564829 |
| 01USMLD | Mallard | U.S. | EF564830 |
| 01CNPAR | Partridge | China | AY253912 |
| 01USRKN | Red Knot | U.S. | EF564816 |
| 01AUUNK | Unknown | Australia | AY935489 |
| 01MXCKN | Chicken | Mexico | EU518685 |
| 02RUBKT | Baikal Teal | Russia | AY965077 |
| 02CNCKN | Chicken | China | AY427817 |
| 02CNCKN | Chicken | China | AF458021 |
| 02USGFL | Gamefowl | U.S. | AY562987 |
| 02CNGSE | Goose | China | AF473851 |
| 02USMLD | Mallard | U.S. | EF564824 |
| 02USMLD | Mallard | U.S. | EF564825 |
| 02USRDT | Turnstone | U.S. | EF564817 |
| 02CNUNK | Unknown | China | DQ227246 |
| 02USGWL1 | Fowl | U.S. (CA) | EF520718 |
| 02USGWL2 | Fowl | U.S. (CA) | AY562987 |
| 02USPET | Per bird | U.S. (CA) | AY246053 |
| 03CNCKN | Chicken | China | DQ486859 |
| 03USMLD | Mallard | U.S. | EF564828 |
| 03CNUNK | Unknown | China | DQ858357 |
| 03CNUNK | Unknown | China | DQ227251 |
| 03CNUNK | Unknown | China | DQ417111 |
| 03USGWL | Gamefowl | U.S. (TX) | AY438627 |
| 03USCKN1 | Chicken | U.S.(CA) | AY246050 |
| 03USCKN2 | Chicken | U.S. (AZ) | AY246049 |
| 03USCKN3 | Chicken | U.S. (CA) | AY246051 |
| 03USCKN4 | Chicken | U.S. (NV) | AY246052 |
| 03USCKN5 | Chicken | U.S. (CA) | AY468628 |
| 03USDVE | Dove | U.S.(CA) | AY438667 |
| 04USMLD | Mallard | U.S. | EF564821 |
| 04USPGN1 | Pigeon | U.S. | EU477189 |
| 04USPGN2 | Pigeon | U.S. | EU477190 |
| 04USPGN3 | Pigeon | U.S. | EU477191 |
| 04USRDT | Turnstone | U.S. | EF564831 |
| 04MXDVE | Dove | Mexico | EU518682 |
| 04MXCKN | Chicken | Mexico | EU518678 |
| 05CNMLD | Mallard | China | EF592500 |
| 05USPGN | Pigeon | U.S. | EU477192 |
| 05MXCKN | Chicken | Mexico | EU518683 |
| 06CNGSE | Goose | China | EF211814 |
| 06CNGSE | Goose | China | EF579734 |
| 06CNUNK | Unknown | China | DQ858356 |
| 06MXCKN | Chicken | Mexico | EU518684 |
| 07USANH | Anhinga | U.S. (FL) | EF65682 |

^AAbbreviations: the first two digits are the year of isolation, followed by two positions for country of origin, and the last three–five positions for avian species.

Nucleotide sequencing and alignment analysis. To compare the viruses circulating in Mexico with most of the virulent NDV sequences available in the GenBank, three separate analyses were performed using different segments of the genome: the full F protein sequence, a 374-bp region of the F protein, and a 642-bp region

from contiguous segments of matrix and F proteins. The phylogenetic comparison of the complete coding region of the fusion gene, from seven of the Mexican viruses with previously published NDV from genotypes (I to VII), is shown in Fig. 1. The sequencing and assessment of the full F protein provided a robust

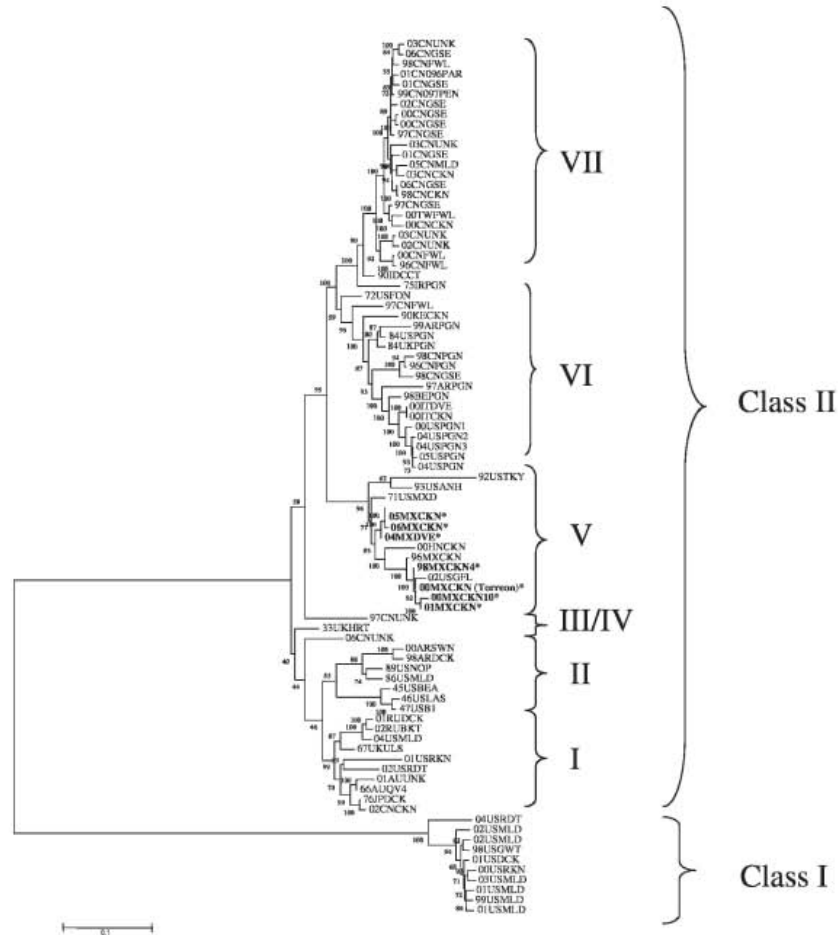


Fig. 1. Phylogenetic comparison of complete coding region of the fusion gene from Mexican viruses with previously published NDV from other known Class II genotypes (I to VII) and Class I viruses as reference. Mexican isolates subjected to analysis are bold and highlighted with an asterisk (*).

and reliable output, indicating that all the viruses isolated in Mexico between 1998 and 2006 grouped with the Class II, genotype V viruses. It also demonstrated the presence of two clearly defined groups of viruses circulating in Mexico, as well as a close relationship between the NDV isolates analyzed and previously reported Mexican and U.S. virus sequences.

