



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

"DETECCIÓN DE PARAMIXOVIRUS Y VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN PALOMA DOMÉSTICA (*Columba livia*) EN EL URUGUAY"

Edín Raúl Castro Janer

TESIS DE MAESTRÍA EN SANIDAD ANIMAL

**URUGUAY
2010**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

"DETECCIÓN DE PARAMIXOVIRUS Y VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN PALOMA DOMÉSTICA (*Columba livia*) EN EL URUGUAY"

Edín Raúl Castro Janer

Dr. Juan Ramón Arbiza

Director de Tesis

2010

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

**Andrés Gil; DMV, MSc, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República – Uruguay**

**Pablo Zunino; DVM, MSc, PhD
Instituto Investigaciones Biológicas "Clemente
Estable"
Ministerio de Educación y Cultura-Uruguay**

**Alvaro Freyre; DMV
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República – Uruguay**

2010

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres el haber brindado con todo su amor lo mejor de sí a sus hijos para vivir una infancia y adolescencia feliz, condición fundamental para la realización de una persona.

Agradezco a Ruth por todo su amor como compañera y madre de nuestros hijos y también por su invaluable contribución en la redacción de este trabajo.

Agradezco a Elinor por su inestimable apoyo en la preparación de la defensa de tesis.

Agradezco a todos mis maestros, afortunadamente muchos, que me transmitieron valores y conocimientos para forjar mi espíritu crítico.

Agradezco a las autoridades, docentes y personal de la Facultad de Veterinaria del Uruguay por su inestimable apoyo durante toda mi trayectoria como estudiante de grado y de posgrado, y como Colaborador Honorario de la entonces Cátedra de Ciencias Microbiológicas.

Agradezco a las autoridades, técnicos y personal de la Dirección General de los Servicios Ganaderos, lo que fue DILFA y a la actual DILAVE "M.C Rubino" del MGAP.

Agradezco a la Dra. Rosa Dilandro por consolidar mi formación técnica y mi espíritu crítico, y al Dr. Álvaro Núñez por permitir el uso de las instalaciones y equipamiento de la DILAVE para el desarrollo de la tesis.

Agradezco al Dr. Juan Ramón Arbiza por su desempeño como orientador de la tesis y por su generosa y cordial disposición para alcanzar los objetivos del trabajo.

Agradezco a la Dra. Flavia Zanetti y a las autoridades del Instituto de Biotecnología del INTA-Castelar por su enriquecedor aporte científico a la tesis, y por su calidez humana.

Agradezco al Dr. Juan Piquerés por el valioso aporte de su experiencia profesional en colombofilia y en la obtención de las muestras.

Agradezco al Dr. José Piaggio por su asistencia en el análisis estadístico del trabajo, quien lo realizó con su reconocida virtud docente.

Agradezco a la Dra. Alicia Dib por sus valiosas recomendaciones para la defensa de la tesis y por la corrección del Resumen en inglés.

Agradezco a las Lics. Rosina Vilaró y Carolina Pintos, del Departamento de Documentación y Biblioteca de la Facultad de Veterinaria, por su cooperación y asistencia en la revisión bibliográfica.

DEDICATORIA

A mis hijos

Claudia y Diego

ABREVIATURAS

A = Avirulento

AI = Influenza Aviar

AIV = Virus de Influenza Aviar

APMV-1 = Paramixovirus Aviar tipo 1

ELISA = Inmuno ensayo ligado a enzima

F = Proteína de Fusión

HA = Hemaglutinación

HI = Inhibición de la Hemaglutinación

HN = Hemaglutinina-Neuraminidasa

HPAI = Virus de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad

HPNAI = Virus de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad Notificable

HR= heptad repeat

ICPI = Índice de Patogenicidad Intracerebral

IDGA = Inmunodifusión en gel agar

IVPI = Índice patogenicidad intravenoso

L = Lentogénico

L = RNA polimerasa-RNA dependiente

LPAI = Virus de Influenza Aviar de Baja Patogenicidad

LPNAI = Virus de Influenza Aviar de Baja Patogenicidad Notificable

M = Mesogénico

M = Proteína M

mAb = Anticuerpo monoclonal

MDT = Tiempo medio de muerte embrionaria

ND = Enfermedad de Newcastle

ND = Virus de la Enfermedad de Newcastle

NM = Nanómetro

NP = Nucleoproteína

P = Fosfoproteína

PCR = Reacción en cadena de la Polimerasa

PMV-1 = Paramixovirus tipo 1

PPMV-1= Paramixovirus de la paloma

RNA = Ácido ribonucleico

RNA_m = RNA mensajero

rRT-PCR = RT-PCR en Tiempo real.

RT = Transcripción Reversa

TRT = Rinotraqueitis del pavo

V = Proteína V

VN = velogénico neurotrópico

vNDV = NDV virulento

VV = velogénico viscerotrópico

W = Proteína W

RESUMEN

A partir de la década de los 80, surgió una enfermedad en palomas mensajeras (*Columba livia*), causada por una variante del virus de la Enfermedad de Newcastle (PPMV-1) la cual se extendió por todo el mundo y se sospecha que está presente en nuestro país. Según su poder patógeno puede transmitirse y provocar enfermedad clínica a las aves de corral. La detección y la caracterización del agente se realiza mediante técnicas moleculares como RT-PCR, rRT-PCR y secuenciamiento genético. A su vez, es conocido el papel de las aves silvestres como reservorio natural del virus de la Influenza Aviar y como potencial factor en la transmisión del mismo a las aves de corral. La detección del virus de Influenza Aviar y de sus subtipos más importantes para la avicultura (H5y H7), se efectúa por técnicas moleculares como el rRT-PCR validadas por Laboratorios de Referencia Internacional. El objetivo del trabajo fue detectar la presencia de Paramixovirus Tipo 1 y Virus de Influenza Aviar en palomas del Uruguay y caracterizarlos mediante el uso de técnicas moleculares. Se tomaron muestras de sangre y de hisopados traqueales-cloacales de 20 palomas silvestres y de 1 paloma mensajera con síntomas clínicos de la enfermedad. Se realizaron pruebas serológicas de Inmunodifusión en Gel Agar para detectar anticuerpos para el Virus de Influenza Aviar y la totalidad de las mismas resultaron negativas. Se efectuaron ensayos de Inhibición de la Hemaglutinación para detectar anticuerpos al Paramixovirus Aviar serotipo 1 obteniéndose un 5% de seropositividad en la población de las palomas silvestres capturadas, con un intervalo de Confianza entre 1,3-24,9%. Los hisopados traqueales-cloacales se procesaron por las técnicas de rRT-PCR y no se detectó Virus de Influenza Aviar en ninguna de las muestras. Por otra parte, las muestras correspondientes a la paloma mensajera enferma resultaron positivas a la detección de Paramixovirus Aviar tipo 1.

El aislamiento viral en huevo embrionado de pollo confirmó la detección molecular del Paramixovirus. Se logró identificar el patotipo virulento característico de la mayoría de los PPMV-1 solamente con rRT-PCR validado por NVSL-USDA para detectar cepas virulentas del Virus de la Enfermedad de Newcastle, disminuyendo la temperatura de alineamiento a 50°C.

La muestra de hisopado traqueal positiva a la detección de Paramixovirus Aviar tipo 1 por rRT-PCR, presentó un motivo molecular característico de PPMV-1 en el sitio de clivaje de la Proteína de Fusión F (RRQKRF). Se construyó un árbol filogenético con 137 secuencias de 375 nucleótidos correspondientes al extremo 3' del gen de la proteína F de diferentes linajes de Paramixovirus tipo 1. Se comprobó que la correspondiente al hisopado traqueal de la paloma mensajera enferma se agrupaba en el linaje 4b representativo de los PPMV-1.

Se detecta y caracteriza por primera vez en el Uruguay, por Aislamiento Viral y por técnicas moleculares, PPMV-1 en una paloma mensajera con síntomas clínicos de Paramixovirosis Aviar. A su vez, se detecta indirectamente por la prueba de HI, Paramixovirus Aviar serotipo 1 en palomas silvestres en nuestro país.

SUMMARY

A variant of the Newcastle Disease Virus (PPMV-1) appeared in domestic pigeons (*Columba livia*) in the eighties. It had spread everywhere and its presence in our country is suspected. According to its pathogenic power, poultry can be infected and develop clinical disease. Pathogen agent detection and characterization can be performed by molecular techniques, like RT-PCR, rRT-PCR, and nucleotide sequencing. It is well known that wild birds are the natural reservoir of Influenza Aviar virus, and this represents a potential factor for its transmission in poultry. The detection of Influenza Aviar virus and its more important subtypes for the poultry industry (H5 and H7), takes place by molecular techniques like rRT-PCR validated by International Reference Laboratories. The aim of this work was to detect the presence of Avian Paramixovirus Type 1 and Avian Influenza Virus in pigeons of Uruguay and to characterize them by molecular methods. Blood samples and traqueal-cloacal swabs were taken from 20 wild pigeons and from one racing pigeon with clinical symptoms of the disease. All serological Agar Gel Immunodiffusion tests to detect antibodies for the Virus of Avian Influenza were negative. Hemagglutination Inhibition tests to detect antibodies for Avian Paramixovirus serotype 1 were done, a 5% of positive samples in the population of the captured wild pigeons was obtained, with a confidence interval between 1,3 / 24,9%. Tracheal-cloacal swabs were processed by rRT-PCR techniques to detect Avian Influenza virus, none of the samples were positive. On the other hand, samples corresponding to the racing pigeon were positive for Avian Paramixovirus type 1. Chicken embrionated eggs viral isolation confirmed the molecular detection of Paramixovirus. The virulent molecular patotype characteristic of PPMV-1 strains was detected by rRT-PCR validated by NVSL-USDA decreasing the alignment temperature to 50°C. The tracheal swab sample, that was positive for the detection of Avian Paramixovirus type 1 by rRT-PCR, displayed a characteristic motif of PPMV-1 in the cleavage site of the fusion protein F (RRQKRF). A phylogenetic tree with 137 sequences of 375 nucleotides from the 3' end protein F gene of different genotypes from Paramixovirus type 1 was constructed. The corresponding tracheal swab of the racing pigeon was grouped in the representative lineage 4b of the PPMV-1. This is the first report that detects and characterizes, by viral isolation and molecular techniques, PPMV-1 in a racing pigeon with clinical symptoms of Pigeon Paramixovirosis in Uruguay. It was also detected indirectly by the test of HI, Avian Paramixovirus type 1 in wild pigeons in our country.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	II
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	V
SUMMARY	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE	1
1.1.1. HISTORIA	1
1.1.2. ETIOLOGIA	2
1.1.2.1. Estructura del virus	3
1.1.2.2. Ciclo de replicación viral	7
1.1.2.3. Bases moleculares de la patogenicidad	8
1.1.3. SIGNOS CLINICOS	10
1.1.4. TRASMISIÓN Y DISEMINACIÓN	11
1.1.5. RESERVORIO DE VIRUS: AVES SILVESTRES	12
1.1.6. DIAGNÓSTICO	14
1.1.6.1. Detección virológica	14
1.1.6.2. Detección molecular	15
1.1.6.3. Detección serológica	15

