

Artículo de investigación

Caracterización molecular y filogenética de cepas del virus de la enfermedad de Newcastle, aislado de zonas rurales del sur del Ecuador.

Molecular and phylogenetic characterization of newcastle disease virus strains, isolated from rural areas of Southern Ecuador

Willan Muñoz-Chamba^{1,2*}
Gustavo Villacís Rivas³

1. Universidad Estatal de Guayaquil, Facultad de Ciencias Médicas, Campus Norte: "Salvador Allende", Malecón del Salado entre Av. Delta y Av. Kennedy. Guayaquil, Ecuador.

2. Centro de Biotecnología, Universidad Nacional de Loja, Ciudadela Guillermo Falconi, sector La Argelia- PBX 072547252 – Casilla Letra "S". Loja, Ecuador.

3. Carrera de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Loja. Ciudadela Guillermo Falconi, sector La Argelia. Loja, Ecuador.

* Autor para correspondencia: wamunoz24@gmail.com

RECIBIDO: 28/03/2017

APROBADO: 10/07/2017

RESUMEN

El virus de la enfermedad de Newcastle es un paramyxovirus aviar altamente contagioso y el principal agente devastador de aves de corral, causando pérdidas económicas en la industria avícola alrededor del mundo. En esta investigación se caracterizaron molecularmente ocho secuencias parciales del gen de la proteína de Fusión y tres secuencias completas del gen de la proteína hemaglutinina-neuraminidasa de aislados del virus presentes en gallinas criollas en la región sur del Ecuador en el año 2014 de aves de traspatio no vacunadas. Dichas secuencias se compararon con otras secuencias de virus de la enfermedad Newcastle, representando diferentes genotipos del virus y subgenotipos

ABSTRACT

Newcastle disease virus is a highly contagious avian paramyxovirus and the main devastating poultry agent, causing high economic losses in the poultry industry around the world. In the present study, we characterized molecularly 8 partial gene sequences of the fusion protein and 3 complete sequences of the haemagglutinin-neuraminidase from isolated virus present in native poultry unvaccinated in the Southern Ecuador in 2014. These sequences were compared with other sequences of virus, representing different genotypes and sub-genotypes of virus from different regions of the world. All viruses showed the amino acid sequence 112GRQGRL117 in C-terminus extension

desde diferentes regiones del mundo. Todos los virus mostraron la secuencia de aminoácidos 112GRQGR-L117 en el extremo terminal C de la proteína F2 y mostraron Leucina en el extremo terminal N de la proteína F1. Estas secuencias nos permitieron determinar que estos virus pertenecían a un tipo de virus lentogénico. El análisis filogenético de la región parcial del gen F y proteína HN demostró que la mayoría de los virus aislados en esta región del Ecuador estaban estrechamente relacionados con cepas del genotipo II de la clase II, consistente con la secuencia de vacunas de virus vivos lentogénicos, La Sota y B1. La caracterización molecular y el estudio filogenético de los genes de la proteína F y HN podrían usarse confiablemente como una herramienta de vigilancia y detección temprana del virus de la enfermedad de Newcastle, así como predecir los diferentes patotipos de aislados del virus.

Palabras clave: Análisis filogenético; Proteína de fusión; Proteína hemaglutinina-neuraminidasa; Virus de la enfermedad de Newcastle.

of the F2 protein, and showed Leucine at the N-terminus extension of the F1 protein. Those sequences allowed us to determine that these viruses belonged to a type of lentogenic virus. Phylogenetic analysis showed that most of the Newcastle virus isolated in this region of Ecuador, were closely related to strains of genotype II Class II, consistent with the sequence lentogenic live-virus vaccine, La Sota and B1. Molecular characterization and phylogenetic study of the F and HN genes could reliably be used as a tool for monitoring and early detection of Newcastle disease virus, as well as to predict the different pathotypes of virus isolates.

Keywords: Phylogenetic analysis; Fusion protein; Hemagglutinin-neuraminidase protein; Newcastle Disease Virus.

■ INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle (ENC) es una enfermedad viral aviar que endémicamente ocurre en Asia, África y Sudamérica (Rabalski et al., 2014), y se considera una de las enfermedades de aves económicamente más importante y prevalentes alrededor del mundo (Tirumurugan et al., 2011), ya que causa pérdidas considerables en la industria avícola. El virus de la enfermedad de Newcastle (VEN) es un virus ARN, simple cadena, sentido negativo, encapsulado, no segmentado, con una morfología helicoidal, y pertenece al género Avulavirus de la Familia Paramyxoviridae (Umali et al., 2013). Su genoma contiene alrededor de 15 Kb (Seal et

al., 1995; Tirumurugan et al., 2011; Mazumder et al., 2012; Uthrakumar et al., 2013; Rabalski et al., 2014), el cual codifica seis proteínas estructurales y no estructurales en el siguiente orden: 3'-5' la nucleoproteína (NP), la proteína fosforilada (P), la proteína de la matriz (M) no glicosilada (que forma la capa interna de la envoltura manteniendo su estructura e integridad), la proteína de fusión (F), la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la ARN polimerasa ARN dependiente (L) (Cuello et al., 2011).

Entre las seis proteínas codificadas por el genoma del VEN, las dos más importantes son las glicoproteínas de superficie, la proteína de fusión y la hemaglutinina-neuraminidasa, las

cuales están implicadas en la unión a la superficie celular y la fusión a la membrana celular. Comúnmente, la secuencia del sitio de escisión de la proteína F se considera la principal determinante molecular de la virulencia del VEN (Tan et al., 2008). La proteína F es sintetizada como un precursor inactivo F0 en estado no funcional; cuando ésta es cortada por las proteasas del hospedero entre los residuos 116 y 117 genera dos polipéptidos activos F1 y F2, los cuales son necesarios para que estas partículas sean infecciosas. Virus de cepas mesogénicas y velogénicas exhiben un motivo de aminoácidos polibásico, cuya secuencia consenso en la región carboxilo terminal de la proteína F2 es 112R/K-R-Q-K/R-R-116 y una fenilalanina F117 en la terminación amino de la proteína F1, cuyas cadenas actúan como sustratos para las proteasas resultando en infecciones sistémicas, mientras que las cepas de baja patogenicidad, lentogénicas, poseen la secuencia: 112G/E-K/R-Q-G/E-R116 y una L (leucina) en el residuo 117, que resulta en un virus que puede tratarse únicamente por las enzimas de tipo tripsina, restringida al tracto respiratorio e intestinal, que limita la replicación sistémica del virus (León et al., 2009; Miller et al., 2009; Moreno et al., 2009; Munir et al., 2012; Farooq et al., 2014; Heiden et al., 2014; Hosseini et al., 2014). Además, excluyendo la contribución del sitio de escisión de la proteína F hacia la virulencia, la proteína HN también contribuye a la virulencia, lo que quiere decir que F y HN actuarían conjuntamente como un ensamblaje proteico para dirigir la fusión en el momento y lugar precisos (Ayllon, 2009).