The analysis of the 374-bp region of the F protein gene previously used for virulent NDV phylogenetic studies (1) is shown in Fig. 2. Two well-defined groups were observed among the Mexican isolates. Earlier viruses (1998–2001) grouped together with the game fowl isolates from California and with a 1996 chicken-originated Mexican isolate. The more recent viruses (2004–2006) grouped among them, including a dove-originated virus isolated from Mexico City with a very high ICPI value of 1.93 and a MDT of 44.6 hours.

The sequence analysis of a 642-bp region corresponding to positions 4384–4999 of the NDV genome, with partial coverage of the matrix and fusion protein genes, allowed the comparison of six of the Mexican isolates (representatives of the two groups circulating) with several additional sequences from isolates from U.S. and Mexico available in the GenBank (Fig. 3). Viruses from 1998 to 2001 were closely related to several virulent NDV viruses isolated in Mexico during the same time frame, as well as with the viruses isolated from the 2002–2003 California END outbreaks. Meanwhile, the more recent isolates (2004–2006) were more closely related to the Florida 1971 mixed-species (exotic birds) isolate and to a 1997 parrot-originated isolate from the U.S.; no association with other Mexican isolates was observed.

Analysis of the cleavage site region. All the viruses, evaluated by RT-PCR followed with nucleotide sequencing, contained a virulent

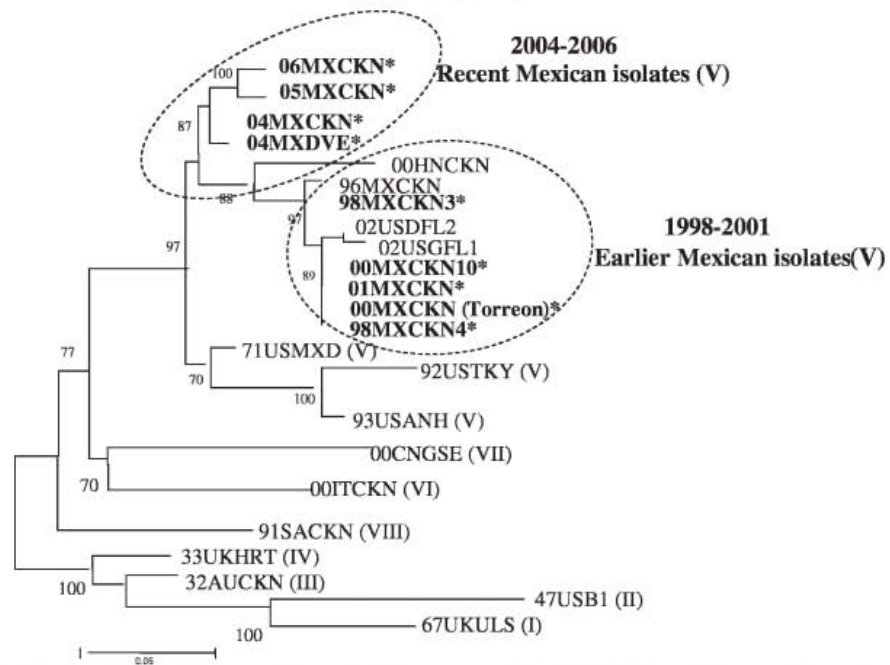


Fig. 2. Maximum likelihood phylogenetic analysis of the 374-bp fusion gene fragment of the Mexican isolates and comparison with previously published Genbank sequences. Viruses representative of genotypes I, II, III, IV, V, VI, VII, and VIII are included for reference (see Table 2 for full description). The new isolates from Mexico that were subjected to analysis are in bold and highlighted with an asterisk (*).

fusion protein cleavage site represented by the motif "GGRRQKRF," which is identical to the cleavage site of the U.S. California isolate, revealing that evolutionary changes of the new isolates occurred at a different site.

DISCUSSION

Traditionally, the pathogenicity of any new NDV isolate has been assessed by biologic methods such as ICPI and MDT (2,4,5). In this trial, the biologic pathotyping of the viruses demonstrated that highly virulent viruses are circulating in Mexico. MDT and ICPI results correlated with severe clinical signs reported in the field cases. NDVs with an ICPI value above 0.7 are considered virulent (30) and, in this study, the ICPI values ranged from 1.59 to 1.94, indicating the presence of a severe threat for the poultry industry. When compared with the viruses isolated between 1998 and 2001, the highest ICPI values were observed in the newly emerging group of viruses (isolates from 2004–2006), suggesting an increase in virulence. Nowadays, molecular methods based on RT-PCR, nucleotide sequencing, and prediction of the amino acid sequence at the fusion protein (F) cleavage site are used to determine the virulence of new isolates and for phylogenetic studies (15,24,25,26,30). Phylogenetic analysis of the Mexican isolates indicated that the viruses belong to the Class II, genotype V viruses. Similar classification has been reported for other virulent NDV isolates from North and Central America (11,22). The phylogenetic

separation of the two groups of viruses analyzed in this study (viruses from 1998–2001 and from 2004–2006), along with the ICPI and MDT results, suggests that some distinct selective pressure in the 1998–2001 viruses may have led to the appearance of the new group. In Mexico, the last report of a major field outbreak caused by a highly virulent strain dates from the year 2000 (29). Extensive vaccination programs were implemented in the affected area and may account for the selective pressure already mentioned. Evolution of NDV, depending on the accumulation of point mutations that induce amino acid substitutions, is a slow process (27). However, immune pressure of the host, induced by vaccination, may contribute to differences in evolutionary rates; selective immune pressure of the host enhanced the NDV evolutionary process in China and Taiwan, which was rapid over the last 30 years compared to that of the previous 40 years (31).