1.1.6.4.	Determinación de Patogenicidad.....	16
1.1.7.	SITUACION DE LA ENFERMEDAD EN AMÉRICA DEL SUR Y EN NUESTRO PAIS.....	18
1.2.	INFLUENZA AVIAR.....	19
1.2.1.	HISTORIA.....	20
1.2.2.	ETIOLOGIA.....	22
1.2.2.1.	Estructura del virus.....	22
1.2.2.2.	Ciclo de replicación viral.....	26
1.2.2.3.	Bases moleculares de la patogenicidad.....	28
1.2.3.	SIGNOS CLINICOS.....	28
1.2.4.	DIAGNÓSTICO.....	29
1.2.4.1.	Detección virológica.....	29
1.2.4.2.	Detección molecular.....	30
1.2.4.3.	Detección serológica.....	30
1.2.4.4.	Determinación de Patogenicidad.....	30
1.2.5.	TRASMISIÓN Y DISEMINACIÓN.....	31
1.2.6.	RESERVORIO DE VIRUS EN AVES SILVESTRES.....	33
1.2.7.	SITUACION DE LA ENFERMEDAD EN AMÉRICA DEL SUR Y NUESTRO PAIS.....	33
2.	ANTECEDENTES ESPECÍFICOS DE PARAMIXOVIRUS AVIAR Y VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN PALOMAS	35
2.1.	PARAMIXOVIRUS DE LA PALOMA.....	35
2.1.1.	HISTORIA.....	35
2.1.2.	CARACTERÍSTICAS DEL PARAMIXOVIRUS DE LA PALOMA.....	36

2.1.2.1.	Termoestabilidad de la hemaglutinina.....	36
2.1.2.2.	Formación de placas.....	36
2.1.2.3.	Caracterización antigénica.....	36
2.1.2.4.	Caracterización biológica.....	40
2.1.2.5.	Caracterización genética.....	42
2.1.3.	TRASMISIÓN NATURAL DE PPMV-1 A LAS AVES DE CORRAL.....	48
2.2.	INFLUENZA AVIAR EN PALOMAS.....	49
2.3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	50
2.4.	OBJETIVO GENERAL.....	51
2.5.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
2.6.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	52
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.1.	MUESTRAS.....	53
3.2.	SEROLOGÍA.....	54
3.2.1.	PARAMIXOVIRUS.....	54
3.2.2.	VIRUS INFLUENZA AVIAR.....	54
3.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	55
3.4.	DETECCIÓN MOLECULAR.....	55
3.4.1.	EXTRACCIÓN ARN VIRAL.....	55
3.4.2.	DETECCIÓN MOLECULAR POR rRT-PCR.....	55
3.4.2.1.	Virus Influenza Aviar.....	55
3.4.2.2.	Paramixovirus Tipo 1.....	56
3.5.	DETECCIÓN VIRAL DE APMV -1.....	57
3.5.1.	AISLAMIENTO.....	57
3.5.2.	IDENTIFICACIÓN.....	58

3.5.2.1.	Hemaglutinación (HA).....	58
3.5.2.2.	Inhibición de la Hemaglutinación (HI).....	58
3.6.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	58
3.6.1.	RT-PCR APMV-1 VIRULENTO-AVIRULENTO.....	59
3.6.2.	rRT-PCR APMV-1VIRULENTO.....	60
3.6.3.	rRT-PCR PPMV-1.....	61
3.6.4.	SECUENCIAMIENTO Y DEDUCCIÓN AMINOÁCIDOS.....	61
3.6.5.	ANALISIS FILOGENÉTICO.....	63
4.	RESULTADOS	66
4.1.	SEROLOGÍA.....	66
4.2.	PUESTA A PUNTO RT-PCR y rRT-PCR.....	66
4.3.	DETECCIÓN MOLECULAR (rRT-PCR).....	66
4.3.1.	INFLUENZA AVIAR.....	66
4.3.2.	PARAMIXOVIRUS AVIAR TIPO 1.....	67
4.4.	AISLAMIENTO VIRAL.....	69
4.5.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	70
4.5.1.	RT-PCR VIRULENTO-AVIRULENTO.....	70
4.5.2.	rRT-PCR VIRULENTO.....	71
4.5.3.	rRT-PCR PPMV-1.....	73
4.5.4.	SECUENCIAMIENTO Y DEDUCCIÓN AMINOÁCIDOS.....	74
4.5.5.	ANALISIS FILOGENÉTICO.....	81

5. DISCUSIÓN	83
5.1. SEROLOGÍA	83
5.2. AISLAMIENTO VIRAL	84
5.3. DETECCIÓN MOLECULAR	85
5.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	85
5.4.1. RT-PCR VIRULENTO-AVIRULENTO	86
5.4.2. rRT-PCR VIRULENTO	87
5.4.3. rRT-PCR PPMV-1	87
5.4.4. ANALISIS GENÉTICO	88
6. CONCLUSIONES	90
7. BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXO 1	103

1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Newcastle (ND) y la Influenza Aviar (AI) son las enfermedades infecciosas más graves que afectan a las aves. La Enfermedad de Newcastle (ND) históricamente ha sido considerada, por su frecuencia y distribución, como la más seria amenaza para la avicultura mundial. Se reconocen al menos cuatro panzootias de ND y a partir del año 2000, se registra un incremento notable en su presentación. Como fuerte evidencia de esta amenaza, prácticamente todos los países vacunan contra esta entidad. En numerosos países africanos ND es la principal enfermedad de las aves y su presencia provoca importantes pérdidas económicas para la avicultura.

La AI, fue una enfermedad de rara ocurrencia hasta hace relativamente poco tiempo. De 1959 al 2003 los registros de la forma altamente patógena, única entonces de declaración obligatoria, afectaron a 21 países mientras que a partir del 2004 se han afectado 23 naciones. La actual epizootia ocasionada por el subtipo H5N1, se trata de un hecho sin precedentes en cuanto a extensión e intensidad y sin dudas es el episodio zoonosanitario más importante durante los años 2004 y 2005.

1.1. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

La Enfermedad de Newcastle es una enfermedad de las aves altamente contagiosa, provoca grandes pérdidas económicas a la avicultura, y su aparición es de denuncia obligatoria (Organización Mundial de la Salud Animal OIE, 2006a).

1.1.1. HISTORIA

Los primeros brotes de la enfermedad fueron descritos en Java, Indonesia e Inglaterra en 1926. Doyle en 1926 asignó el nombre de Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV) al virus responsable de una enfermedad emergente, altamente patógena para pollos, descrita en una granja cercana a Newcastle, Inglaterra (Doyle, 1927).

A partir de estos primeros reportes, la enfermedad se extendió por todo el mundo bajo la forma de 4 panzootias. La primera comienza en 1926 en el continente asiático y luego se disemina lentamente por Europa y América mediante el transporte marítimo. La

segunda panzootia se inicia a finales de la década del 60 en el Medio Oriente y se extiende por casi todos los países durante 1973 debido al comercio internacional de psitácidos exóticos. El transporte aéreo fue el principal factor causante de la rápida extensión de la enfermedad. Debido a los graves efectos provocados, los países afectados establecieron medidas sanitarias como protección de las aves de corral mediante la vacunación contra ND y el fortalecimiento de las cuarentenarias imponiendo normas de restricción a la importación de aves exóticas.

Las palomas (*Columba livia*) constituyen otra fuente de infección de ND. En muchos países de Europa se crían con fines deportivos, de exposición y de producción de carne y alcanzan poblaciones de millones de aves. Estas fueron las primeras aves afectadas por la tercer panzootia de ND. Esta enfermedad, que se asemejaba a la forma neurotrópica de los pollos pero sin signos respiratorios, aparentemente surgió en el Medio Oriente a fines de los 70 (Kaleta y Baldauf, 1988). En 1981 llegó a Europa y rápidamente se extendió por todo el mundo debido a las exposiciones y competencias internacionales de palomas mensajeras (Biancifiori y Fioroni, 1983).

A fines de la década de los 90 surge una nueva panzootia en varios países de Europa y Asia cuyo origen podría estar ocasionado por la trasmisión de cepas virulentas de las aves silvestres acuáticas, como patos y gansos, a las aves de corral (Liu y col., 2007).

1.1.2. ETIOLOGÍA

El agente causal es el Paramixovirus Aviar serotipo 1 perteneciente al género Avulavirus, subfamilia Paramyxovirinae, familia Paramixoviridae. La familia Paramixoviridae está integrada por las subfamilias Paramyxovirinae y Pneumovirinae. La subfamilia Paramyxovirinae está compuesta por los géneros Paramyxovirus, Morbillivirus y Avulavirus (Mayo, 2002), al cual pertenece el Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV). La subfamilia Pneumovirinae está integrada por el género Pneumovirus donde se encuentran los virus causantes de Síndrome de cabeza hinchada en pollos y de la Rinotraqueitis del pavo (TRT). Existen nueve serotipos diferentes de Paramixovirus Aviar (APMV-1 al APMV-9) siendo el Virus de la Enfermedad de Newcastle un APMV-1 (Alexander, 1997).

1.1.2.1. Estructura del virus

El NDV es pleomórfico, presentándose generalmente bajo la forma de partículas redondeadas de 100 a 500 nm de diámetro, aunque pueden observarse también formas filamentosas de aproximadamente 100 nm de diámetro y longitud variable al microscopio electrónico (Alexander, 1997).

Es un virus envuelto con simetría helicoidal, y posee una sola cadena de ácido ribonucleico (RNA) de polaridad negativa. La molécula de RNA, de aproximadamente 15.000 nucleótidos codifica 8 proteínas: nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína V (V), proteína W (W), proteína de matriz (M), proteína de fusión (F), hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y una RNA polimerasa-RNA dependiente (L) (Lamb y Kolakofski, 2001).

En ambos extremos, el genoma de NDV presenta dos regiones extracistrónicas de aproximadamente 50 nucleótidos, una en el extremo 3' llamada secuencia *leader* y otra en el extremo 5' conocida como *trailer* o *leader* (Figura 1). Estas regiones cumplen una función esencial en la transcripción y replicación viral.

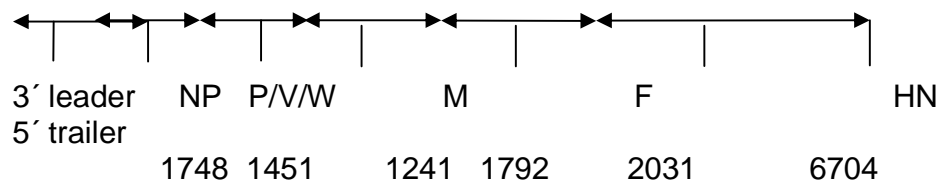
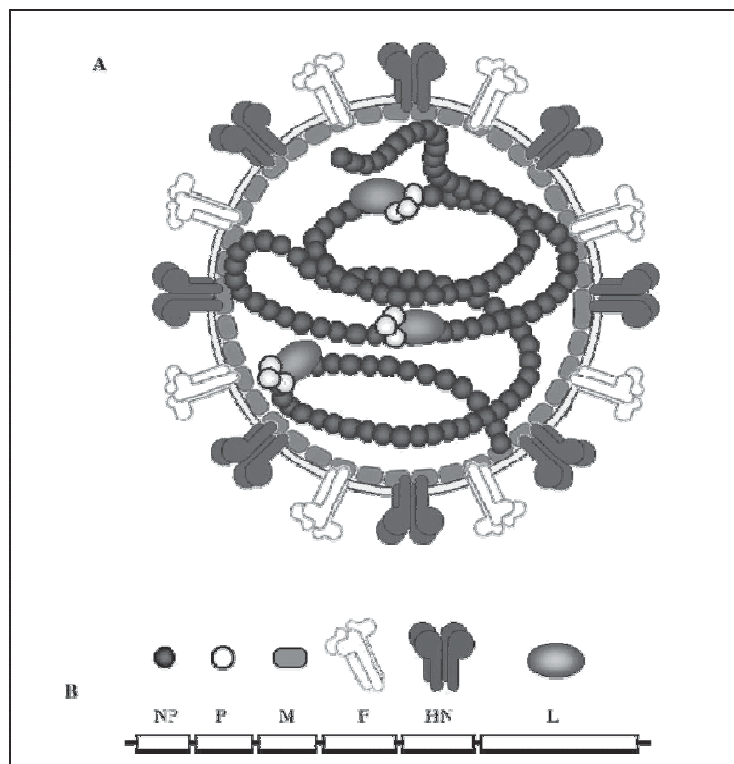


Figura 1. Esquema de la organización genómica de NDV. Se muestra la posición y el tamaño de los genes virales en dirección 3' a 5', y la presencia de las dos regiones extracistrónicas integradas por aproximadamente 50 nucleótidos en los extremos de la cadena de RNA.