La proteína HN del VEN es una proteína multifuncional que juega un rol crucial en la infectividad del virus (Tan et al., 2008; Munir et al., 2012). Se han encontrado tres tamaños reportados para la proteína HN del VEN, el cual depende de su genotipo: el tamaño de la proteína HN en el genotipo I es de 616 aa, el genotipo II es de 577 aa, mientras que la longitud de la

proteína HN de los genotipos IV, V y VII es de 571 aa, independientemente de su patogenicidad (Tan et al., 2008).

Basado en análisis filogenéticos, el VEN ha sido identificado y clasificado en dos clases con un solo serotipo: clase I genotipo I y clase II genotipos I-XVIII. Los virus de la clase I están distribuidos en todo el mundo y han sido aislados comúnmente de aves acuáticas y marinas (Farooq et al., 2014). Los virus de la clase II han sido encontrados típicamente circulando entre aves salvajes y especies de aves de corral y han sido divididos en 18 genotipos (I-XVIII), siendo los genotipos V-VIII los predominantes circulando en el mundo (Fernandes et al., 2014).

El VEN tiene distribución mundial: en el 2010, infecciones por VENv (Virus de la enfermedad de Newcastle velogénicas) fueron confirmadas en 80 países, inclusive en animales salvajes (Diel et al., 2011). En Latinoamérica existen países en donde los brotes de esta enfermedad son a diario, los cuales deben convivir con esta enfermedad, ya que son países en donde esta enfermedad es endémica (Cárdenas et al., 2013). En Ecuador, en la provincia de Loja, no existe suficiente información disponible sobre la epidemiología y tendencias evolutivas de las cepas del VEN que circulan en el país, nunca se han reportado brotes de cepas de alta patogenicidad. El objetivo del presente estudio fue caracterizar molecularmente los aislados de virus circulando en la región sur del Ecuador durante el año 2014 y establecer las relaciones filogenéticas con los aislados del VEN en diferentes partes del mundo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas Virales

Se utilizaron ocho cepas de virus, las cuales fueron cedidas por el Dr. Gustavo Villacís (Villacís et al., 2014). Éstas fueron obtenidas

de hisopados cloacales de pollos centinelas en diferentes partes del cantón Zapotillo, que presentaban síntomas respiratorios leves tales como estornudo, tos y secreción nasal. En estas muestras se amplificó la región parcial del gen F (8 cepas) y el gen completo de la proteína HN (3 cepas) del VEN.

Aislamiento del Virus

Los hisopados cloacales fueron incubados en huevos embrionados de pollo no SPF de nueve días, los cuales al cuarto día de haber inoculado el virus se les extrajo el líquido alantoideo y se conservó a -80°C . Un total de ocho muestras resultaron positivas a las pruebas de hemoaglutinación (HA) e inhibición de la hemoaglutinación (HI) usando antiseros específicos y prueba rápida de ELISA para el virus de la enfermedad de Newcastle (Villacís et al., 2014).

Extracción de ARN

El ARN viral fue extraído desde el fluido alantoideo usando el PureLink Viral RNA/DNA Kits (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se midió la concentración (NanoDrop, USA) y calidad (gel de agarosa 2%) del ARN extraído.

PCR Transcripción-reversa (RT-PCR)

Para la amplificación de la región parcial de gen de la proteína F y el sitio de clivaje (5'-CCTTGGTGAITCTATCCGIAG-3' y 5'-CTGCCACTGCTAGTTGIGATAATCC-3') y el gen de la proteína HN (5'-TCCGTTCTACCACATCACCA-3' y 5'-CGCTTCCCAACCATCCTAT-3'), se utilizaron el par de primers específicos según lo descrito por Seal et al. (1995) y Tan et al. (2008). La amplificación de las regiones F y HN fue llevada por transcripción reversa-PCR (RT-PCR) usando la SuperScript III one-step RT-PCR system whit Platinum

Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las reacciones de PCR en un solo tubo fueron realizadas en un volumen final de $50\ \mu\text{l}$. La mezcla de la reacción para la RT-PCR de $50\ \mu\text{l}$ en un solo paso contiene $2\ \mu\text{l}$ de ARN, Buffer 1X $25\ \mu\text{l}$ (contiene $1,6\ \text{mM}$ de sulfato de magnesio, $200\ \mu\text{M}$ de dntp's de concentración final), $5\ \mu\text{l}$ de primer forward $10\ \mu\text{M}$, $5\ \mu\text{l}$ primer reverse $10\ \mu\text{M}$, transcriptasa reversa y taq polimerasa $2\ \mu\text{l}$, y Agua libre de Nucleasas $11\ \mu\text{l}$. Los productos de la PCR fueron detectados por electroforesis en geles de agarosa al 2% usando el buffer 1x TAE ($40\ \text{mM}$ TRIS, $20\ \text{mM}$ acetato de sodio y $1\ \text{mM}$ EDTA ajustado con pH 7,2 con ácido acético glacial). El gel se tiñó con SYBR safe (Invitrogen, Carlsbad, SA) y se fotodocumentó el gel utilizando un transiluminador UV (Enduro GDS).

Secuenciación y análisis filogenético

Los productos de la amplificación por PCR se enviaron a purificar y secuenciar en ambos sentidos (forward and reverse para generar una secuencia de consenso confiable), mediante electroforesis capilar por el método de dideoxi de Sanger et al. (1977) a través de los servicios de la compañía MACROGEN Korea. El ensamblaje y la edición de las secuencias se realizaron con el programa Bioedit (Hall, 1999). La identidad de la secuencia fue confirmada mediante comparación con la base de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) BLAST network server (Altschul et al., 1994), confirmando que las secuencias correspondían al Virus de la Enfermedad de Newcastle. Las secuencias de nucleótidos del gen parcial de la proteína F y del gen de la proteína HN determinadas en este estudio fueron comparadas con datos de secuencias de VEN representativos disponibles en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para conocer el genotipo y las relaciones filogenéticas desconocidas. Todas las secuencias fueron alineadas en MEGA ver-

sión 6.06 (Tamura et al., 2013) usando el método clustalW; las secuencias fueron cortadas para mantener en todo un tamaño igual. Antes de construir nuestro árbol filogenético debemos seleccionar el modelo de evolución que se ajusta más a nuestros datos usando el programa CLC Workbench software versión 7.6.3 (CLC Bio-Qiagen, Aarhus, Denmark) usando como referencia el BIC (Criterio de Información Bayesiano) y AIC (Criterio de información de Akaike). Para la región parcial del gen F se utilizó el modelo GTR+G+I y para la secuencia de aminoácidos de la proteína HN se utilizó el modelo F81+G+I. Un árbol filogenético fue construido por métodos Bayesianos (Inferencia bayesiana) utilizando el programa de computadora MrBayes versión 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Dos cadenas independientes MCMC (Monte Carlo Markov Chain) fueron realizadas para robustecer el árbol filogenético; utilizamos 30 millones de generaciones para la región parcial del gen F y 1 millón para la proteína HN. Los árboles fueron visualizados y editados utilizando el programa FigTree v3.1.3. El porcentaje de similitud/diferencia en la secuencia nucleotídica y de aminoácidos fue estimada usando el programa CLC Workbench software versión 7.6.3 (CLC Bio-Qiagen, Aarhus, Denmark).