The investigated 1998–2001 isolates showed very high similarities among them (98–99%) and with other Mexican viruses reported between 1996 and 2001; the close genetic similarity also provided evidence for epidemiologic linkage between the Mexican viruses and the California outbreak. These results confirm the fusion gene nucleotide sequence-based phylogenetic relationships between the 1996–2001 Mexican NDVs and the U.S. and Central American viruses reported by Pedersen and coworkers (22). These authors reported that the 2002 California NDV was 98–99% identical to the Mexican isolates of 1998 and 2001. The Torreon isolate from 2000, evaluated here, is 98.9% similar to the 2002 gamefowl isolate from the U.S. (22). When compared with virulent NDV isolated in Mexico

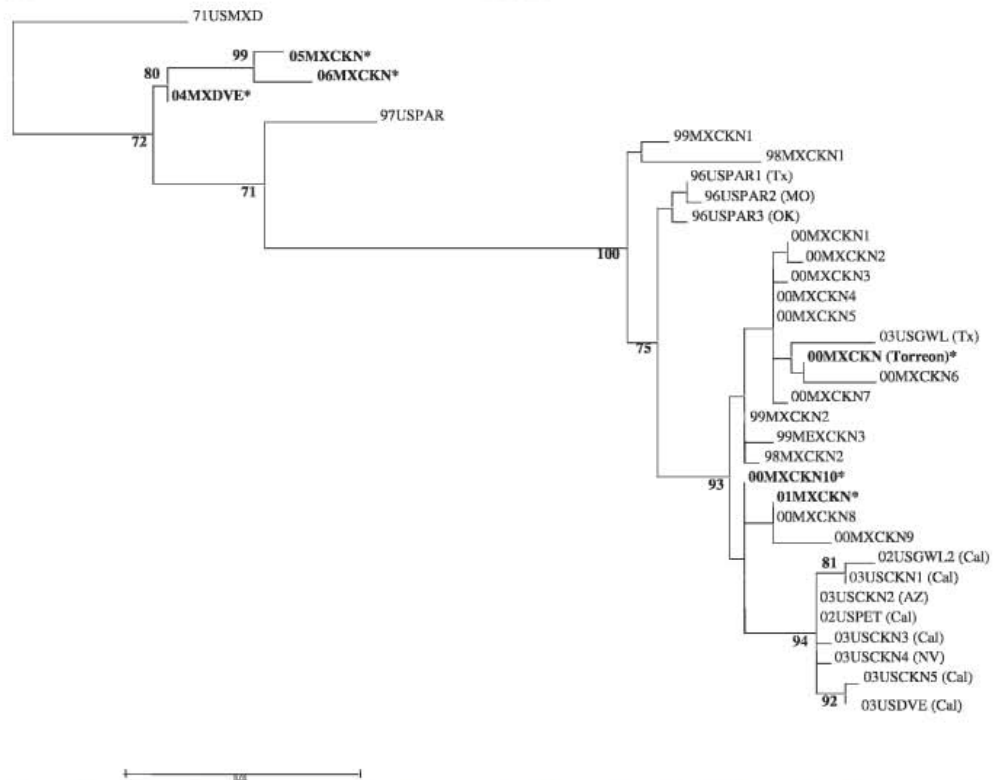


Fig. 3. Phylogenetic analysis of 642 bp from contiguous segments of matrix (M) and F proteins from the Mexican isolates and a comparison with previously published Genbank sequences for reference. Mexican isolates subjected to analysis are bold and highlighted with an asterisk (*).

prior to 2001, the more recent isolates (2004–2006) are phylogenetically distinct; the similarities between the two groups are only 93–94%. These viruses showed increased virulence and have not been reported in the U.S., representing a new threat to the poultry industry.

The phylogenetic analysis of NDV has proven to be a powerful tool for investigating epidemiologic relationships among the NDV isolates present in various parts of the world (1,12,16,24). RT-PCR and direct nucleotide sequencing for molecular pathotyping are not available in some countries or regions, so samples need to be transported in a safe manner, following high standards of biosecurity during shipping to laboratories with appropriate capabilities (18). In this trial, the FTA® cards for NDV sampling and inactivation, coupled with RT-PCR, allowed the molecular detection and phylogenetic analysis of the Mexican isolates, thereby confirming previous reports on the suitability of FTA® cards for NDV nucleic acids sampling and transportation (11,23).

In summary, it was demonstrated that virulent NDV continues to be a problem in Mexico, that all viruses evaluated belong to the class II, genotype V, and that there has been a genetic shift that generated two distinct groups in the Mexican virulent NDV. The close phylogenetic relationship between the recent U.S. 2002–2003 virulent NDV isolates, and those viruses from countries geograph-

ically close, warrants continued surveillance of commercial and noncommercial poultry for early detection of virulent NDV (22). The biologic and molecular characterization of recent NDV Mexico isolates, in collaboration with the Mexican academic and governmental entities, will aid in these surveillance efforts.

REFERENCES

1. Aldous, E. W., J. K. Mynn, J. Banks, and D. J. Alexander. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol.* 32:239–256. 2003.
2. Alexander, D. J. Newcastle disease and other avian Paramyxovirus. In: *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*, 4th ed. D. Swayne, J. R. Glisson, M. W. Jackwood, J. E. Pearson, and W. M. Reed, eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. pp. 156–163. 1998.
3. Alexander, D. J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev. Sci. Tech.* 19:443–462. 2000.
4. Alexander, D. J. Gordon Memorial Lecture. Newcastle disease. *Br. Poult. Sci.* 42:5–22. 2001.
5. Alexander, D. J. Newcastle disease and other Paramyxoviridae infections. In: *Diseases of poultry*, 11th ed. Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R.

- Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, and D. E. Swayne, eds. Iowa State Press, Ames, IA, pp. 63–87. 2003.
6. Alexander, D. J., H. T. Morris, W. J. Pollitt, C. E. Sharpe, R. L. Eckford, R. M. Sainsbury, L. M. Mansley, R. E. Gough, and G. Parsons. Newcastle disease outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997. *Vet. Rec.* 143:209–212. 1998.
 7. Alfaro, J. C., V. M. Petrone, T. Fehervari, G. Nava, M. Kogut, D. Nshet, and G. Tellez. Resistance to velogenic Newcastle disease virus in leghorn chickens by use of prophylactic lymphokines. *Avian Dis.* 46:525–534. 2002.
 8. Czegledi, A., D. Ujvari, E. Somogyi, E. Wehmann, O. Werner, and B. Lomnici. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res.* 120:36–48. 2006.
 9. Guindon, S., F. Lethiec, P. Duroux, and O. Gascuel. PhyML online: a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res.* 33:557–559. 2005.
 10. Juarez, M., V. Petrone, and T. Fehervari. Caracterización biológica de cuatro cepas velogénicas y una lentogénica del virus de la enfermedad de Newcastle. In: Proceedings of the 51st Western Poultry Disease Conference, Puerto Vallarta, Mexico, pp. 79–81. 2002.
 11. Kim, L. M., D. J. King, P. E. Curry, D. L. Suarez, D. E. Swayne, D. E. Stallknecht, R. D. Slemons, J. C. Pedersen, D. A. Senne, K. Winker, and C. L. Afonso. Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. *J. Virol.* 81:12641–12653. 2007.
 12. Kim, L. M., D. J. King, D. L. Suarez, C. W. Wong, and C. L. Afonso. Characterization of class I Newcastle disease virus isolates from Hong Kong live bird markets and detection using real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 45:1310–1314. 2007.
 13. King, D. J. Influence of chicken breed on pathogenicity evaluation of velogenic neurotropic Newcastle disease virus isolates from comorants and turkeys. *Avian Dis.* 40:210–217. 1996.
 14. King, D. J., and B. S. Seal. Biological and molecular characterization of Newcastle disease virus (NDV) field isolates with comparisons to reference NDV strains. *Avian Dis.* 42:507–516. 1998.
 15. Marin, M. C., P. Villegas, J. D. Bennett, and B. S. Seal. Virus characterization and sequence of the fusion protein gene cleavage site of recent Newcastle disease virus field isolates from the southeastern United States and Puerto Rico. *Avian Dis.* 40:382–390. 1996.
 16. Mase, M., K. Imai, Y. Sanada, N. Sanada, N. Yuasa, T. Imada, K. Tsukamoto, and S. Yamaguchi. Phylogenetic analysis of Newcastle disease virus genotypes isolated in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 40:3826–3830. 2002.
 17. Mayo, M. A. Virus taxonomy—Houston 2002. *Arch. Virol.* 147:1071–1076. 2002.
 18. Moscoso, H., E. O. Raybon, S. G. Thayer, and C. L. Hofacre. Molecular detection and serotyping of infectious bronchitis virus from FTA filter paper. *Avian Dis.* 49:24–29. 2005.
 19. Nolen, R. S. Exotic Newcastle disease strikes game birds in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221:1369–1370. 2002.
 20. Nolen, R. S. Emergency declared: exotic Newcastle disease found in commercial poultry farms. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222:411. 2003.
 21. Panda, A., Z. Huang, S. Elankumaran, D. D. Rockemann, and S. K. Samal. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microb. Pathog.* 36:1–10. 2004.
 22. Pedersen, J. C., D. A. Senne, P. R. Woolcock, H. Kinde, D. J. King, M. G. Wise, B. Panigrahy, and B. S. Seal. Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002–2003 outbreaks in California and other recent outbreaks in North America. *J. Clin. Microbiol.* 42:2329–2334. 2004.
 23. Perozo, F., P. Villegas, C. Estevez, I. Alvarado, and L. B. Purvis. Use of FTA filter paper for the molecular detection of Newcastle disease virus. *Avian Path.* 35:93–98. 2006.
 24. Seal, B. S. Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates: phylogenetic relationships among the Paramyxovirinae based on attachment glycoprotein sequences. *Funct. Integr. Genomics.* 4:246–257. 2004.
 25. Seal, B. S., D. J. King, and J. D. Bennett. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *J. Clin. Microbiol.* 33:2624–2630. 1995.
 26. Seal, B. S., M. G. Wise, J. C. Pedersen, D. A. Senne, R. Alvarez, M. S. Scott, D. J. King, Q. Yu, and D. R. Kapczynski. Genomic sequences of low-virulence avian paramyxovirus-1 (Newcastle disease virus) isolates obtained from live-bird markets in North America not related to commonly utilized commercial vaccine strains. *Vet. Microbiol.* 106:7–16. 2005.
 27. Toyoda, T., T. Sakaguchi, H. Hirota, B. Gotoh, K. Kuma, T. Miyata, and Y. Nagai. Newcastle disease virus evolution. II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains. *Virology* 169:273–282. 1989.
 28. Villegas, P. Viral diseases of the respiratory system. *Poult. Sci.* 77:1143–1145. 1998.
 29. World Organisation for Animal Health (OIE), *Handistatus II. International animal health code*, Paris. In: OIE Epizootics. 2003.
 30. World Organisation for Animal Health (OIE), Newcastle disease. In: OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.1.15. World Organisation for Animal Health, ed., Paris, France. 2006.
 31. Yu, L., Z. Wang, Y. Jiang, L. Chang, and J. Kwang. Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 39:3512–3519. 2001.
 32. Zeng, J., P. Fournier, and V. Schirmacher. High cell surface expression of Newcastle disease virus proteins via replicon vectors demonstrates syncytia forming activity of F and fusion promotion activity of HN molecules. *Int. J. Oncol.* 25:293–302. 2004.

ACKNOWLEDGMENTS

We want to acknowledge the excellent technical support provided by Dawn Williams-Coplin and financial support from the USDA, CRIS number 6612-32000-049.