La cadena de RNA junto a la proteína NP forma la nucleocápside viral. Este complejo RNA-NP adquiere una configuración helicoidal y las proteínas P y L se encuentran asociadas al mismo. La proteína M se ubica entre la envoltura lipídica y la nucleocápside viral.

Las glicoproteínas F y HN se encuentran en el interior de la membrana viral bajo la forma de espículas (Figura 2). Estas glicoproteínas de superficie intervienen en la interacción virus-hospedador y en la inducción de la respuesta inmune (Alexander, 1997, Meulemans y col., 1986).



oviridae y sus
 membrana viral se
 F, en la parte
 mamente ligada
 áinas (NP) que
 L que forman el
 nómico. El virus
 rmado por seis
 variable (1 - 47

La glicoproteína HN es una proteína integral de membrana de tipo II. Presenta un dominio hidrofóbico, localizado cerca del extremo amino-terminal, que permite anclar HN a la bicapa lipídica y además actuar como péptido señal (Figuras 3 y 5). La orientación de HN es similar a la del virus de Influenza Aviar. Posee 4 a 6 sitios de unión a carbohidratos. El dominio extracelular es un tallo que sostiene una cabeza globular en la cual residen los sitios antigénicos y los residuos aminoacídicos que intervienen en la unión al receptor y en la actividad neuraminidasa (Lamb y Kolakofski, 2001, Mirza y col., 1993).

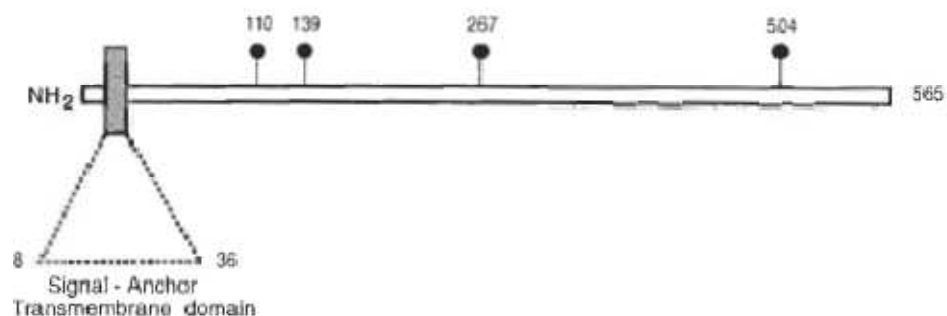


Figura 3. Esquema de la Glicoproteína HN. Se indica el dominio de anclaje y péptido señal en el extremo aminoterminal. Las posiciones 110, 139, 267 y 504 indican 4 de los 6 sitios potenciales de glicosilación. Fuente: Lamb, 2001.

La glicoproteína HN se inserta dentro de la membrana celular formando pares de dímeros (homotetrámeros) unidos por puentes disulfuro en la región del tallo.

Se ha comprobado que la HN interviene en la unión al receptor celular, formado por sialoconjugados, y en la hidrólisis de ácido siálico mediante su actividad neuraminidasa (Scheid y Choppin 1974, Lamb y Kolakofsky 2001). Por otra parte, la proteína de Fusión F se fusiona con la membrana celular hospedadora, e interactuando con la HN (Gravel, 2003), permite la entrada de la nucleocápside viral a la célula (Scheid y Choppin 1974).

La glicoproteína F de los Paramixovirus es una proteína integral de membrana de tipo I. Se inserta en la membrana celular a través de un dominio hidrofóbico (dominio transmembrana) ubicado en la región carboxi-terminal, dejando una cola citoplasmática de 20 a 40 residuos. Se sintetiza como un precursor inactivo (F_0) que es clivado en los péptidos F_1 y F_2 por proteasas de la célula hospedadora. Los mismos están unidos por puentes disulfuro formando la proteína de fusión madura (F) (Scheid y Choppin, 1974, Nagai y col., 1976, Scheid y Choppin, 1977, Richardson y col., 1980). La región amino-terminal de F_1 es altamente hidrofóbica y constituye el péptido de fusión (Figuras 4 y 5).

La glicoproteína F presenta dos dominios *heptad repeat* denominados HR1 y HR2. HR1 se encuentra junto al péptido de fusión y la secuencia HR2 se ubica cerca del dominio transmembrana (Chambers y col., 1990) (Figura 4).

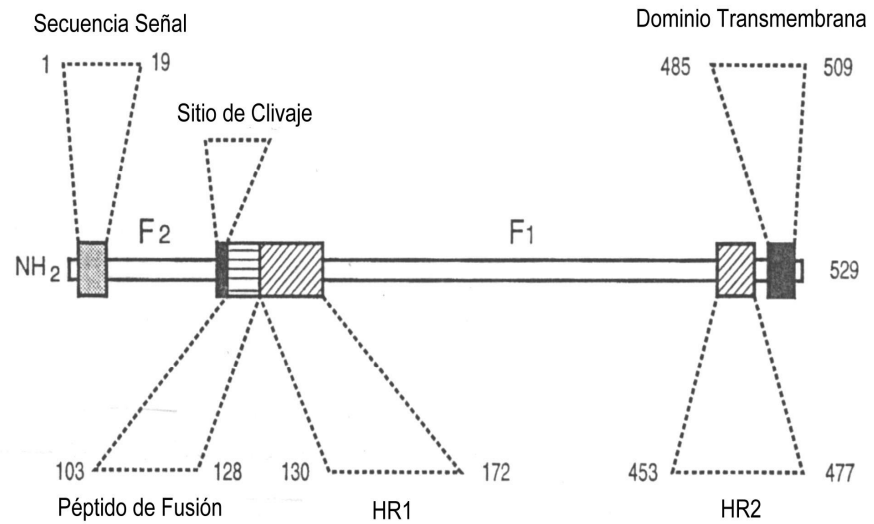


Figura 4. Esquema de la Glicoproteína F. Se señalan la posición de la secuencia señal, dominio de transmembrana, sitio de clivaje, región hidrofóbica del péptido de fusión y Regiones HR. Fuente: Lamb, 2001.

El péptido de fusión y los HRs intervienen en la fusión de las membranas viral y celular. El péptido de fusión se inserta en la membrana celular y desorganiza su estructura lipídica, mientras que los HRs generan el acercamiento de ambas membranas requerido para la fusión.

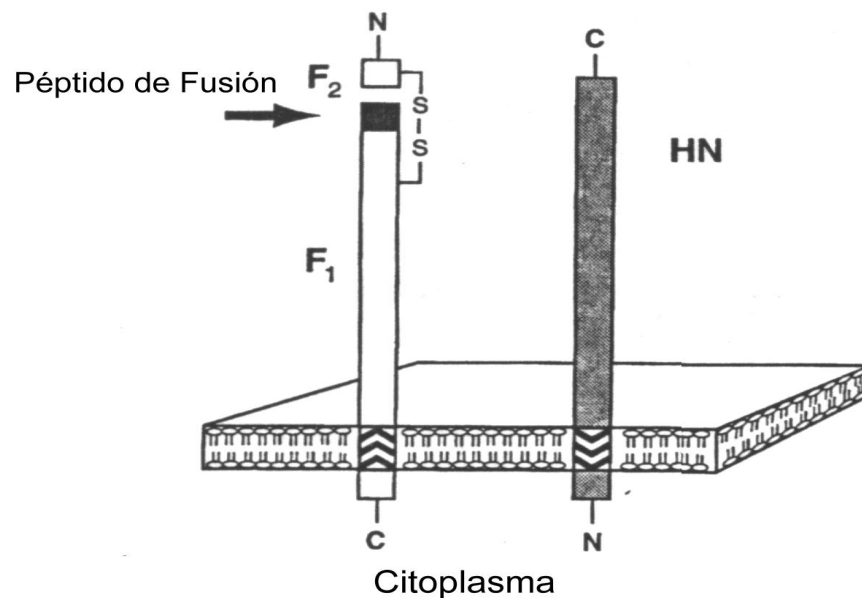


Figura 5. Representación esquemática de la inserción de las Glicoproteínas F y HN en la Envoltura Viral. Fuente: Lamb, 2001.

1.1.2.2. Ciclo de Replicación Viral

El ciclo completo de replicación de NDV ocurre en el citoplasma de la célula hospedadora. La síntesis de proteínas del hospedador es reemplazada con la síntesis de proteínas virales dentro de las 6 hs de infección, llegando a la máxima producción de virus entre las 10 y 12 hs postinfección, según la virulencia de la cepa (Hightower y Bratt, 1974).

El ciclo de replicación de NDV, comprende 4 etapas principales (Figura 6). En la primera de ellas se produce la adsorción del virus al receptor celular, la fusión de las membranas y finalmente la liberación de las nucleocápsides al citoplasma celular. (Lamb, 2001, McGinnes y col., 2002, Takimoto y col., 2002, Zaitsev, 2004). En la segunda etapa, transcripción primaria, ocurre la síntesis de los RNAm virales y sus correspondientes proteínas (Giorgi y col., 1983, Kolakofsky y col., 1998). En la tercera etapa se produce la replicación del genoma, en la cual se sintetizan nuevas copias del genoma viral. (Robinson, 1971). Finalmente, en la cuarta etapa, ensamblado y liberación, se asocian las proteínas NP, P y L al genoma viral para formar el complejo de la nucleocápside el cual es liberado de la célula hospedadora por un proceso de brotación, adquiriendo la envoltura lipídica que lleva insertas las glicoproteínas virales de superficie (Kingsbury y col., 1978).