Los productos de la amplificación del ARN genómico usando la RT-PCR se produjeron mediante el uso de oligonucleótidos reportados por Tan et al. (2008) para el gen de la proteína HN.

Números de acceso de datos de secuencia

Los datos de la secuencia de nucleótidos informados en este artículo han sido enviados a la base de datos GenBank y se les ha asignado los números de acceso: KU992895 al KU992902 para el gen parcial de la proteína de fusión, y KX014908 para el gen de la hemaglutinina-neuraminidasa.

■ RESULTADOS

Análisis de la región parcial del gen de la proteína F

Los productos de amplificación del ARN genómico usando la RT-PCR dio como resultado un producto de 254 pb. La región parcial del gen F (254 pb) corresponde a la posición nucleotídica 4847-5078 del genoma completo del Virus de la enfermedad de Newcastle. La secuencia amplificada codifica para los residuos de aminoácidos 95-178 de la proteína de fusión, los cuales fueron usados para determinar los patotipos involucrados (Tabla 1). Ninguno de los aislados tuvo la secuencia con el motivo 111GR/KRQRK/RF117 característica de las cepas virulentas. Las ocho muestras aisladas son lentogénicas ya que todas presentaron un motivo de aminoácidos monobásicos 111GGRQGRL117 en el sitio de clivaje del gen F.

El árbol filogenético Bayesiano fue construido con las secuencias aisladas en este trabajo y comparada con 48 secuencias reportadas en GenBank y que representan a diferentes genotipos (I-IX) del virus de la enfermedad de Newcastle tipo II, aislados, caracterizados y reportados en diferentes partes del mundo. La comparación nucleotídica de la región del sitio de clivaje de la proteína F de 254pb de los diferentes aislados ayudó a clasificar a todos los aislados reportados aquí en la clase II del virus de la enfermedad de Newcastle, genotipo II (Figura 1).

En la topología del árbol Bayesiano que se presentó en la Figura 1, era evidente que los aislados del virus de la enfermedad de Newcastle en la región sur del Ecuador se colocaron en el Genotipo II. La existencia de raíces y ramas para los aislamientos y la agrupación en el genotipo II del resto de secuencias proporciona evidencias sustanciales que apoyan su genotipo

Tabla 1. Caracterización de los aislados del Virus de la enfermedad de Newcastle.

Número de acceso GenBank	Nombre de la cepa	Sitio de clivaje de la proteína F motivo 111-117	Clase	Genotipo	País
DQ439947	NDV05-095	GGKQGRL	II	I	China
AY562991	chicken/N._Ireland/Ulster/67	GGKQGRL	II	I	Irlanda
AF217084	Queensland V4	GGKQGRL	II	I	Australia
AY427817	Heb02	GGKQGRL	II	Ia	China
AF309418	B1	GGRQGRL	II	II	USA
AY330721	chicken/Tirunelveli	GGRQGRL	II	II	India
AF077761.1	La Sota	GGRQGRL	II	II	China
KU992895	NDV1/Chicken/Loja	GGRQGRL	II	II	Ecuador
KU992896	NDV2/Chicken/Loja	GGRQGRL	II	II	Ecuador
KU992897	NDV3/Chicken/Loja	GGRQGRL	II	II	Ecuador
KU992898	NDV4/Chicken/Loja	GGRQGRL	II	II	Ecuador
KU992899	NDV5/Chicken/Loja	GGRQGRL	II	II	Ecuador
KU992900	NDV6/Chicken/Loja	GGRQGRL	II	II	Ecuador
KU992901	NDV7/Chicken/Loja	GGRQGRL	II	II	Ecuador
KU992902	NDV8/Chicken/Loja	GGRQGRL	II	II	Ecuador
AY727881	32C/T.98	GGKQGRL	II	Ila	Argentina
M21881	NDVFB	GRRQKRF	II	III	Australia
M24700	NDVFPH	GRRQKRF	II	III	Japon
AY741404	Herts/33	GRRQRRF	II	IV	USA
AY562987	gamefowl/U.S.CA/211472/02	GRRQKRF	II	V	USA
AY289001	turkey/USAND/43084/92	GRRQKRF	II	V	USA
AY288999	chicken/Mexico/37821/96	GRRQKRF	II	V	Mexico
FJ766526	JS/07/22/Pi	GRRQKRF	II	VI	China
AY288997	chicken/Kenya/139/90	GRRQKRF	II	VI	Kenia
AY288996	pigeon/Italy/1166/00	GRRQKRF	II	VI	Italia
AY288992	chicken/USACA/1083Fontana/72	GRRQKRF	II	VI	USA
AF456442	JS/5/01/Go	GRRQKRF	II	VII	China
AF358786	TW/2000	GRRQKRF	II	VII	Taiwan
DQ417111	SSX03	GRRQKRF	II	VII	China
DQ417110	JS01	GRRQKRF	II	VII	China
DQ363531	JS06	GRRQKRF	II	VII	China
DQ227251	SKY03	GRRQKRF	II	VII	China
DQ227248	SGM01	GRRQKRF	II	VII	China
AY734534	Trenque Lauquen	GRRQKRF	II	VIII	Argentina
FJ436303	ZJ/1/86/	GRRQRRF	II	IX	China
HQ266602	MG_725_08_	GRRRRRF	II	XI	Madagascar