Characterization of Newcastle disease viruses isolated from chicken, gamefowl, pigeon and quail in Mexico

Ruben Merino · Hilda Villegas · Jose A. Quintana · Norma Calderon

Accepted: 7 September 2009
© Springer Science + Business Media B.V. 2009

Abstract Velogenic Newcastle disease has threatened the Mexican poultry industry since 1946. Seven strains of velogenic Newcastle disease virus were isolated from poultry and other avian species in central and northern Mexico from 1998 to 2006 and subjected to phylogenetic analysis and biological characterization using standard pathogenicity tests and challenge studies. Phylogenetic analysis showed that all velogenic strains belonged to genetic group V and are clearly divided in two lineages, since phylogenetic similarities between groups are of only 93–94%. Isolates from 1998 to 2001 are closely related to the strain responsible for the 2000 year outbreak raised in La Laguna region (Torreon strain), and are phylogenetically distinct from viruses isolated between 2004 and 2006 that are genetically related to the Chimalhuacan strain isolated in 1973. All the viruses of both, the Chimalhuacan and the Torreon groups, contained a virulent fusion protein cleavage site represented by the motif “GGRRQKRF”, revealing that evolutionary changes occurred at a different site. Chicken embryo mean death time value was shorter for the Chimalhuacan-like viruses (43.9 hours), when compared with the 1998–2001 average (54.3 hours). ICPI average value was higher (1.92) for viruses isolated during 2004–2006 than that for viruses isolated before 2001 (1.74). Microscopic evaluation of bursa of Fabricius and thymus of 5w-o broiler chickens challenged with 10^6 LD₅₀/0.2 ml showed that Chimalhuacan-like isolate caused more severe lesions at 48 hpi in bursa and 72 and 96 hpi in thymus than Torreon-like isolate. Along with the MDT, ICPI and microscopic results, our findings suggest that some distinct selective pressure on the very virulent Chimalhuacan strain isolated in early 1970's may have led to the appearance of the still velogenic but less virulent new group (Torreon-like) in the middle of 1990's.

Keywords Velogenic Newcastle disease virus · Avian species · Characterization · Mexico

R. Merino (✉) · J. A. Quintana · N. Calderon
Departamento de Produccion Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad Nacional Autonoma de Mexico, 04510 Mexico City, DF, Mexico
e-mail: onirem@unam.mx

H. Villegas
Departamento de Morfologia Celular y Molecular, Instituto Nacional de Rehabilitación,
14389 Mexico City, DF, Mexico

Abbreviations

| | |
|--------|---|
| AAF | amnioallantoic fluid |
| LD50 | lethal dose 50% of eggs |
| HA | haemagglutination |
| HI | haemagglutination inhibition |
| hpi | hours post inoculation |
| ICPI | intracerebral pathogenicity index |
| MDT | mean death time |
| vND | velogenic Newcastle disease |
| NDV | Newcastle disease virus |
| vNDV | velogenic Newcastle disease virus |
| RT PCR | Reverse transcription-polymerase chain reaction |

Introduction

Velogenic Newcastle disease was first reported in Mexico by Bankowski and Velazquez in 1946, the virus came to the country with one day old chicks imported from USA. In 1950–51 there was an epizooty caused by infected birds imported from England. Another epizooty in 1970 was originated by parakeets imported from South America (Marquez 1978). In the 1970's and 1980's, vND was recognized as an endemic disease difficult to control and that prevention is possible avoiding the contact between poultry flocks and virulent field virus, by using the right vaccination program as complement of a very strict biosecurity program. In early 1990's the Government, poultry producers and veterinarians specialists in poultry started a Campaign against vND, first in parents and grand parents poultry flocks and later extended to laying hens, broiler chickens, game fowl, singing and pet birds. In 1995 was published the National Campaign against vND (Mexican Official Norm NOM-013-ZOO-1994), which at present day has achieved to declare as vND free to 30 from 32 States. Last major vND outbreak was diagnosed in Northern Mexico in 2000 in an area previously declared as vND free (La Laguna region). In total, 93 farms were affected, including broilers, backyard and one ostrich farm. Several vaccines, consisting of live lentogenic and killed oil emulsified viruses, are used to protect poultry against the disease and have reduced the number of outbreaks. Nevertheless, the disease continues to be reported, mainly in backyard flocks and game fowl. This paper describes the genetic and pathogenic characterization of seven NDV isolated from different avian species during the 1998–2006 period and the reference strain named Chimalhuacan originally isolated in 1973 (Antillón 1978).

Materials and methods

Virus isolation Viruses were isolated in Mexico from chicken, gamefowl, quail and pigeon. Identification of isolates includes avian specie, and year of isolation: chicken1973 (Mexican standard challenge strain Chimalhuacan), chicken1998, chicken2000 (Torreon strain isolated in the outbreak of 2000 from La Laguna region), gamefowl2000, gamefowl2001, pigeon2004, chicken2005, quail2006. Virus isolation was done in 9-11-day-old embryonated hens' eggs as described by Alexander and Senne (2008).

Identification of virus Amnioallantoic fluid (AAF) harvested from embryos that died more than 24 h after inoculation, was tested for haemagglutination (HA) activity with 1% chicken

red blood cells. Identification was carried out by inhibiting the HA activity of AAF with NDV specific antiserum in a haemagglutination inhibition (HI) test (Alexander and Senne 2008).

Pathogenicity tests

Fresh, bacteria-free AAF, was used for these tests. The mean death time (MDT) of 9-day-old embryonated hens' eggs, and intracerebral pathogenicity index (ICPI) in specific pathogens free day-old chicks were assessed as described by Alexander and Senne (2008).

Molecular tests

Infective allantoic fluids from different isolates were harvested and used as a stock for sequence analysis. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT PCR) amplification was performed using the QIAGEN one-step RT-PCR kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Amplification of all isolates, targeting the positions 4554 to 4917 of the F protein was done using the primers described by Aldous et al. (2003), the forward primer was 4306F-GACCGCTGACCACGAGGTTA, meanwhile the reverse primer was 5005R-AGTCGGAGGATGTTGGCAGC. Positions were those of the NDV LaSota complete genome (Genbank accession number AF077761). The cycling parameters were: 50°C for 30 min, and 40 cycles of 94°C for 15 s, 56°C for 30 s, and 68°C for 1 m, followed by 68°C for 5 min. The RT PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and the bands excised and eluted using the QIAquick gel extraction kit (QIAGEN Valencia, CA, USA).

Sequence data, nucleotide sequencing and phylogenetic analysis. The F gene products were sequenced and compared with other NDV sequences in GenBank. Phylogenetic trees were constructed for comparing nucleotide sequences of the F gene fragments. The sequence of the reference strains were obtained from Gen-Bank and the accession numbers are given in Table 1. Maximum likelihood (ML) phylogenetic analysis with bootstrap values for $n=100$ replicates was performed using Phym1 under the general time reversible (GTR) model of nucleotide substitutions, ML estimates of base frequencies, estimated transition/transversion ratio and proportions of invariable sites with 4 categories of substitution rates (Guindon et al. 2005).