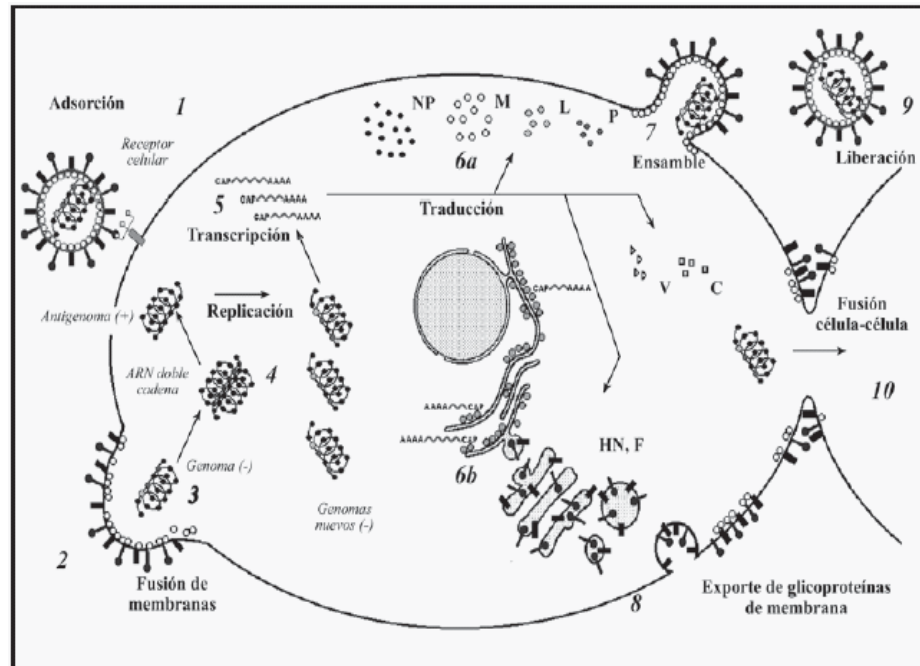


Figura 6. Representación gráfica del ciclo de los Paramixovirus. La partícula viral se adsorbe en la membrana de la célula hospedera por medio de la proteína HN, que reconoce como receptor específico el oligosacárido NeuAca2,3Gal (1). Un cambio conformacional de la HN activa la proteína F, la cual lleva a cabo la fusión de las membranas celular y viral (2), provocando que el RNA viral sea liberado en el citoplasma (3). En este punto comienza, por un lado, la síntesis de RNA antígenómico (cadena complementaria al genoma), la cual da origen a genomas nuevos (4), y por otro lado, a la producción de RNA mensajero (5), que codifica para las proteínas virales (6a). Los productos de la traducción se dirigen al sitio de ensamblaje, las proteínas NP, P y L son acopladas al RNA recién sintetizado y la proteína M se ubica en la parte interna de la membrana celular (7). Las glicoproteínas (HN y F), sintetizadas en retículo endoplásmico, son modificadas en aparato de Golgi (6b) y posteriormente expresadas en la membrana citoplásmica, en contacto íntimo con la proteína M (8). La afinidad de las proteínas del genoma (NP, P y L) con la proteína de matriz y de ésta con las glicoproteínas es determinante para el ensamblaje del virión, que es liberado de la célula por exocitosis (9). Es característico en los Paramixovirus que además de la formación de viriones, los virus pueden infectar las células inmediatamente vecinas a través de la fusión membranar célula-célula, debido a la expresión de las proteínas virales en la membrana de la célula hospedera (10), lo cual le permite dispersarse sin necesidad de salir al medio extracelular. Fuente: Santos-Lopez v col.. 2004.

1.1.2.3. Bases Moleculares de la Patogenicidad

Las bases moleculares de la patogenicidad se han definido mediante el estudio comparativo de las secuencias nucleotídicas

de genomas de NDV que fueron agrupados de acuerdo con las pruebas biológicas en diferentes patotipos.

La patogenicidad de las cepas de NDV está relacionada con la secuencia de aminoácidos en el sitio de clivaje del precursor F₀ que determina la capacidad de ser escindidas por proteasas específicas presentes en diferentes tejidos (Nagai y col., 1976, Ogasawara y col., 1992). El precursor F₀ de las cepas virulentas de NDV contiene, en este sitio, mayor proporción de aminoácidos básicos que las cepas no virulentas. La secuencia ¹¹²**K/R-R-Q-K/R-R-F**¹¹⁷ es característica de cepas velogénicas y mesogénicas (Glickman y col., 1988), mientras que ¹¹²**G/E-K/R-Q-G/E-R-L**¹¹⁷ se presenta en cepas de baja virulencia (Nagai y col., 1976).

El precursor F₀ de cepas no virulentas puede ser clivado sólo por serin proteasas presentes en las mucosas del tracto respiratorio e intestinal. La secuencia aminoacídica del precursor de cepas virulentas es clivado por proteasas ubicuas que se encuentran distribuidas en un amplio rango de células y tejidos (Nagai y col., 1976). De esta manera las cepas virulentas pueden replicar y diseminarse en diversos tejidos y órganos del huésped causando una infección sistémica (Nagai y col., 1976, Garten y col., 1980a).

Se sabe que el motivo aminoacídico de cepas velogénicas y mesogénicas es comparable a la secuencia clivada por proteasas de la familia de las furinas (Fujii y col., 1999). Por otra parte, el motivo de cepas no virulentas es reconocido por una serin proteasa (vitamina K dependiente) de la familia de la protrombina la cual está presente en el líquido amniótico-alantoideo de huevos embrionados (Gotoh y col., 1990, Ogasawara y col., 1992).

También se ha propuesto a la HN como otro factor determinante de la virulencia de NDV en base al análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas determinadas en aislamientos de diferente patogenicidad. (Nagai y col., 1976, Nagai y Klenk, 1977, Nagai y col., 1979, Garten y col., 1980b, Millar y col., 1988). A su vez, Leeuw y col. (2005), determinaron que tanto la cabeza globular como el tallo de la HN estaban involucrados en la determinación de la virulencia.

Otro factor de virulencia descrito recientemente, es la proteína V, la cual se sintetiza a partir del RNAm editado del gen P (Steward y col., 1995, Kato y col., 1997, Huang, 2000). Probablemente la proteína V posee una función dual, en la replicación y en la virulencia de NDV. El dominio carboxiterminal de la proteína V es rico en cisteínas y une átomos de Zn⁺². Se demostró que la patogenicidad de NDV *in vivo* está modulada, entre otros factores,

por los niveles de expresión de la proteína V. Esta proteína antagoniza la actividad del interferón, citoquina mediadora de la muerte de células evitando la apoptosis celular, permitiendo así una eficiente replicación y diseminación de los viriones (Roulston y col., 1999).

1.1.3 SIGNOS CLÍNICOS

Las manifestaciones clínicas de ND varían ampliamente según el huésped. Los pollos y los pavos son altamente susceptibles, y en estas especies la patogenicidad está determinada principalmente por la edad de las aves y el patotipo viral. Por el contrario, los patos, gansos y codornices no manifiestan signos clínicos ni aún en infecciones con cepas virulentas (Higgins y Shortridge, 1988).

Además, la severidad de la enfermedad depende de otros factores como el estado inmune de las aves, la dosis infectiva, la ruta de exposición y las condiciones ambientales adversas.

Beard y Hanson en 1981 clasificaron a las cepas de NDV en 5 patotipos virales según los signos clínicos que ocasionan en pollos:

I) Cepas velogénicas viscerotrópicas (VV): Son de virulencia extremadamente alta y ocasionan lesiones hemorrágicas intestinales que se manifiestan con diarrea verde acuosa, debilidad y postración. Estas cepas ocasionan mortalidad elevada en pollos de todas las edades (generalmente alcanza el 100%).

II) Cepas velogénicas neurotrópicas (VN): Las aves afectadas manifiestan severa dificultad respiratoria y signos neurológicos como tortícolis, parálisis de patas y alas y contracciones opistotónicas. La morbilidad suele ser del 100%. La mortalidad alcanza el 50% en aves adultas y el 90 % en pollos jóvenes.

III) Cepas mesogénicas (M): Causan infecciones agudas del tracto respiratorio y, en ocasiones, infecciones del sistema nervioso y son letales para pollos jóvenes. En aves adultas la mortalidad es poco frecuente.

IV) Cepas lentogénicas (L): Producen infecciones leves o inaparentes del tracto respiratorio. La mortalidad es poco frecuente en aves de todas las edades y varias de estas cepas se usan como vacunas.

V) Cepas avirulentas (A): causan infecciones intestinales inaparentes sin ocasionar mortalidad al hospedador.

Esta variación en la virulencia y en los signos clínicos implica la necesidad de definir cuidadosamente lo que constituye la ND para los propósitos de comercio, políticas y medidas de control. (Organización Mundial de Sanidad Animal OIE, 2006).

1.1.4 TRANSMISIÓN Y DISEMINACIÓN

La infección de aves con NDV ocurre principalmente por vía inhalatoria o digestiva.

Cuando las aves de corral se infectan con virus entéricos avirulentos (Beard y Hanson, 1981), los mismos se replican en el intestino, y por lo tanto la transmisión de la infección a otras aves se realiza a través de las heces.

Por ejemplo los brotes de ND en aves de corral ocurridos en Gran Bretaña durante los años ´80 se debieron a la ingestión de comida contaminada con heces y carcasas de palomas infectadas (Alexander, 1985a, Alexander y col., 1985b).

Las evidencias de transmisión vertical son contradictorias debido a que el virus puede penetrar la cáscara de huevo después de su postura. Sin embargo, los embriones infectados normalmente mueren antes de nacer o puede ocurrir cesación en la postura asociada con infecciones por cepas patogénicas de NDV (Beard y Hanson, 1981). En contraste a la infección con cepas virulentas, los embriones de huevos infectados con cepas lentogénicas o vacunales de NDV llegan a término. Por lo tanto, no está claro en qué momento ocurre la infección aunque se demostró que la cepa vaccinal La Sota está presente en ovarios, oviducto y útero después de la vacunación (Pharo, 2001).

Existen diferentes formas de introducción de NDV dentro de un área geográfica determinada libre de la enfermedad.

Una de ellas lo constituye el transporte de aves vivas con fines comerciales (Kaleta y Baldauf, 1988). El riesgo de introducción de ND por esta vía se ha incrementado debido a que los modernos medios de transporte permiten cubrir grandes distancias en cortos períodos menores al período de incubación de la enfermedad. Las medidas de cuarentena evitan la introducción de NDV en países libres. Sin embargo, el incumplimiento de estas medidas y la

posibilidad de que algunas especies puedan volverse persistentemente infectadas y excretar virus intermitentemente durante varios años pueden provocar la introducción del agente en áreas libres de la enfermedad.

Otro mecanismo de transmisión lo constituye el contacto entre aves domésticas y silvestres. Durante las epidemias de NDV en aves domésticas, el virus pasa a las aves salvajes y luego vuelve a las aves de corral (Maldonado y col., 1994). Además, las aves migratorias silvestres pueden transmitir el NDV a través de grandes distancias.

Otra fuente posible de diseminación del virus son las palomas de carrera durante las competencias, debido a que estas aves son reunidas en un determinado sitio antes de ser liberadas (Alexander, 1986). Las palomas de carrera suelen volar largas distancias y si están enfermas pueden desviarse del recorrido y anidar en otros palomares, depósitos de raciones para aves, o mezclarse con aves silvestres, transmitiendo el virus.

Asimismo, la enfermedad puede transmitirse por el movimiento de personas y equipos, los productos avícolas, el aire, la comida y el agua contaminada. Por lo tanto, para evitar la transmisión de la enfermedad por estos medios, es de gran importancia implementar un eficaz sistema de bioseguridad en las granjas avícolas.

1.1.5 RESERVORIO DEL VIRUS EN AVES SILVESTRES

Las aves silvestres constituyen un reservorio natural, ya que se han aislado de al menos 236 especies diferentes todos los patotipos de NDV. Las mismas pueden diseminar el agente a través de la migración intra o intercontinental o por captura y traslado para su comercialización como mascotas o aves exóticas (Kaleta y Baldauf, 1988).

Existen al menos dos reservorios de NDV en aves salvajes (Higgins y Shortridge, 1988): las aves acuáticas migratorias de zonas templadas en las cuales circulan principalmente cepas avirulentas de NDV y las aves de zonas tropicales (loros) infectadas con cepas de NDV virulentas pudiendo eliminar el virus en forma asintomática por períodos prolongados de hasta un año de duración. En consecuencia, estas aves pueden representar un

serio problema en la introducción de cepas patógenas en aves comerciales susceptibles.

Así, se describe que la mayoría de las cepas virulentas de APMV-I infectan tanto loros como a aves domésticas, y además se han aislado de aves silvestres en diferentes lugares del mundo (Alexander, 1997).

Según Ujerivari (2006) hay dos reservorios principales de Paramixovirus aviáres, el primario y más viejo constituido por las aves silvestres acuáticas, y otro secundario más reciente, conformado por los pollos. Últimamente surgió un tercer reservorio integrado por las palomas y los cormoranes estableciendo los genotipos VI (linaje 4b) y V (linaje 3) respectivamente.