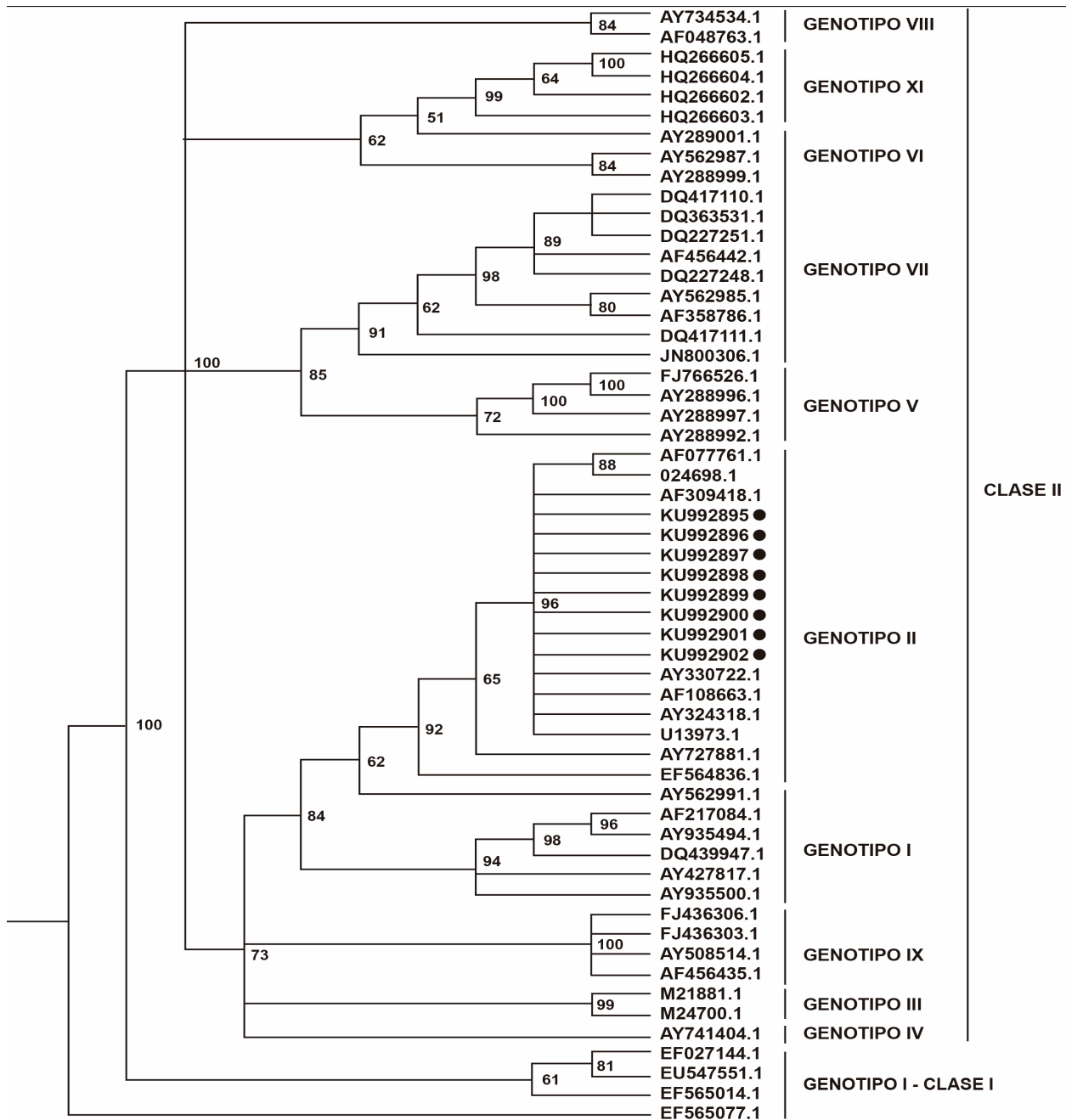


Figura 1. Árbol Filogenético de la región parcial del gen F de los ocho aislados presentes en la región sur del Ecuador y aislados de VEN representando a todos los genotipos. Los aislados usados en este estudio se encuentran marcados con un círculo negro.

y procedencia ya que se encuentra dentro del grupo perteneciente a la cepa B1 de tipo vacunal. El genotipo II se puede clasificar en dos subgenotipos (II y IIa); los virus aislados en esta

investigación se agruparon en el subgenotipo II, proveniente de aves de corral, mientras que el subgenotipo IIa proviene de aves salvajes.

La homología de las secuencias nucleotídi-

cas de la región parcial del gen F del virus de la enfermedad de Newcastle fue comparada con virus de referencia representando a los diferentes genotipos. Los resultados muestran que hay un porcentaje de identidad del 99,05 al 100% con la vacuna del virus B1, 98,57 al 99,52% con el virus de La Sota. Haciendo comparaciones con el resto de genotipos (Tabla 2) encontramos que el porcentaje de identidad con el genotipo I del VEN (Ulster.67) es del 90,00 al 90,95%, del 86,19 al 87,14% de identidad con el genotipo III del VEN (Australia-Victoria), del 86,67 al 87,62% de identidad con el genotipo IV del VEN (Herts), del 85,71 al 86,19% de identidad con el genotipo V del VEN (Chicken-Mexico), del 83,31 al 84,76% de identidad con el genotipo VI del VEN (Chicken/Kenya/139/90), del 83,33 al 84,29% de identidad con el genotipo VII del VEN (SGM/01), del 85,24 al 86,19% de identidad con el genotipo VIII del VEN (Trenquen lauquen), del 86,67 al 87,62% de identidad con el genotipo IX del VEN (ZJ-1-86), y del 84,29 al 85,71% de identidad con el genotipo XI del VEN (MG-725-08). La secuencia de aminoácidos de la región parcial de la proteína F de los aislados presentes en este estudio muestra que hay una similitud del 100% con la cepa vacunal B1 y La Sota, sin embargo la cepa KU992895 muestra una similitud del 98,57 debido a cambios o mutaciones en zonas conservadas de esta proteína proveniente de un virus de cepa vacunal.

Análisis del gen de la proteína HN

La amplificación de todo el gen de la proteína HN dio como resultado un producto de 1801 pb. De los análisis del sitio de clivaje del gen de la proteína F, se determinó que las cepas aisladas pertenecen a un solo tipo de virus y de origen vacunal, por lo que se procedió a secuenciar únicamente la muestra NDV2 (número de acceso KX014908). Basados en la predicción de aminoácidos y el análisis de los resultados de

secuenciación y traduciendo la secuencia nucleotídica a aminoácidos se determinó que el tamaño de la proteína del gen HN del VEN es de 577 aminoácidos, constatándose con los virus de patotipo lentogénico.