Challenge study for effect of vNDV on primary lymphoid organs

Challenge test was designed to study the virulence of selected strains of NDV on primary lymphoid organs of nonimmune reared mixed broiler chickens. Twenty one chickens were inoculated intranasally at 5-w-o with 10^6 ELD₅₀/0.2 ml of Newcastle disease velogenic viruses selected on the basis of phylogenetic analysis, vaccine strain LaSota was used as lentogenic control. Three chickens per virus strain were left unchallenged as negative control. Absence of NDV antibodies was confirmed by HI test. Chickens were observed for 4 days after challenge for clinical signs. Groups of three birds were humanely sacrificed at 12 hours intervals from 24 to 96 hours post inoculation (hpi) and the bursa, and thymus prepared for light microscopy. Unchallenged control chickens were sacrificed at 96 hpi. Samples were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin and sectioned with a rotary microtome at 3 μ . Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and examined microscopically. Lesions score was determined according the scale used by

Table 1 Characteristics of isolates of Newcastle disease virus from Mexico

| Virus identification (avian specie, year of isolation) | MDT | ICPI | aaS 112–117 | Remarks | Reference Strain (GenBank accession number) |
|---|------|------|-------------|-----------|--|
| Chicken1973 ^a | 39.7 | 1.89 | RRQKRF | Velogenic | Largo71 (AY288987) |
| Chicken1998 | 45.2 | 1.88 | RRQKRF | Velogenic | GamefowlUS02 (AY562987) |
| Chicken2000 ^b | 59.7 | 1.64 | RRQKRF | Velogenic | GamefowlUS02 |
| Gamefowl2000 | 50.3 | 1.83 | RRQKRF | Velogenic | GamefowlUS02 |
| Gamefowl2001 | 62.0 | 1.59 | RRQKRF | Velogenic | GamefowlUS02 |
| Pigeon2004 | 44.6 | 1.93 | RRQKRF | Velogenic | Largo71 |
| Chicken2005 | 44.3 | 1.91 | RRQKRF | Velogenic | Largo71 |
| Quail2006 | 47.0 | 1.94 | RRQKRF | Velogenic | Largo71 |

MDT Chicken embryo mean death time, ICPI Intra-cerebral pathogenicity index, aaS Amino acid sequence of Fusion protein cleavage site

^a Mexican Standard challenge strain Chimalhuacan

^b Torreon strain responsible for the 2000 major outbreak

Henry et al. (1980), with the addition of score 5, total loss of follicle structure and marked fibroplasias for the bursa, and severe atrophy of thymus cortex as score 4. Lesions score was compared by Kruskal-Wallis and multiple comparison method of Dunn.

Results

Virus isolation, identification and characterization

Inoculated embryos died between 39.7 h and 62 h after inoculation, as shown in Table I. The harvested, fresh AAF showed HA activity with chicken erythrocytes and was inhibited by a known NDV specific antiserum. The MDT and ICPI values obtained in pathogenicity tests for each isolate, as well as the motif of the fusion protein cleavage site sequence, are shown in Table I. Chicken embryo mean death time values were shorter for Chimalhuacan strain and the viruses isolated after 2001 (43.9 hours), when compared with the 1998–2001 average (54.3 hours). ICPI average value was higher (1.92) for viruses isolated in 1973 and during 2004–2006 than that for viruses isolated between 1998 and 2001 (1.74).

Phylogenetic analysis showed that all velogenic strains belong to genetic group V and are clearly divided in two lineages, since phylogenetic similarities between groups are of only 93–94%. Isolates from 1998 to 2001 are closely related to the strain responsible for the outbreak raised in La Laguna region (Torreon strain) in 2000, which is strongly related to GamefowlUS02 virus isolated during the 2002–03 outbreak in Southwest USA, and are phylogenetically distinct from viruses isolated between 2004 and 2006 that are genetically related to the Chimalhuacan strain isolated in 1973, which at the same time is genetically related to strain Largo71 isolated in Florida, USA in 1971. All the viruses of both, the Chimalhuacan and the Torreon groups, contained a virulent fusion protein cleavage site represented by the motif “GGRRQKRF” (Table 1).

Table 2 shows the major clinical signs observed at 96 hpi in chickens inoculated with virulent Chicken2000 and Quail2006 Mexican NDV strains and LaSota vaccine strain. Quail2006 strain caused more severe signs than Chicken2000 strain. LaSota strain caused only slight periocular edema.

Table 2 Intensity of major clinical signs caused at 96 hpi in chickens inoculated with velogenic NDV or LaSota strain

| Virus strain | Listlessness | Ruffled feathers | Prostration | Periocular edema | Green diarrhea |
|--------------|--------------|------------------|-------------|------------------|----------------|
| Chicken2000 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Quail2006 | ++ | ++ | + | ++ | - |
| LaSota | - | - | - | + | - |

- Absent; + Slight; ++ Mild; +++ Severe

Evaluation of lesions score of thymus and bursa of Fabricius from chickens inoculated with 106LD50/0.2 ml of NDV is shown in Table 3. The most severe lesions ($P < 0.05$) in thymus was caused by Quail2006 strain at 72 and 96 hpi, meanwhile Chicken2000 caused the most severe lesions at 84 hpi. In bursa of Fabricius, the highest lesion score was caused by Quail2006 strain at 48 hpi. Both, Quail2006 and Chicken2000 caused complete follicular destruction of bursa at 96 hpi.

Discussion

Velogenic Newcastle disease was first reported in Mexico in 1946. Despite of the fact that a number of Mexican States have been able to eradicate vND on the basis of the National Eradication Program (Norma Oficial Mexicana NOM-013-ZOO-1994), it remains endemic in some areas of the country. The Chimalhuacan strain was isolated in 1973 showing very high virulence for broiler chickens, reason why it is used as a contemporary standard challenge strain (Norma Oficial Mexicana NOM-052-ZOO-1995).