Se han descrito altas mortalidades por APMV-1 velogénicos neurotrópicos en cormoranes de doble cresta (*Phalacrocorax bougainvillii*) en Canadá y Estados Unidos en 1990 y 1992. También se han aislado virus velogénicos viscerotrópicos en cormoranes, en California en el brote de 1970 de origen psitácido en Québec (Canadá) en el año 1975, 1992 y 2000, y en Florida (EEUU) en el año 2002.

En Chile (Ternezier, 2007) se reportó un aislamiento de Paramixovirus tipo velogénico en cormoranes, con síntomas clínicos similares a los provocados por la Enfermedad de Newcastle. El mismo se agrupó en la línea genética del genogrupo V, linaje 3, sublinaje 3c derivada de la panzootia de 1970 de origen de aves psitácidas de vida libre de América y filogenéticamente relacionado con virus aislados en cormoranes en Norteamérica en 1990 y 1992. Presenta la sustitución R por G en la posición 110 lo que sería único y característico de los aislados del genotipo de cormoranes y en particular, posee mayor similitud con el virus Newcastle velogénico viscerotrópico cepa Trenque Lauquen aislado en Argentina durante un brote de ND en los años 1970-1971. Por lo tanto se infiere que este virus está circulando en forma endémica en Sudamérica en aves silvestres acuáticas desde los años 1970 a la fecha (Moreno y col., 2009).

Se han aislado también cepas avirulentas y lentogénicas de NDV de aves acuáticas migratorias (Spalatini y Hanson, 1975). Estas cepas pueden ser mantenidas en diferentes especies de aves silvestres sin causar perjuicio a sus hospedadores habituales. Según Miller y col., (2010), las mismas se agrupan filogenéticamente en la clase I la cual contiene 9 genotipos diferentes y en los genotipos I y IIa de la clase II. Además sostienen que en estos últimos años se han aislado cepas

lentogénicas de los mismos genotipos en aves de traspatio en USA y en Asia, lo cual sugiere que estos virus circulan en aves de corral y en aves silvestres por todo el mundo.

Estudios realizados en Argentina (Zanetti, 2004, Zanetti y col., 2005) determinaron la presencia de anticuerpos contra el virus de la Enfermedad de Newcastle en distintas especies de aves silvestres de una zona geográfica de importancia para la industria avícola y se aislaron 7 Paramixovirus tipo 1 no patógenos relacionados con el genotipo IIa.

Sin embargo, poco se conoce sobre su potencial patogenicidad en especies altamente susceptibles (Rott y Klenk, 1988).

En ese sentido, Aldous y col. (2007) han reportado un brote de ND ocurrido en Reino Unido, en julio de 2007, en una granja con 12000 faisanes destinados a la caza deportiva. La caracterización genética del mismo demostró que pertenecía al linaje 5b y estaba filogenéticamente relacionado con otros aislamientos de faisanes en brotes ocurridos en Dinamarca y Suecia (Jorgensen y col., 2002, 2004). A su vez, se han descrito focos en faisanes en varios países de la Unión Europea, África y Asia. Probablemente todos estos brotes hayan sido transmitidos por aves silvestres migratorias acuáticas.

Por lo tanto, las aves silvestres también pueden ser portadores y transmitir el virus de la Enfermedad de Newcastle (APMV-1); por tal motivo es importante realizar vigilancia epidemiológica en las mismas para evaluar el riesgo de transmisión de APMV-1 a las aves de corral.

1.1.6 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la Enfermedad de Newcastle está basado en la detección del agente y la determinación de su patogenicidad (patotipificación).

1.1.6.1 Detección virológica

La detección virológica comprende el aislamiento del virus, y la identificación del agente.

Aislamiento en huevo embrionado de pollo

El aislamiento viral puede realizarse a partir de muestras de órganos (cerebro, hígado, intestino, pulmón, tráquea, riñón, bazo), de hisopados traqueales y cloacales y de heces transportados en un medio con antibióticos (Manual de la OIE, 2006). NDV puede mantener su infectividad en heces por más de 8 semanas a temperaturas de 40°C, por aproximadamente 3 meses entre 20 y 30°C y por períodos más prolongados a temperaturas menores.

Una suspensión obtenida del material sospechoso se inocula en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de pollos de 9-11 días de edad y se incuba a 37°C durante una semana. Los huevos muertos o moribundos y los que sobrevivieron hasta el final del período de incubación se enfrían a 4°C. Se colectan los líquidos alantoideos de los mismos para detectar actividad hemaglutinante por la prueba de Hemaglutinación (HA).

Identificación

La identificación del virus se realiza por la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) usando antisueros específicos para cada uno de los 9 serotipos de APMV.

1.1.6.2 Detección molecular

El diagnóstico molecular de NDV se basa en la amplificación por RT-PCR de determinadas regiones del genoma viral (Seal y col., 1995, Kant y col., 1997, Creelan J.L, 2002, Wang, 2004). También se han desarrollado pruebas de rRT-PCR (RT-PCR en tiempo real) que utilizan sondas de hidrólisis Taqman diseñadas para reconocer secuencias específicas de regiones conservadas del gen de la proteína M de NDV (Wise y col., 2004).

1.1.6.3 Detección serológica

Se han desarrollado varias técnicas (Beard y Hanson, 1984) para detectar anticuerpos para el NDV presentes en la sangre de las aves infectadas o vacunadas, siendo las más usadas, la Inhibición de la Hemaglutinación (HI) y el ELISA. Las mismas se pueden emplear para realizar estudios seroepidemiológicos de prevalencia de la enfermedad y estudio de nivel de protección contra la enfermedad en aves vacunadas.

1.1.6.4 Determinación de Patogenicidad

Pruebas biológicas

La virulencia de las cepas se puede determinar mediante la realización de pruebas biológicas y su valoración se basa en las siguientes pruebas:

Tiempo medio de muerte embrionaria (MDT)

Se inoculan diferentes diluciones de la suspensión viral en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de pollo 9-11 días y se incuban a 37°C por 7 días. Se determina el tiempo medio de muerte (MDT) como el tiempo mínimo en que la dosis letal mínima (dilución más alta que provoca muerte de la totalidad de los embriones) en que mueren todos los embriones. Las cepas velogénicas tardan menos de 60 hs en matar, las mesogénicas tardan entre 60-90 horas y las lentogénicas tardan más de 90 horas.

Índice de patogenicidad intracerebral (ICPI)

Se inyecta a 10 pollitos de 1 día de edad por vía intracerebral 0,05 ml. de virus diluido 1/10, se observan durante 8 días y se establecen registros diarios, (se adjudica a los muertos un puntaje de 2, 1 a los enfermos y 0 a los sanos). El ICPI es la puntuación media por ave y por observación, durante un período de 8 días de observación y los valores oscilan entre 0 y 2. La OIE ha establecido que los Paramixovirus tipo 1 que causan la Enfermedad de Newcastle en las aves de corral, tienen un ICPI mayor a 0,7.

Índice de patogenicidad intravenosa (IVPI)

El líquido alantoideo diluido 1/10 del material a estudiar se inyecta por vía intravenosa a pollitos de 6 semanas de edad, se observan durante 10 días adjudicando un puntaje de 2 para los muertos o con parálisis, 1 para los enfermos y 0 para los sanos. El IVPI es la puntuación media por ave y por observación durante el periodo de 10 días. Las cepas lentogénicas y algunas mesogénicas tendrán valores cercanos a 0 y las velogénicas valores mayores a 3.

La interpretación de las pruebas debe realizarse con un criterio práctico, ya que existen variaciones de los valores usando diferentes pruebas biológicas. Según las normas de la OIE un virus de APMV-1 con un ICPI mayor a 0,7 se considera como agente causal de la Enfermedad de Newcastle.

Pruebas moleculares

Durante la replicación viral se sintetiza la glicoproteína F₀ la cual es escindida por enzimas proteolíticas (como la tripsina) en dos fracciones F1 y F2 para formar la proteína F. Ésta va a integrar la estructura de la membrana del virus y es necesaria para determinar la infecciosidad del mismo. La F₀ de las cepas velogénicas puede ser clivada por otras proteasas presentes en un rango más amplio de células y tejidos del hospedador, lo cual explicaría su mayor virulencia.

La mayoría de los virus de la enfermedad de Newcastle que son patógenos para los pollos tiene una secuencia ¹¹²**R/K-R-K-K/R-R¹¹⁶** en el extremo C-terminal de la proteína F2 y un residuo de fenilalanina en la posición 117 en el extremo N-terminal de la proteína F1, mientras que los virus de baja patogenicidad presentan la secuencia ¹¹²**G/E-K/R-Q-G/E-R¹¹⁶** y un residuo de leucina en la posición 117 de F₀. De manera que las cepas virulentas de NDV contienen al menos un par de aminoácidos básicos en las posiciones 115 y 116 más una fenilalanina en la posición 117 y un residuo básico (R) en la posición 113 (Organización Mundial de la Salud Animal, 2006).

Se han desarrollado diversas técnicas moleculares para caracterizar el punto de escisión de F₀. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) y usando cebadores específicos, se puede obtener productos de PCR que amplifican la secuencia de nucleótidos que codifican el sitio de escisión de F₀ para cepas de NDV virulentas y avirulentas a partir de aislamientos, tejidos y heces procedentes de aves infectadas (Viljoen, 2005).

Además, dichos productos de PCR pueden ser caracterizados por las técnicas de secuenciación de nucleótidos, análisis con enzimas de restricción y estudios con sondas de hibridización. A su vez el RT-PCR en tiempo real permite identificar cepas velogénicas cuando se emplean cebadores y sondas específicas que reconocen secuencias representativas de los virus velogénicos (Aldous, 2001).

La presencia de múltiples aminoácidos básicos en el punto de escisión de F₀ identifica a los virus virulentos o potencialmente virulentos y esto se ha incorporado en la definición de la Enfermedad de Newcastle en el Manual de la OIE. Sin embargo hay que tener en cuenta que la ausencia de los mismos no confirma ausencia de patogenicidad del virus debiéndose recurrir al uso de pruebas biológicas confirmatorias.

1.1.7 SITUACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN AMÉRICA DEL SUR Y EN NUESTRO PAÍS

A partir de de la década del 60 se comienza a denunciar la aparición de esta enfermedad en América del Sur. En estos últimos cinco años, la enfermedad se ha reportado en Bolivia en los años 2006 y 2008, Brasil en el 2006, Chile en el 2007, Colombia en los años 2005 al 2009, Ecuador en el 2009 (sospecha clínica) y Perú en los años 2008 y 2009 (WAHID Interface, 2009a). Cabe mencionar que la OIE aun no tiene información sobre la enfermedad en Perú en el año 2010 y en Venezuela en los años 2009 y 2010.

A su vez, la situación sanitaria de ND en el Cono Sur es excelente ya que la misma no se ha reportado en muchos años en países como Argentina (1987) y Uruguay (1984) o bien se presentó en forma limitada y sin graves consecuencias para la avicultura, en otros países de la región. Por ejemplo, en Brasil el foco de NDV ocurrido en el 2006, solo afectó a un pequeño número de aves de traspatio que rápidamente fue controlada sin comprometer a la industria avícola (WAHID Interface, 2009b).

ND fue diagnosticada por primera vez en nuestro país en 1970 y se presentó como un brote con elevados índices de morbilidad y mortalidad.

Posteriormente se registraron escasos brotes y estuvieron relacionados con el ingreso irregular de aves infectadas desde países limítrofes, afectando a la zona fronteriza (Rivera, Soriano) fuera de la zona avícola industrial del país (Trenchi, 1993).

La enfermedad de Newcastle fue diagnosticada por última vez en nuestro país en 1984 en el Departamento de Rivera, y los estudios clínicos, patológicos y seroepidemiológicos realizados durante 1997, 1998, 1999 y 2000 por el MGAP, no evidenciaron actividad viral en la población de pollos de engorde del sector avícola comercial del Uruguay (Días, 2010).