El gen HN del aislado de VEN en la región sur del Ecuador consiste de 1731 nt, los cuales codifican 577 aa. En el dominio transmembrana de la proteína HN no existió sustitución de aminoácidos comparándose con los virus del genotipo II. El virus aislado tiene cinco sitios de glicosilación característica del genotipo II en la posición 119 (NNS), 341 (NDT), 433 (NKT), 481 (NHT) y 538 (NKT) que existe en el virus La Sota y B1. Este genotipo se caracteriza por la pérdida de un sitio de glicosilación en el residuo 508. Los sitios de unión al ácido siálico y los residuos de cisteína en el aislado fueron completamente conservados excepto que en la posición 123 estos virus han perdido un residuo de cisteína (C) en su lugar hay un triptófano (W), característico de los virus La Sota, B1 y genotipo II.

Para localizar el orden de las cepas del VEN aisladas en la región sur del Ecuador en el árbol filogenético y comparar los aislados con otros virus aislados alrededor del mundo, se comparó la secuencia completa de aminoácidos de la proteína HN con diferentes secuencias representativas del VEN pertenecientes a la clase II (Genotipos I-IX), disponibles en GenBank, que se muestran en la Figura 2. Los resultados indican que los VEN aislados en la región sur del Ecuador pertenecen al genotipo II, pues la presencia de ramas y el nivel de agrupamiento con respecto al árbol construido por inferencia bayesiana ratifica este genotipo. Se usó 39 secuencias representativas de diferentes virus de Newcastle. La homología de las secuencias traducida a los residuos de aminoácidos correspondientes de aislados del genotipo II en este estudio tuvo un rango desde 99,83% de homología con diferentes secuencias del genotipo II.

Tabla 2. Comparación de nucleótidos y aminoácidos entre los aislados del VEN en la región Sur del Ecuador y virus que representan otros genotipos de la clase II. El alineamiento fue realizado usando el programa CLCbio main workbook (7.6.3). Los aislados del VEN se obtuvieron en el laboratorio del centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja: NC, Newcastle; nt = nucleótidos; aa = aminoácidos

	Genotipos y cepas											
	I	II	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	XI	
	Ulster 67	BI	La Soja	Australian-Victoria	Herts	Chicken-Mexico	Chicken-Kenya	Broiler-Shandong	Trenquen Lauquen	ZJ/L/86	MG/725/08	
	AY562991	AF309418	AF077761	MZ1881	AY741404	AY288999	AY288997	DG272748	AY734534	FJ436303	HQ266602	
%	(nt)	(aa)	(nt)	(aa)	(nt)	(aa)	(nt)	(aa)	(nt)	(aa)	(nt)	(aa)
KU992895	90,48	92,86	98,57	98,57	86,67	88,57	83,81	88,57	85,71	88,57	83,81	88,57
KU992896	90,95	94,29	100	86,67	90,0	86,67	88,57	84,29	86,19	90,0	84,29	88,57
KU992897	90,0	94,29	99,05	100	86,67	90,0	86,67	83,33	85,24	87,14	87,14	85,24
KU992898	90,0	94,29	99,05	100	86,67	90,0	86,67	83,33	85,24	87,14	87,62	84,29
KU992899	90,95	94,29	100	86,67	90,0	86,67	88,57	84,29	86,19	90,0	87,14	85,24
KU992900	90,48	94,29	99,05	100	86,67	90,0	86,67	83,81	85,71	90,0	86,67	85,71
KU992901	90,95	94,29	100	86,67	90,0	86,67	88,57	84,29	86,19	90,0	87,14	85,24
KU992902	90,48	94,29	99,05	100	87,14	90,0	88,57	83,81	85,71	91,43	87,62	84,76

DISCUSIÓN

La enfermedad de Newcastle es una de las más serias infecciones en la industria avícola y aves de corral (Farooq et al., 2014; Hosseini et al., 2014); es ocasionada por el Virus de la enfermedad de Newcastle y es endémica en algunos países de Norte, Centro y Suramérica, brotes de la ENC son frecuentemente reportados en la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE por sus siglas en inglés) (Diel et al., 2011). El virus presente en aves de traspatio podría no provocar sintomatología alguna, causando que estas aves puedan actuar como reservorios portadores, fuentes de infección y diseminación (Briceño et al., 2012).

La enfermedad de Newcastle es prevalente en el Perú; en la provincia de Loja, específicamente en el cantón Zapotillo, al ser una zona que maneja la avicultura de una forma tradicional y por el constante ingreso de aves de corral sin un control entre ambos países, aumenta la probabilidad de circulación del VEN utilizando a estos animales como fuentes de transmisión (Villacís et al., 2014). Sin embargo, se dispone de datos limitados sobre las características genómicas del VEN que ocurren en aves de corral comerciales vacunados. Conocer las características genéticas de cepas salvajes del VEN que afectan las aves de corral vacunadas, podría dar pistas importantes sobre los posibles orígenes, mecanismos de transmisión y las rutas de infección de estos virus. La importancia de los estudios moleculares y filogenéticos reside en que éstos nos pueden ayudar a conducir a una mejor comprensión sobre la manera de prevenir, controlar y gestionar futuros casos de la enfermedad de Newcastle (Umali et al., 2013).

Recientes estudios filogenéticos han demostrado que el VEN está en constante evolución (Diel et al., 2011; Farooq et al., 2014), con virus de diferentes genotipos experimentando