In order to study the character of the velogenic viruses that cause sporadic outbreaks in poultry, gamefowl and other avian species from Mexico, seven isolates were obtained in the period 1998–2006 from different sources on which the animals showed typical signs of velogenic ND. All isolates were confirmed as NDV (PMV-1) based on the HA and HI tests. All viruses, except for the Gamefowl2001 strain, had MDT values of less than 60 h, and ICPI values of more than 1.5, confirming them as velogenic NDVs (Alexander and Senne 2008; OIE 2008). Nowadays, virulence of NDV isolates can be predicted by the analysis of the amino acid sequence of the fusion protein cleavage site (Seal et al. 1995; Aldous et al. 2003; Panda et al. 2004). The RT-PCR and sequencing tests also identified all strains as

Table 3 Evaluation of lesions in thymus (T) and bursa of Fabricius (BF) of chickens challenged at 5-w-o with 10^6 LD₅₀/0.2 ml of different NDV strains

| Virus strain | Hours post-inoculation | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-----|-----|-------------------|-----|-------------------|-----|-------------------|------------------|
| | 24 | | 36 | | 48 | | 60 | | 72 | | 84 | | 96 | |
| | T | BF | T | BF | T | BF | T | BF | T | BF | T | BF | T | BF |
| Quail2006 | 1.7 | 2.0 | 2.7 | 2.0 | 2.0 | 3.3 _b | 2.7 | 2.7 | 3.0 _b | 2.7 | 2.7 _{ab} | 3.3 | 3.7 _b | 5.0 _b |
| Chicken2000 | 1.0 | 2.3 | 1.3 | 3.0 | 2.0 | 3.0 _{ab} | 2.7 | 2.3 | 2.7 _{ab} | 3.7 | 3.3 _b | 3.7 | 3.3 _{ab} | 5.0 _b |
| LaSota | 1.0 | 2.0 | 1.3 | 1.7 | 2.0 | 2.3 _a | 1.7 | 2.3 | 1.7 _a | 3.0 | 1.7 _a | 2.3 | 1.3 _a | 2.3 _a |

Different subscript in the same column denotes statistical significance, $P < 0.05$

velogenic, based on the motif “RRQKRF” of the fusion protein cleavage site, which is characteristic of virulent strains (Alexander and Senne 2008). Phylogenetic analysis of the Mexican isolates classify the viruses as belonging to the Class II, genotype V, which agrees with that reported for other virulent NDV isolates from North and Central America (Pedersen et al. 2004).

In this study we found the phylogenetic separation of velogenic NDV belonging to genotype V into two lineages: viruses from 1998–2001 and from 2004–2006, since the similarities between both groups are of only 93–94%. Our findings suggest that some distinct selective pressure on the Chimalhuacan strain (Chicken1973, Largo71-like strain) isolated in early 1970’s could allow the emergence of the group GamefowlUS02-like (Torreon strain). The evaluated 1998–2001 isolates showed very high similarities among them (98–99%) and with other Mexican viruses reported between 1996 and 2001 (Seal et al. 1998, 2002; Locke et al. 2000; Pedersen et al. 2004; Seal 2004) which indicates that the so called Torreon strain is circulating in Mexico since the middle of the 1990’s. The Torreon isolate from 2000 evaluated here is 98.9% similar to the GamefowlUS02, this result matches with the report of Pedersen et al. (2004) who established that the 2002 California NDV was 98–99% identical to other Mexican isolates from 1998 and 2001.

It is well known that evolution of NDV, depending on the accumulation of amino acid substitutions due to point mutations, is a slow process (Toyoda et al. 1989). However, immune pressure of the host induced by vaccination may accelerate the evolutionary rate; as founded in China and Taiwan, which was rapid over the last 30 years compared to that of the previous 40 years (Yu et al. 2001). The motif GGRRQKRF founded in the fusion protein cleavage site of all viruses in our study reveals that evolutionary changes on Chimalhuacan strain that led to the arise of Torreon strain occurred at a different site. To isolate viruses closely related to the old Chimalhuacan strain is not estrange, since viruses with specific genetic characteristics do not necessarily are replaced by the other arising variants and may continue to be isolated many years after their first appearance (Lomniczi et al. 1998).

In our study, the standard Mexican challenge strain Chimalhuacan (Chicken1973) had the lowest MDT value (39.7 h). The MDT mean value (43.9 h) of strains Chicken1973, Pigeon2004, Chicken2005 and Quail2006 was shorter ($P < 0.05$) than that from isolates made between 1998 and 2001 (mean of 54.3 h). In this trial, the mean ICPI value (1.92) of virus Chicken1973 and isolates from 2004 to 2006 was higher ($P < 0.05$) than that from viruses isolated from 1998 to 2001 (1.74), indicating difference in virulence between both groups. Lesions caused by Chimalhuacan-like strain on primary lymphoid organs of inoculated broiler chickens were slightly more severe than those caused by Chicken2000 (Torreon) strain. Comparatively, mean ICPI value of several isolates from China belonging to genotypes VIIa and VIII were 1.7 and 1.81, respectively (Liang et al. 2002). This suggests that differences in virulence measured by ICPI can be found among genotypes and lineages in the same genotype. Microscopic lesions in thymus and bursa of Fabricius, caused by Chicken2000 strain were similar to those reported by Wakamatsu et al. (2006) for the Chicken CA/S0212676 strain whose most significant finding were severe lymphoid depletion along with lymphocellular necrosis and apoptosis. Lymphoid depletion was first observed in the bursa 2 dpi. From 3 dpi, lymphoid organs had moderate to severe lymphoid depletion with multifocal necrosis, progressing to diffuse areas of necrosis.

In Mexico, the last major field outbreak was caused by the virulent strain Chicken2000 (Torreon) in the year 2000 in the region known as La Laguna, one of the most productive agriculture areas in the northwest of Mexico, that outbreak caused important economic losses in 93 farms because its control implied the slaughter of 13.6 million birds. Along

with the MDT, ICPI and challenge results, our findings suggest that some distinct selective pressure on the Chimalhuacan strain isolated in early 1970's may have led to the appearance of the less virulent, but still velogenic, new group (Torreon-like) in the middle of 1990's. According with the MDT and ICPI values obtained in this study, 59.7 h and 1.64 respectively, the Torreon strain was one of the less virulent from the highly virulent evaluated strains. Similar ICPI results were reported by Seal et al. (1998), 1.75, and Pedersen et al. (2004), 1.67 for Mexican isolates from 1996 and 2000, respectively, which are phylogenetically related to Torreon strain.