A partir del 23 de junio de 2000 la Dirección General de Servicios Ganaderos (DGSG) de acuerdo con lo establecido por el Decreto 177/000 inició la primera etapa de supresión de la vacunación contra la Enfermedad de Newcastle prohibiéndola en "parrilleros" y autorizando el uso de vacunas vivas con índice de patogenicidad intracerebral (ICPI) menor de 0.2.

1.2 INFLUENZA AVIAR

Según el Manual de la OIE (2006b), la Influenza Aviar altamente patogénica, también conocida como peste aviar, es una enfermedad de las aves de corral muy contagiosa y causa alta mortalidad. Es causada por los virus del tipo A de la familia Orthomyxoviridae. En base a las características antigénicas de las proteínas internas virales (proteínas de la matriz y de la nucleocápside) los virus de Influenza se clasifican en los tipos A, B y C siendo las aves susceptibles solo para el tipo A. También son susceptibles a la infección viral otras especies de hospedadores como las focas, las ballenas, los equinos, visones, los suinos y el hombre. El virus de Influenza Aviar (AIV) se ha adaptado a persistir en las aves acuáticas silvestres sin causar enfermedad determinando que estas aves constituyan en principal reservorio natural del virus.

En el siglo XX ha causado tres brotes pandémicos en el hombre, que surgieron como consecuencia de la aparición de nuevos subtipos de virus. La primera pandemia fue la gripe española que provocó 20 millones de muertes humanas entre los años 1918-19 y fue ocasionada por el virus H1N1. La segunda pandemia surgió en Asia en 1957 y fue provocada por el virus H2N2, teniendo un impacto menor que la primera. En 1968 aparece la tercera, en Hong Kong, causada por el H3N2. Estos brotes han sido provocados por virus recombinantes que comparten genes de origen humano y aviar y por lo tanto es importante considerar el rol que han tenido los virus de origen aviar en la transmisión de la enfermedad y en la emergencia de pandemias de Influenza en el hombre.

En mayo de 1997 en Hong Kong, se aísla H5N1 de un niño que sufre un cuadro de neumonía fatal. A partir de entonces y hasta fines de 1997 se reportan otros 18 casos provocados por el mismo virus, el cual se caracteriza por no ser recombinante y estar constituido solamente por genes de origen aviar. Es a partir de entonces que se considera al AIV como un agente capaz de causar graves pérdidas a la avicultura y también poseer potencial para transmitirse y diseminarse al hombre (Horimoto y Kawaoka, 2001).

Los virus de influenza tipo A se pueden subtipificar de acuerdo con los antígenos de superficie del virus, Hemaglutinina y Neuraminidasa, en 16 subtipos H (H1-H16) y 9 subtipos N (N1-N9). Los virus que provocan enfermedad clínica en las aves de corral están asociados a los subtipos H5 y H7. Los virus que

provocan enfermedad clínica leve con baja mortalidad se denominan virus de baja patogenicidad (LPAI) y los muy virulentos de alta patogenicidad (HPAI).

1.2.1. HISTORIA

Según Easterday y col. (1997), la Peste Aviar fue descrita por primera vez como una enfermedad grave de los pollos en Italia en 1878. En 1901, Centanni y Savunozzi comprobaron que el agente etiológico era un agente filtrable.

En 1955 se demostró que la Peste Aviar era provocada por el Virus de Influenza tipo A. Los virus H7N1 y H7N7, relacionados con el aislamiento original de peste aviar, causaban brotes de la enfermedad con alta mortalidad afectando a pollos, pavos y otras especies en diversas partes del mundo.

En Escocia en 1959, se detecta el subtipo H5 (H5N1) en pollos y en golondrinas provocando severos perjuicios económicos. En ese entonces se sostenía que ambos subtipos H5 y H7 eran altamente virulentos. Posteriormente se demuestra que esto no era así ya que en Oregon en 1971 se aisló en pavos un subtipo H7 avirulento. A partir de entonces, se han aislado virus H5 y H7 avirulentos de diversas especies de aves domésticas y salvajes, en varias partes del mundo (Easterday y col, 1997).

Posteriormente se reportan escasos brotes de HPAI, como por ejemplo el sucedido en Australia en 1975 y en 1985, Inglaterra en 1979 y en Irlanda y EEUU en 1983-84 en donde se describe por primera vez la mutación del virus H5N2 de baja patogenicidad a un virus de alta patogenicidad. Gracias a las estrictas medidas sanitarias adoptadas se erradicó la enfermedad pero no se pudo eliminar la circulación del virus de baja patogenicidad que aun se aislaba en las granjas avícolas y en las ferias de aves vivas.

A finales del año 1993 México reporta la aparición de una enfermedad en aves de corral con signos similares a los de la Influenza Aviar, y se aísla un H5N2 de baja patogenicidad similar al aislado en EEUU. A fines de 1994 y comienzos del año siguiente se comunica un brote de HPAI que afectó a millones de aves de corral en varios estados de México. Se adopta como medida de control, la vacunación de las aves con vacuna inactivada, lográndose bajar significativamente la incidencia de la enfermedad. Sin embargo, en base a estudios serológicos

efectuados a la población centinela sin vacunar, se pudo comprobar la circulación de LPAI (Easterday y col, 1997).

A partir del primer aislamiento de Influenza Aviar en pavos en EEUU en 1963 se han registrado varios brotes de importancia en esta especie a menudo causada por la transmisión interespecie entre aves silvestres acuáticas y pavos. Es interesante mencionar otra transmisión inter-especie en la década del 80, mamífero-ave, del virus H1N1 del cerdo a los pavos provocando enfermedad respiratoria y pérdidas en la producción de huevo, y de patos silvestres a los cerdos.

A partir de los 70 se reconoce al grupo de las aves silvestres acuáticas migratorias, especialmente patos y aves de orilla, como el principal reservorio de todos los subtipos H y N de Virus de Influenza A.

Durante los años 90 se ha recuperado virus en mamíferos como ballenas, focas y visones, lo que demuestra la transmisión natural del virus de las aves a los mamíferos lo cual puede provocar enfermedades importantes en los mismos (Easterday y col, 1997).

Actualmente, emergen y re-emergen brotes de AI tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Capua y Alexander, 2010). A su vez se han reportado diversos subtipos de LPAI en aves silvestres, lo que no debe llamar la atención ya que las mismas constituyen el reservorio natural del virus. La transmisión y la generación de brotes de estos virus a la avicultura dependerán del nivel de bioseguridad de las granjas expuestas y de las características del virus. Por tal motivo el código de la OIE no impone cambios en el status sanitario de aquellos países que notifican aislamientos de virus de alta y baja patogenicidad en aves silvestres. Desde el 2009 se han reportado varios brotes de Influenza Aviar notificable (NAI) en países desarrollados como Gran Bretaña (H7N7, HPNAI), Alemania (H5N3, LPNAI) y Japón (H7N6, LPNAI), lo que indica que la introducción del virus no puede ser evitada ni siquiera en aquellos países tecnológicamente avanzados. Por otro lado las epizootias provocadas por el H5N1 aun no han sido controladas, y se han descrito casos humanos (que hasta el presente a afectado a 411 personas con 256 casos fatales) en China, Vietnam y Egipto. También se han reportado brotes de H5N1 en aves de corral y en aves silvestres en Bangladesh, China, Alemania, India, Laos, Nepal, Nigeria, Tailandia, Togo y Vietnam. Estos hechos fundamentan la hipótesis de que H5N1 persiste en forma endémica en la avicultura en amplias regiones del mundo.

1.2.2. ETIOLOGÍA

El Virus de Influenza Aviar o Virus de Influenza tipo A (AIV) junto con los demás virus de Influenza pertenece a la familia Orthomixoviridae y se caracteriza por poseer un tamaño mediano (80-120 nm de diámetro), ser pleomórfico (forma esférica o filamentos de longitud variable), estar constituido por 8 segmentos RNA monocatenarios de polaridad negativa, presentar simetría helicoidal y estar cubierto por una envoltura con proyecciones glicoproteicas con actividad de hemaglutinina y neuraminidasa.

En base a las propiedades antigénicas de las proteínas internas del virus, proteína M y nucleoproteína, se reconocen 3 tipos de Virus de Influenza: Tipo A, B y C. Los tipos B y C son típicos de los humanos, mientras que el tipo A se encuentra en las aves, cerdos, equinos y ocasionalmente en otros mamíferos como focas, ballenas y visones.

De acuerdo con las características antigénicas de las proteínas de superficie, Hemaglutinina y Neuraminidasa, los virus tipo A se clasifican en 16 y 9 subtipos diferentes respectivamente.

Hasta la fecha, los virus muy virulentos de la gripe tipo A, que producen una enfermedad clínica aguda en los pollos y pavos, solamente se han asociado con los subtipos H5 y H7. (Organización Mundial de Sanidad Animal OIE, 2006b).

En las aves de corral, hay dos formas de presentación de la enfermedad: la Influenza Aviar de Baja Patogenicidad que presenta síntomas, muchos de ellos compatibles con otras enfermedades de las aves, tales como estado febril, enfermedad respiratoria leve y disminución de la producción de huevos y la Influenza Aviar de Alta Patogenicidad que se caracteriza por su aparición repentina, con alta mortandad de las aves.

1.2.2.1. Estructura del virus

La envoltura del virión presenta dos glicoproteínas de superficie, La Hemaglutinina (HA), y la Neuraminidasa (NA), tal como lo muestra la figura 7.

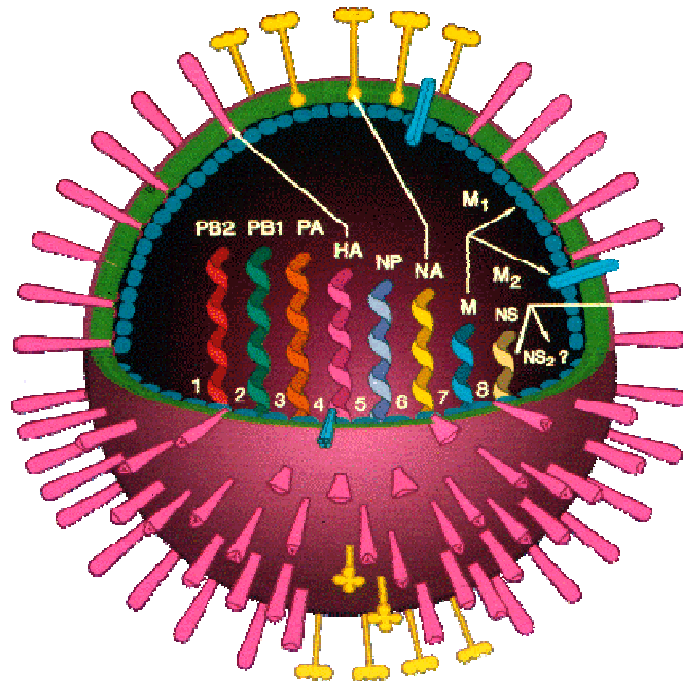


Figura 7. Diagrama esquemático del Virus de Influenza Aviar Se muestra a la membrana lipoproteica integrada por la HA y la NA. Por debajo de la envoltura del virión, se encuentra la las proteínas M1 y M2 que, junto a NP y a las tres proteínas de la Polimerasa viral PB1, PB2 y PA, rodean al RNA viral. El genoma viral está compuesto por 8 segmentos de RNA que codifican 10 proteínas, 8 estructurales (HA, NA, M1, M2, NP, PA, PB1, y PB2) y 2 no estructurales (NS1 y NS2) las cuales son codificadas por los segmentos de RNA más chicos. Fuente: Fusaro, 2009.