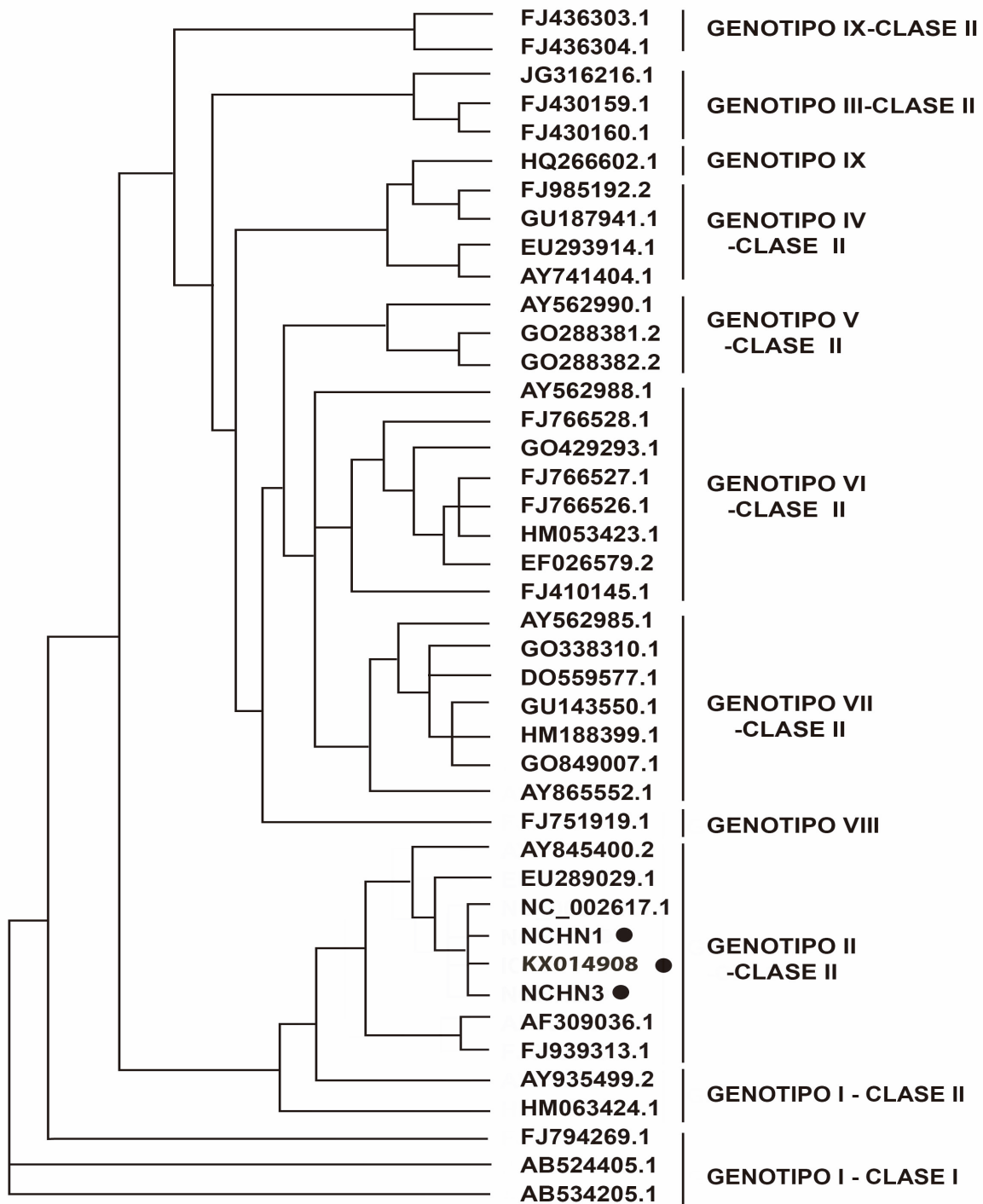


Figura 2. Árbol Filogenético basado en la secuencia de aminoácidos de la proteína Hemaglutinina-Neuraminidasa de los aislados presentes en la región sur del Ecuador y aislados del VEN representando a todos los genotipos. Los aislados usados en este estudio están marcados con un punto negro.

cambios simultáneos en diferentes localizaciones geográficas (Seal, 2004). Tests de caracterización de virus y análisis filogenéticos de secuencias han demostrado que VEN se encuentran circulando en la región sur del Ecuador.

Para caracterizar molecularmente a cepas de VEN comúnmente se considera el gen F, con énfasis particular en la región variable (47-421 nt) porque ésta codifica un sinnúmero de estructuras funcionales tales como el péptido de señal (aminoácidos 1-31), secuencia de activación de la escisión de la proteína (aminoácidos 112-116), porción de la región hidrofóbica que induce la fusión de la proteína, y péptido de fusión (aminoácidos 117-142), y ésta es caracterizada por las regiones variables y conservadas (Toyoda et al., 1988; Yusoff et al., 2001; Umali et al., 2013). En este estudio se utilizó una porción del gen de la proteína F que abarca el sitio de clivaje (112-116 aa) y el dominio transmembrana (117-142 aa). La función primaria de la proteína F es la fusión de las membranas del virus y la célula junto con la penetración de las partículas virales (Qiu et al., 2014). La secuencia de nucleótidos del gen F ha permitido clasificar al virus de la enfermedad de Newcastle en dos clases: I y II (Farooq et al., 2014), así también la secuencia parcial de este gen es considerada como un criterio estándar de genotipificación (Qin et al., 2008; Umali et al., 2013). La proteína de fusión está relacionada con la patogenicidad del VEN (Marín et al., 1996; Tan et al., 2008; Tirumurgan et al., 2011), las bases moleculares de su patogenicidad han sido determinadas a través del análisis de secuencias de aminoácidos del sitio de clivaje de la proteína F (Tan et al., 2008); las diferencias en el sitio de clivaje podrían estar directamente relacionadas con la virulencia de las cepas. La zona conservada del péptido de fusión se mantuvo en los ocho aislados, no encontrándose cambios en esta parte de la proteína. Sustituciones de aminoácidos en el péptido de fusión de la proteína F se han reportado que

afectan a la actividad de fusión de esta proteína (Umali et al., 2014). Gravel et al. (2011) reportó que la sustitución del dominio transmembrana del VEN a la del virus de Sarampión y Sendai neutralizó la actividad de fusión de la proteína F. En el presente estudio un total de ocho muestras fueron caracterizadas molecularmente: el análisis de la cadena de aminoácidos demostró que los virus aislados pueden ser considerados como de baja virulencia (lentogénicos), todos los aislados poseen el motivo 111 GGRQGRL 117 y presentan un porcentaje de identidad con el virus La Sota y la cepa B1 vacunal del 100%. En contraste, análisis filogenéticos basados en la secuencia parcial del gen de la proteína F de 254pb (nucleótidos 282 al 535, codificación de residuos de aa 95 al 178) agrupó los ocho aislados VEN con la clase II genotipo II. Las secuencias de aminoácidos demostraron una alta relación entre los ocho aislados con la cepa B1 y La Sota, cepas lentogénicas. Algunas de las cepas aisladas de campo tuvieron similitud en la secuencia de nucleótidos con las cepas vacunales pero otras no, lo cual no es totalmente inesperado debido a la alta tasa de error durante la replicación del virus de ARN (Marín et al., 1996). Por lo tanto, surge la heterogeneidad genómica entre los aislamientos de campo de VEN que podría ser resultado de la réplica del virus vacunal en aves persistentemente infectadas.