Finally, it is interesting to find that Chimalhuacan-like strain if NDV is capable to induce velogenic ND in pigeons, since the infection is commonly identified as mesogenic. The ICPI of Pigeon2004 strain is higher than that reported by Kim et al. (2008) for 15 US pigeon isolates (0.98–1.35).

In summary, phylogenetic test showed that velogenic Newcastle disease virus isolated in Mexico belongs to genotype V, and is affecting chickens and gamefowl as well as other avian species as pigeon and quail. The highly virulent ancient strain Chimalhuacan gave origin to Torreon lineage, which is a little less virulent, according to MDT, ICPI and challenge tests.

Acknowledgements We want to acknowledge the support provided by Dr. Pedro Villegas and PhD Francisco Perozo, from the Poultry Disease and Research Center, University of Georgia, and PhD Claudio Afonso from the Southeast Poultry Research Laboratory, as well as financial support from the PFAMU PI200606 budget.

References

- Aldous EW, Mynn JK, Banks J and Alexander DJ (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 Pathol.* 32:239–256.
- Alexander DJ, Senne DA (2008) Newcastle disease virus and other paramyxoviruses. In: Dufour-Zavala, Swayne DE, Glisson JR, Pearson JE, Reed WM, Jackwood MW, and Woolcock PR, editors. *A laboratory manual for the isolation identification and characterization of avian pathogens*. Fifth edition. OmniPress, Inc. Madison, Wisconsin: American Association of Avian Pathologists, pp 135–141.
- Alexander DJ and Senne DA (2008) Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Saif YM, editor. *Diseases of Poultry*, 12th Edition. Blackwell Publishing, pp 75–100.
- Antillón A (1978) Observaciones patológicas e inmunológicas de un aislamiento viscerotrópico de la enfermedad de Newcastle en México. *Memorias del IV Cielo Internacional de Conferencias sobre Avicultura*. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, México DF, pp 52–59.
- Guindon S, Lethiec F, Duroux P and Gascuel O (2005). PHYML Online a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res.* 33:557–559.
- Henry C, Brewer R, Edgar S, Gray B (1980). Studies on Infectious Bursal Disease in Chickens. 2. Scoring Microscopic Lesions in the Bursa of Fabricius, Thymus, Spleen, and Kidney in Gnotobiotic and Battery Reared White Leghorns Experimentally Infected with Infectious Bursal Disease Virus. *Poult. Sci.*, 59:1006–1017.
- Kim LM, King DJ, Guzman H, Tesh RB, Travassos AP, Bueno R, Dennett JA, Afonso CL (2008). Biological and Phylogenetic Characterization of Pigeon Paramyxovirus Serotype 1 Circulating in Wild North American Pigeons and Doves. *J Clin Microbiol.* 46(10): 3303–3310
- Liang R, Cao DJ, Li JQ, Chen J, Guo X, Zhuang FF, Duan MX (2002). Newcastle disease outbreaks in western China were caused by the genotypes VIIa and VIII. *Vet. Microb.* 87:193–203.
- Locke DP, Sellers HS, Crawford JM, Shultz-Cherry S, King DJ, Meinersmann DJ, Seal BS. (2000) Newcastle disease virus phosphoprotein gene analysis and transcriptional editing in avian cells. *Virus Res.*, 69:55–68.

- Lomniczi B, Wehmann E, Herczeg J, Ballagi-Pordány A, Kaleta EF, Werner O, Meulemans G, Jorgensen PH, Manté AP, Gielkens AL, Capua I, 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(1):49–64.
- Márquez MA (1978) Historia de la enfermedad de Newcastle en México. *Memorias de la III Convención Nacional ANECA*. Mazatlán, Sinaloa, México. Abril 5–8, pp 1–18.
- Norma Oficial Mexicana NOM-013-ZOO-1994, Campaña nacional contra la enfermedad de Newcastle presentación velogénica. México (DF): 7 de Febrero de 1995.
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las vacunas empleadas en la prevención y control de la enfermedad de Newcastle. México (DF): 24 de Abril de 1997
- OIE, World Organisation for Animal Health (2008). Newcastle Disease. In: *Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals 6th Edition*. World Organisation for Animal Health Available in: URL http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf. Accessed 14 April 2009.
- Panda A, Huang Z, Elankumaran S, Rockemann DD and Samal SK (2004) Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microb. Pathog.* 36:1–10.
- Pedersen JC, Senne DA, Woolcock PR, Kinde H, King DJ, Wise MG, Panigrahy B and Seal BS. (2004) Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002–2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. *J Clin. Microb.* 42:2329–2334.
- Seal BS (2004) Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates. Phylogenetic relationships among the Paramyxovirinae based on attachment glycoprotein sequences. *Funct Integr Genomics*, 4: 246–257.
- Seal BS, King DJ, Bennett JD (1995) Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *J. Clin. Microb.* 33:2624–2630.
- Seal BS, King DJ, Locke DP, Senne DA, Jackwood MW (1998) Phylogenetic Relationships among Highly Virulent Newcastle Disease Virus Isolates Obtained from Exotic Birds and Poultry from 1989 to 1996. *J Clin. Microb.* 36 (4): 1141–1145.
- Seal BS, Crawford JM, Sellers HS, Locke DP, King DJ (2002) Nucleotide sequence analysis of the Newcastle disease virus nucleocapsid protein gene and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Virus Res.* 83: 119–129.
- Toyoda T, Sakaguchi T, Hirota H, Gotoh B, Kuma K, Miyata T and Nagai Y (1989) Newcastle disease virus evolution. II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains. *Virol.* 169:273–282.
- Wakamatsu N, King DJ, Kapeczynski DR, Seal BS, Brown CC (2006) Experimental Pathogenesis for Chickens, Turkeys, and Pigeons of Exotic Newcastle Disease Virus from an Outbreak in California during 2002–2003. *Vet. Pathol.* 43:925–933.
- Yu L, Wang Z, Jiang Y, Chang L, and Kwang J (2001) Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan. *J. Clin. Microb.* 39:3512–3519.