La Hemaglutinina (figura 8) se presenta como un trímero en forma de bastón y su monómero consiste en una cabeza globular conectada a un tallo constituido por dos péptidos denominados HA1 y HA2. HA1 se une a los receptores sialo-oligosacáridos de la membrana de la célula huésped y tiene actividad hemaglutinante. El segmento HA2 constituye el sitio de anclaje y su extremo amino terminal se denomina péptido de Fusión (Tollis y Di Trani, 2002). La cabeza globular contiene el sitio de unión al receptor de la membrana de la célula huésped y presenta cadenas laterales de carbohidratos cuyo número y posición varían con la cepa de virus. Los anticuerpos contra esta glicoproteína tienen acción neutralizante jugando un papel importante en la protección contra la infección viral.

La Hemaglutinina tendría el rol más importante para determinar la virulencia de AIV. Para que el virus sea infeccioso es necesario

que la proteína precursora HA0 se clive en HA1 y HA2 debido a que la fusión con la célula está mediada por el extremo libre aminoterminal de HA2. Dicha escisión es protagonizada por las proteasas del hospedador. Las proteasas se dividen en dos grupos: el primero constituido por las enzimas tipo tripsina localizadas en lugares específicos del organismo como el tracto digestivo y respiratorio. El segundo grupo está integrado por proteasas ubicuas que escinden aquellas HA0 con múltiples aminoácidos básicos en su sitio de clivaje.

La HA0 de los virus de LPAI es escindida por las proteasas extracelulares tipo tripsina, mientras que la HA0 de los virus de HPAI lo son por las proteasas ubicuas. La presencia de múltiples aminoácidos básicos *upstream*, y la ausencia de cadenas laterales de carbohidratos en el sitio de clivaje de la Hemaglutinina, permiten que la misma sea escindida por varios tipos de endoproteasas, entre las cuales se encuentra la furina. La mayoría de los HPAI que presentan estas características, pertenecen a los subtipos H5, H7 y H10, mientras que los LPAI solo presentan residuos básicos en las posiciones -1 y -4 para los subtipos H5 y -1 y -3 para los subtipos H7.

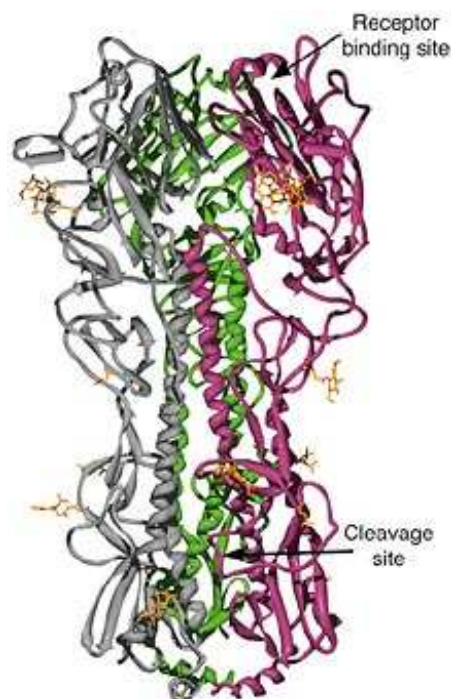


Figura 8. Hemaglutinina del virus de influenza AH1N1 de 1918. Esta proteína está compuesta por tres subunidades iguales (homotrímero). En la parte superior se encuentra el sitio de unión al receptor celular ácido siálico (receptor binding site). El sitio de clivaje (cleavage site) se encuentra en la parte inferior. Fuente: Stevens, 2010.

La NA que es un tetrámero con forma de hongo, presenta un tallo hidrofóbico que se ancla en la membrana y una cabeza globular que contiene los sitios enzimático y antigénico. Actúa sobre el ácido neuramínico de la membrana celular permitiendo la liberación de los viriones de la célula infectada. Los anticuerpos contra NA también tienen un rol en la protección evitando la diseminación del virus de las células huéspedes. La Hemaglutinina y la Neuraminidasa junto a una pequeña proteína denominada M1 se encuentran incluidas en la membrana lipídica del virus.

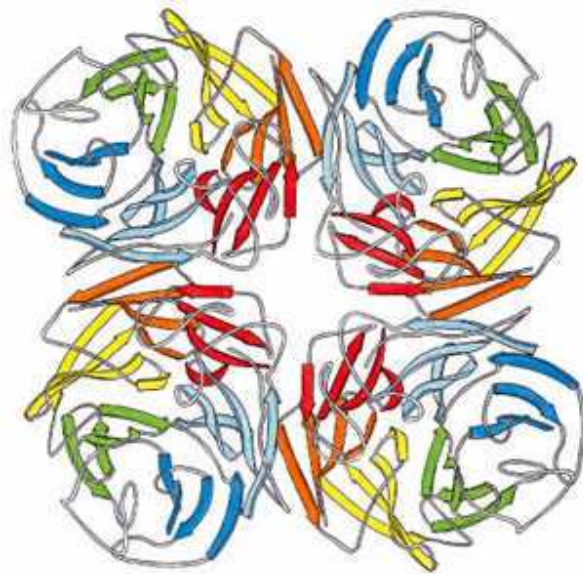


Figura 9. Vista superior Neuraminidasa. La neuraminidasa es una enzima que permite a un virus cruzar las paredes celulares. La neuraminidasa también se llama sialidasa porque disuelve los enlaces químicos entre el ácido siálico y las glicoproteínas o glucolípidos que se encuentran en las paredes celulares. Hay 9 subtipos de neuraminidasa con designaciones numéricas de N1 hasta N9. Las moléculas de neuraminidasa forman unas proyecciones sobre la superficie del virus de la gripe en forma de hongo. La parte superior consiste de cuatro proteínas idénticas con una forma aproximadamente esférica. La siguiente imagen muestra cómo cada una de estas unidades se encuentra girada 90 grados con respecto al centro de la estructura. Fuente: Scientific Psychic, 2010.

Por debajo de la envoltura del virión, se encuentra la mayor proteína estructural, la proteína M que, junto a la nucleoproteína (NP) y a las tres proteínas de la Polimerasa viral (PB1, PB2 y PA), rodean al RNA viral.

El genoma viral está compuesto por 8 segmentos de RNA que codifican 10 proteínas, 8 estructurales (HA, NA, M1, M2, NP, PA,

PB1, y PB2) y 2 no estructurales (NS1 y NS2) las cuales son codificadas por los segmentos de RNA más chicos.

El carácter segmentado del genoma viral determina la posibilidad de que los segmentos de RNA se puedan reordenar durante la replicación cuando ocurre una infección simultánea con diferentes virus de Influenza Aviar. Mediante este mecanismo se han detectado aparición de nuevos subtipos antigénicos en infecciones mixtas en poblaciones de patos silvestres en la naturaleza. De esta manera se explica la aparición de nuevas cepas pandémicas de AIV en humanos producto de recombinación genética de virus de aves y humanos.

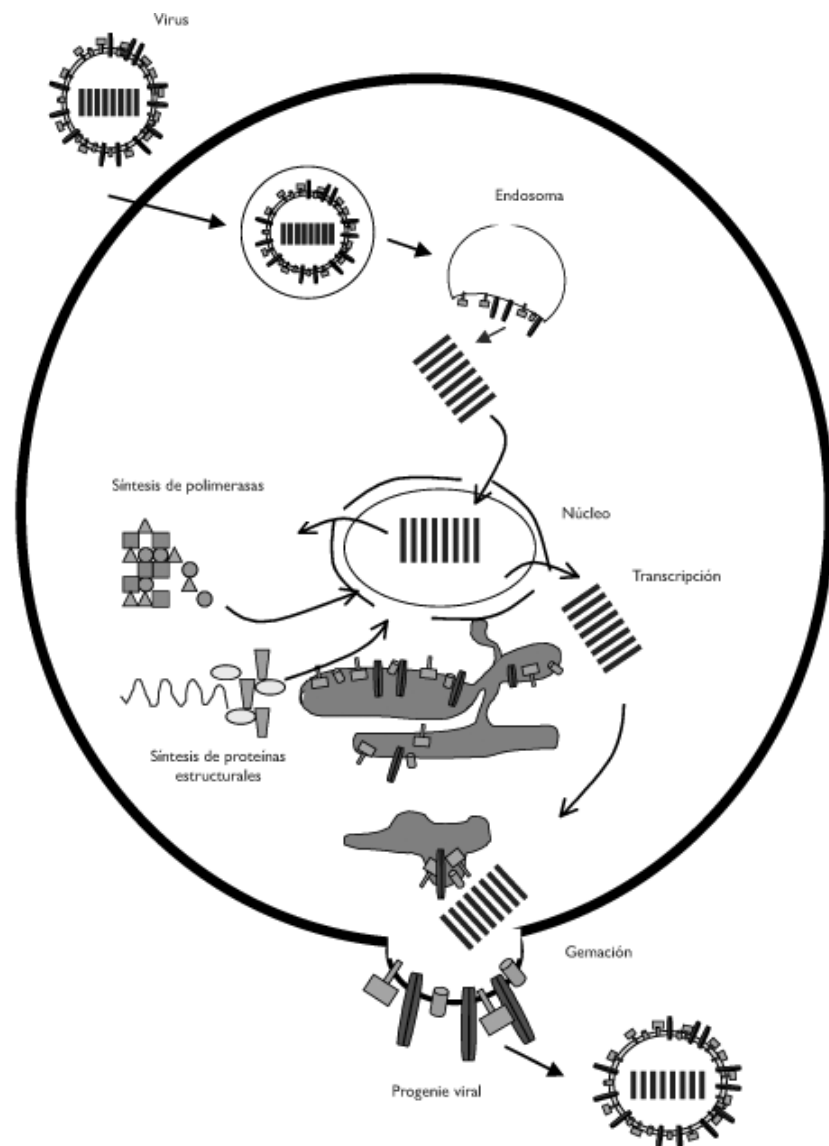
También existe otra forma de determinar la variabilidad de AIV y es la provocada por mutaciones puntuales de la secuencia genética lo que genera el surgimiento de nuevas variantes antigénicas del virus.

1.2.2.2. Ciclo de replicación viral

El virus se adsorbe a la membrana celular mediante la unión a receptores que contienen ácido siálico y es introducido al interior de la célula por un proceso de endocitosis. La Hemaglutinina sufre un cambio conformacional e inicia el proceso de fusión lo que desencadena la liberación de la nucleocápside en el interior del núcleo de la célula (Figura 10).

Una endonucleasa viral escinde el extremo 5' CAP de los RNA mensajeros de la célula y éstos son usados como primers de la transcripción viral efectuada por la transcriptasa viral. De esta manera se generan 6 RNA mensajeros monocistrónicos que codifican la síntesis de HA, NA, NP, PA, PB1 y PB2. Los dos RNA mensajeros de NS y M, se forman por solapamiento genético, y se transcriben en marcos de lectura diferentes y como consecuencia de ello se realiza la síntesis de NS1, NS2, M1, y M2. La HA y la NA se glicosilan en el Aparato de Golgi y son transportadas a la membrana celular donde quedan incluidas.

Una vez que se sintetizaron y se ensamblaron las proteínas virales y el RNA genómico, los viriones resultantes son excretados fuera de la célula por un mecanismo de brotamiento.



*iere a los receptores
 dadora. Penetra a la
 ápside al citoplasma.
 l núcleo celular para
 proteínas virales se
 el Aparato de Golgi.
 mentos de RNA viral
 por un proceso de*

1.2.2.3. Bases moleculares de la patogenicidad

El fenómeno de patogenicidad es muy complejo y no se puede explicar por el origen del huésped o por el subtipo antigénico del virus. Los subtipos H5 y H7 están asociados a aislamientos de virus de alta patogenicidad en pollos, pavos, patos y golondrinas. Sin embargo existen otros subtipos H5 y H7 que se clasifican como de baja patogenicidad.