Investigaciones recientes y datos de otras publicaciones han demostrado que la virulencia del VEN no solamente se debe confiar a la secuencia del sitio de clivaje de la proteína F (Farooq et al., 2014), sino que la proteína HN del virus también puede estar involucrada en la determinación de la virulencia (Tan et al., 2008). Esta glicoproteína juega un rol importante en el reconocimiento de los receptores que contienen ácido siálico en las superficies de las células; es una proteína multifuncional porque no solo tiene actividad hemaglutinante y neuraminidasa, sino que además juega un papel

importante en la promoción de la fusión (Seal, 2004). Análisis de sustitución de aminoácidos en los dominios funcionales de la proteína HN (dominio transmembrana 25-45 de receptor a la célula), entre secuencias consenso derivadas de diferentes genotipos del VEN y nuestros aislados no se identificaron, pues las cepas contenían un porcentaje de similitud al 100% con la cepa vacunal B1 (Wang et al., 2015). Mutaciones en el dominio transmembrana y pérdida de los sitios de N-Glicosilación de la proteína HN pueden afectar la unión del virus, la actividad neuraminidasa y promoción de la fusión (Umali et al., 2014). Algunos estudios han demostrado que el tamaño de la proteína HN podría contribuir a la virulencia (Wang et al., 2015), así como también estar relacionada con el genotipo viral (Munir et al., 2012). El tamaño de la proteína en el genotipo I es de 616 aa, en el genotipo II es de 577 aa, mientras que el tamaño de las proteínas HN en el genotipo IV, V y VII es de 571 aa, independientemente de su patogenicidad. Tan et al. (2008) realizaron un estudio en China donde una cepa de virus con el motivo lentogénico en el sitio de clivaje, pero que habían ocurrido múltiples sustituciones de aa en la proteína HN, contribuyó a la virulencia del virus.

La presencia del VEN en aves de traspatio en la frontera entre Ecuador y Perú en el cantón Zapotillo puede explicarse por falta de prácticas de bioseguridad y por el ingreso de animales sin un control previo; cabe recalcar que en los lugares donde se realizó el muestreo, las aves de traspatio no se encontraban cerca o próximos a granjas de aves de corral, pero no se tiene información pertinente si estas aves estuvieron expuestas a otras especies de aves silvestres susceptibles a la infección, todos estos factores pueden ser clave para que el virus de la enfermedad de Newcastle este circulando por esta región. En Perú la vacunación contra el VEN es obligatoria para toda clase de aves (crianza de traspatio, de pelea, de engorde, reproduc-

toras, ponedoras y pavos), utilizando para ello vacunas vivas y vacunas inactivadas (Diel et al., 2011). La presencia de estas cepas lentogénicas podría estar creando ciclos de infección en aves de crianza no tecnificada e incrementando la inmunidad en las aves expuestas. Esta inmunidad es muy variable e insuficiente para resistir el desafío con una cepa velogénica, pero la presencia de estas cepas de baja virulencia circulando dentro de las poblaciones de aves de traspatio es un factor que altera la severidad de los brotes de la enfermedad de Newcastle en su forma clásica (con mortalidades cercanas al 100%) (Ferrer et al., 2008), todos estos hechos indican que las aves de traspatio pueden albergar cepas virulentas del VEN sin mostrar signos clínicos y que por consiguiente puedan actuar como portadores silenciosos, constituyendo una amenaza potencial para la avicultura comercial. Por otra parte, este hallazgo también puede indicar que las razas locales de traspatio son más resistentes y pueden sostener la forma virulenta de la enfermedad (Munir et al., 2012). Algunos informes sugieren que VEN velogénicos podrían surgir de VEN lentogénicos en la naturaleza (Collins et al., 1993; Gould et al., 2001). Gould et al. (2001), en su estudio realizado en brotes del VEN en Australia entre 1998 y 2000, demostró que una mutación puntual puede ser responsable de generar cepas virulentas y no virulentas ya que este brote se produjo en un virus de clase II genotipo I. Shengqing et al. (2002) determinaron que virus lentogénicos eran capaces de transformarse a virus velogénicos con el paso del tiempo, incluso pasar de un hospedero a otro aumentando su virulencia. Además, el cambio de ambiente del virus y por fuerzas de selección puede desempeñar un papel en la adquisición de la virulencia (Jindal et al., 2009). Los virus de baja virulencia tienen la ventaja de sobrevivir en el hospedero durante largos periodos de tiempo, incrementando los cambios de replicación viral. Los virus virulen-

tos con un tiempo más reducido teóricamente para la replicación, no obstante, tienen que seguir evolucionando en la naturaleza (Miller et al., 2009).

CONCLUSIONES

En conclusión, los virus circulantes en aves de traspatio rurales (gallinas criollas), en las parroquias rurales del cantón Zapotillo de la región sur de Ecuador, podrían representar un genotipo exógeno de tipo vacunal (genotipo lentogénico). La divergencia de las cepas del VEN en este ambiente podría servir potencialmente como un reservorio para la evolución de nuevos genotipos patogénicos del VEN. Estos hechos ponen de relieve la necesidad de una vigilancia continua del VEN a nivel nacional, tanto en aves comerciales como en silvestres.

LITERATURA CITADA

Altschul S.F., M.S. Boguski, W. Gish & J.C. Wootton (1994). Issues in searching molecular sequence databases. *Nature genetics* 6(2): 119-129.

Ayllon J. (2009). El virus de la enfermedad de Newcastle: Modelo de Interacción virus-célula y vector de expresión. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca. España. 31 pp.

Briceño C., J. Rodríguez & S. Rodríguez (2012). Seroprevalencia de la enfermedad de Newcastle en gallos de pelea (*Gallus gallus*) del municipio de Saboya, Boyaca. *Conexión Agropecuaria JDC (Revista Electrónica)* 2(1): 25-34. Disponible en: <http://www.revistasjdc.com/main/index.php/conexagro/article/view/182> [Consultado 14 enero 2015]

Cárdenas S., R. Navarro, R. Morales, M. Olvera, M. Marquez, R. Merino, P. Miller & C. Afonso (2013). Molecular epidemiology of Newcastle disease virus in Mexico and the potential spillover of viruses from poultry into wild bird species. *Applied and Environmental Microbiology* 79(16): 4985-4992.

Collins M.S., J.B. Bashiruddin & D.J. Alexander

(1993). Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Archives of virology* 128(3-4): 363-370.

Cuello S., A. Vega & J. Noda (2011). Actualización sobre la enfermedad de Newcastle. *Revista electrónica de Veterinaria (REDVET)* 12(6): 1-30. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n12061/061111.pdf> [Consultado 27 junio 2014].

Diel D., L. Susta, S. Cardenas, M. Killian, C. Brown, P. Miller & C. Afonso (2011). Complete Genoma and clinicopathological characterization of a virulent Newcastle Disease virus isolate from south america. *Journal of Clinical Microbiology* 50(2): 378-387.

Farooq M., U. Saliha, M. Munir & Q. Khan (2014). Biological and genotypic characterization of the Newcastle disease virus isolated from disease outbreaks in commercial poultry farms in northern Punjab, Pakistan. *Virology Reports* 3: 30-39.

Fernandes C., A. Varani, E. Lemos, V.O. de Miranda, K. Silva, F. Fernando, M. Montassier & E. Montassier (2014). Molecular and phylogenetic characterization based on the complete genome of a virulent pathotype of Newcastle disease virus isolated in the 1970s in Brazil. *Infection, Genetics and evolution* 26: 160-167.

Ferrer M., D. Icochea & S. Salas (2008). Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle en *Gallus gallus* de Lima: Estudio de caso-control. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 19(1): 67-74.

Gould A.R., J.A. Kattenbelt, P. Selleck, E. Hansson, A. Della-Porta & H.A. Westbury (2001). Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998–2000. *Virus research* 77(1): 51-60.

Gravel K.A., L.W. McGinnes, J. Reitter & T.G. Morrison (2011). The transmembrane domain sequence affects the structure and function of the Newcastle disease virus fusion protein. *Journal of virology* 85(7): 3486-3497.

Hall T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Pp. 95-98. En: *Nucleic acids symposium series* 41.

Heiden S., C. Grund, A. Roder, H. Granzow, D. Kuhnelt, T. Mettenleiter & A. Romer-Oberdorfer (2014). Different regions of the Newcastle disease virus fusion protein modulate pathogenicity. *PLoS ONE* 9(12): 1-19.

Hosseini H., A.G. Langeroudi & R. Torabi (2014). Molecular characterization and phylogenetic study of Newcastle disease virus isolated in Iran 2010-2012. *Avian Diseases* 58(1): 373-376.

Jindal N., Y. Chander, A. Chockalingam, M. Abin, P. Redig & S. Goyal (2009). Phylogenetic analysis of Newcastle disease viruses isolated from waterfowl in the upper midwest region of the United States. *Virology Journal* 6(1): 191-199.

León R., O. Vargas, M. Guevara & M. Solano (2009). Análisis Molecular de una cepa de virus de Newcastle de origen vacunal aislada a partir de un hisopado cloacal de aves sanas en Costa Rica. *Revista electrónica de Veterinaria (REDVET)* 10(11): 1-19. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111109/111105.pdf> [Consultado 27 junio 2014].

Mazumder A., S. Khatun, M. Nooruzzaman, E. Chowdhury, P. Das & M. Islam (2012). Isolation and identification of Newcastle Disease Virus from field outbreaks in chickens and pigeons. *The Bangladesh Veterinarian* 29(2): 41-48.

Marín M.C., P. Villegas, J.D. Bennett & B.S. Seal (1996). 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 diseases* 40(2): 382-390.

Miller P., M. Kim, H. Ip & C. Afonso (2009). Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus. *Virology* 391: 64-72.

Moreno V., A. Garcia & C. Mathieu (2009). Caracterización Molecular y patogenicidad del virus de la enfermedad de Newcastle (ENC) aislado en cormoranes. *Boletín veterinario Oficial (BVO)* 9. Disponible en: http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_9_1_semestre_2009/articulos/caracterizacion_ENC_2007_pdf [Consultado 27 junio 2014].

Munir M., M. Abbas, M. Tanveer Khan, S. Zohari & M. Berg (2012). Genomic and biological characterization of a velogenic Newcastle disease virus isolated from a healthy backyard poultry flock in 2010. *Virology Journal* 9(1): 46-56.

Qin Z., L. Tan, H.Y. Xu, B.C. Ma, Y.L. Wang, X.Y. Yuan & W.J. Liu (2008). Pathotypic characterization and molecular epidemiology of Newcastle disease virus isolates from different hosts in China from 1996 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology* 46(2): 601-611.

Qiu X., Y. Yu, S. Yu, Y. Zhan, N. Wei, C. Song & C.

Ding (2014). Development of Strand-Specific Real-Time RT-PCR to Distinguish Viral RNAs during Newcastle Disease Virus Infection. *The Scientific World Journal*, 934851.

Rabalski L., K. Smietanka, Z. Minta & B. Szewczyk (2014). Detection of Newcastle Disease Virus minor genetic variants by modified single-stranded conformational polymorphism analysis. *BioMed Research International*, 632347.

Ronquist F. & J.P. Huelsenbeck (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Sanger F., S. Nicklen & A.R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 5463-5467.

Seal, B. S. (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. *Functional & integrative genomics* 4(4): 246-257.

Seal B., D. King & J. Bennett (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. *Journal of Clinical Microbiology* 33(10): 2624-2630.

Shengqing Y., N. Kishida, H. Ito, H. Kida, K. Otsuki, Y. Kawaoka & T. Ito (2002). Generation of Velogenic Newcastle Disease Viruses from a Nonpathogenic Waterfowl Isolate by Passaging in Chickens. *Virology* 301: 206-211.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30(12): 2725-2729.

Tan L-T., H-Y. Xu, Y-L. Wang, Z-M. Qin, L. Sun, W-J. Liu & Z-Z. Cui (2008). Molecular characterization of three new virulent Newcastle disease virus variants isolated in China. *Journal of Clinical Microbiology* 46(2): 750-753.

Tirumurugaan K., S. Kapgate, M. Vinupriya, K. Vijayarani, K. Kumanan & S. Elankumaran (2011). Genotypic and pathotypic characterization of Newcastle Disease Viruses from India. *Plos One* 6(12): 1-10.

Toyoda T., B. Gotoh, T. Sakaguchi, H. Kida & Y. Nagai (1988). Identification of amino acids relevant to three antigenic determinants on the fusion protein of New-

castle disease virus that are involved in fusion inhibition and neutralization. *Journal of Virology* 62: 4227–4430.

Umali D.V., H. Ito, K. Shirota, H. Katoh & T. Ito (2014). Characterization of complete genome sequence of genotype VI and VII velogenic Newcastle Disease Virus from Japan. *Virus genes* 49(1): 89-99.

Umali D., H. Ito, T. Suzuki, K. Shirota, H. Katoh, T. Ito & Toshihiro (2013). Molecular epidemiology of Newcastle Disease Virus isolates from vaccinated commercial poultry farms in non-epidemic areas of Japan. *Virology Journal* 10(330): 1-17.

Uthrakumar A., K. Vijayarani, K. Kumanan & V. Thiagarajan (2013). Molecular characterization of thermostable Newcastle Disease Virus isolated from pigeon.

Indian Journal Virology 24(1): 42-47.

Villacís G., G. Escudero, F. Cueva & A. Luzuriaga (2014). Aislamiento del virus de la enfermedad de Newcastle en zonas rurales del Sur del Ecuador. *CEDAMAZ* 4(1): 86-90.

Wang J., H. Liu, W. Liu, D. Zheng, Y. Zhao, Y. Li & Z. Wang (2015). Genomic Characterizations of Six Pigeon Paramyxovirus Type 1 Viruses Isolated from Live Bird Markets in China during 2011 to 2013. *PLoS One* 10(4): e0124261.

Yusoff K. & W.S. Tan (2001). Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathology* 30(5): 439-455.