Un virus muy patógeno para una especie puede no serlo para otra. Por ejemplo, el virus pavo/Ontario/7732/66 es muy virulento en pavos y pollos (mortalidad del 100%) pero es avirulento para los patos.

Es importante considerar que las diferentes especies tienen distintos receptores para los virus lo cual podría explicar el rango de hospedadores, el tropismo celular y la patogenicidad de los diferentes virus.

Las bases moleculares de la patogenicidad estarían determinadas por varios genes, en especial los que codifican la Neuraminidasa y la Hemaglutinina (especialmente el sitio de clivaje). Los HPAI tienen la particularidad de que su Hemaglutinina es escindida por diferentes proteasas en diferentes tejidos del organismo, y presenta múltiples aminoácidos básicos en el extremo carboxilo terminal de HA1. Sin embargo los H5N2 de alta y baja patogenicidad aislados en el brote de Pensilvania de 1983 tienen múltiples aminoácidos en el sitio de clivaje de la Hemaglutinina, pero se diferencian entre sí porque los de baja patogenicidad tienen cadenas laterales glicosiladas lo que impediría la acción enzimática de algunas proteasas.

Además las cepas virulentas se diferencian de las avirulentas por la actividad de los canales iónicos de la proteína M2 lo cual podría evitar cambios conformacionales de la Hemaglutinina a pH ácido durante la escisión de la misma a nivel intracelular.

1.2.3. SIGNOS CLÍNICOS

Los signos clínicos son extremadamente variables y depende de la especie afectada, edad, enfermedades concurrentes, virus, condiciones ambientales, etc.

Los signos pueden ser de tipo respiratorio, entérico, nervioso o reproductivo. En algunos casos la enfermedad se presenta en

forma fulminante provocando la muerte en pocas horas sin manifestación de signos clínicos.

La gravedad de la enfermedad puede estar determinada por la especie afectada. Por ejemplo en el brote de Influenza H5N8 en 1987 en Irlanda, hubo alta mortalidad en los pavos mientras que la misma no afectó a los patos a pesar de que los mismos jugaron un rol importante en la trasmisión de la enfermedad.

También la gravedad de la enfermedad dependerá del patotipo actuante de virus. Por ejemplo en el brote de Influenza Pennsylvania en 1987 la enfermedad comenzó por presentarse en forma leve con baja mortalidad y terminó siendo grave debido a la mutación del virus de baja patogenicidad a alta patogenicidad, con una mortalidad de 50-80% con manifestación de cuadros respiratorios severos.

1.2.4. DIAGNÓSTICO

1.2.4.1. Detección virológica

Aislamiento viral

De acuerdo con lo descrito por el Manual de la OIE (OIE, 2006), el virus de Influenza Aviar se aísla mediante la inoculación de una suspensión obtenida de hisopados traqueales y/o cloacales y de tejidos procedentes de aves infectadas, en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de pollo de 9-11 días de edad y se incuba a 37°C durante una semana. Finalmente, se colecta el líquido alantoideo de los mismos para detectar actividad hemaglutinante por la prueba de Hemaglutinación (HA).

Identificación

La presencia del virus en el líquido alantoideo con actividad hemaglutinante se determina por la prueba de Inmunodifusión en gel agar (IDGA) usando un antisuero que reconoce los antígenos de la matriz y de la nucleocápside comunes en la totalidad de los subtipos de Influenza A.

La subtipificación se realiza mediante las pruebas de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) para reconocer a los 16 subtipos H y de la Inhibición de la Neuraminidasa (NI) para identificar a los 9 subtipos N usando antisueros específicos.

1.2.4.2. Detección molecular

La detección de influenza aviar también se realiza por la técnica de RT-PCR usando cebadores específicos que reconocen secuencias conservadas de los genes de las proteínas de la nucleocápside y de la matriz (Munhoz Suarez y col., 2005; Fouchier y col., 2000 respectivamente). A su vez, los virus detectados se pueden subtipificar usando cebadores que amplifican secuencias de los genes de las proteínas virales de los subtipos H5 y H7 (Spackmann y col., 2002, Munch y col., 2001).

1.2.4.3. Detección serológica

Las pruebas de ELISA e Inmundefusión en gel agar (IDGA), permiten tipificar al virus (tipo A, B o C) ya que todos los virus de un mismo tipo presentan antígenos de la nucleocápside y de la matriz similares (OIE, 2006b). Ambas técnicas se han utilizado en los programas de vigilancia seroepidemiológica de la enfermedad en aves de corral siendo usada el ELISA como prueba tamiz (debido a su alta sensibilidad) y la IDGA como prueba confirmatoria (debido a su mayor especificidad).

La prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI), permite identificar anticuerpos contra los 16 subtipos H mientras que la prueba de Inhibición de la Neuroaminidasa detecta anticuerpos contra los 9 subtipos N del virus de la IA (OIE, 2006b).

1.2.4.4. Determinación de Patogenicidad

Pruebas biológicas

Índice de patogenicidad intravenosa (IVPI). Se inocula por vía intravenosa 0,1 ml. de líquido alantoideo con un título > 1/16, a 10 pollos de 6 semanas de edad y se observan diariamente durante 10 días consecutivos. A las aves sanas se les adjudica un puntaje de 0, a las enfermas 1, muy enferma 2 y a las muertas 3. Un índice de 3 indica que todas las aves murieron en un lapso de 24 hs, mientras que un índice igual a 0 significa que ninguna ave mostró signos clínicos durante los 10 días de observación.

Pruebas moleculares

Se puede determinar la patogenicidad por técnicas moleculares ya que los virus de alta patogenicidad presentan múltiples aminoácidos básicos en el sitio de corte de la hemaglutinina.

La OIE ha adoptado los siguientes criterios para clasificar los virus de Influenza Aviar como muy patógenos:

- Cualquier virus que es letal para más de 6 de un total de 8 pollos de 4-8 semanas de edad, después de los 10 días post-inoculación por vía intravenosa con una suspensión 1/10 del líquido alantoideo infectivo.
- Si mueren menos de 6 y si el virus es del subtipo H5-H7 se debe determinar si produce efecto citopático a cultivos celulares sensibles a influenza aviar en ausencia de tripsina.
- Si no hay crecimiento el aislamiento no se considera de alta patogenicidad.
- Si no mata a los pollos pero el virus es del H5 o H7 y produce efecto citopático a cultivos celulares en ausencia de tripsina se debe determinar la secuencia de aminoácidos de sitio de clivaje de la hemaglutinina.

La Unión Europea define a la Influenza Aviar de alta patogenicidad como la infección de las aves causada por un virus de influenza tipo A que tiene un índice de patogenicidad intravenosa (IVPI) $>1,2$ en pollos de 6 semanas de edad o cualquier infección con virus de tipo A de los subtipos H5 y H7 en lo que la secuenciación de nucleótidos ha demostrado presencia de múltiples aminoácidos básicos en el sitio de corte de la Hemaglutinina.

1.2.5. TRASMISIÓN Y DISEMINACIÓN

La transmisión de AI de las aves silvestres acuáticas a otras especies es un hecho que sucede con un grupo muy limitado de subtipos de virus en un lapso de tiempo prolongado. Un ejemplo lo constituye el caso de aislamiento de H7N7, H4N5, H4N6 y H3N3 en focas que padecieron neumonía fatal. La transmisión accidental de AI de las focas al hombre es otro caso de transmisión aves hombre por intermedio de otros hospedadores.

También se ha aislado en ballenas, virus H1N3 relacionado con virus de origen aviar, y virus H13N2 y H13N9 genéticamente relacionados con aislamientos en gaviotas. A su vez se ha reportado aislamientos de H10N4 en brotes de AI en granjas de visones en Suecia en el año 1990, estaban vinculados con virus de origen aviar.

En 1989, durante un severo brote de AI en equinos en China se aisló H3N8 y se comprobó su origen aviar mediante estudios genéticos e inmunológicos. También se ha demostrado la transmisión de H1N1 de aves a los cerdos en Europa en 1981 y 1983, Canadá en 1999 y China en 1996, 1998 y 2000.

En 1993 se aisló en cerdos un virus recombinante que presentaba genes de proteínas internas de H1N1 de origen aviar y genes de las glicoproteínas de superficie de H3N2 de origen humano y que posteriormente estos virus recombinantes fueron aislados en niños en Holanda en 1993. Este hallazgo comprueba el rol de la especie suina de vaso comunicante en la transmisión de la AI de las aves al hombre.

Existen evidencias genéticas de que en las dos últimas pandemias de 1957 y 1968 surgieron virus recombinantes que poseían genes de origen aviar. Por otra parte se ha reportado la transmisión directa de H7N7 de las aves al hombre.

En 1997 en Hong Kong se registraron 18 casos de AI en el hombre transmitidos por el contacto con aves infectadas con HPAI H5N1. El virus aislado estaba constituido en su totalidad por genes de origen aviar y el gen de Ho presentaba múltiples aminoácidos básicos en el sitio que codifica el clivaje de la hemaglutinina. Posteriormente, en 1999, se aísla de humanos H9N2 que contenían genes de proteínas virales internas idénticos a H5N1 dando sustento a la potencial transmisión interespecie de AI.

Aun no se ha esclarecido bien la causa del rango restringido de hospedadores para la AI. Se cree que el principal factor es la presencia de receptores específicos de especie de ácido siálico para unirse a la hemaglutinina viral. La hemaglutinina viral de origen aviar se une al receptor específico alfa 2-3 sialo-oligosacárido en donde el ácido siálico se une a la galactosa por puentes 2-3. En cambio la hemaglutinina de los virus de origen humano se une a los receptores de sialo-oligosacáridos que tienen puentes alfa 2-6. Sin embargo los H5N1 aislados en el hombre en Hong Kong se unen a receptores con puentes 2-3 alfa galactosa lo que indica que existen otros productos genéticos que determinan el rango de huéspedes. A su vez los cerdos presenta ambos

receptores, lo que explicaría su susceptibilidad a la infección por virus de origen aviar y humano a la vez. (Tollis y Di Triani, 2002).

1.2.6. RESERVORIO DEL VIRUS EN AVES SILVESTRES

Las aves silvestres acuáticas (orden Anseriformes) y aves playeras (Orden Charadriiformes) parecen ser los reservorios naturales para el virus de la Influenza tipo A, y las infecciones cursan generalmente de forma asintomática. (Rovid Spickler, 2009). La transmisión a través de la ingestión de agua contaminada por materia fecal es la principal vía de diseminación del virus entre las aves acuáticas silvestres.

1.2.7. SITUACIÓN DE LA ENFERMEDAD EN AMÉRICA DEL SUR Y EN NUESTRO PAÍS

En América del Sur, hay un solo caso de Influenza Aviar de alta patogenicidad ocurrido en aves de corral en Chile en abril de 2002, por el virus H7N3. Este foco fue rápidamente extinguido gracias a las medidas implementadas por las autoridades sanitarias del SAG (Servicio Agrícola Ganadero) en coordinación con los interesados.

También en Chile se reportó la aparición de un nuevo Virus de Influenza Aviar H1N1 en una granja de reproductores de pavos, y desapareció rápidamente de la población afectada (Mathieu y col., 2010; WAHID 2009c). Este virus presentaba características genéticas idénticas al nuevo virus pandémico que comenzó a circular en humanos y cerdos en el año 2009.

En Colombia, en un relevamiento seroepidemiológico en el año 2005 (Asociación Latinoamericana de Avicultura, 2009), se detectó por PCR y por serología el virus de Influenza Aviar Subtipo H9, de baja patogenicidad pero sin lograr aislamiento viral.

En el resto de los países de América del Sur, incluido Uruguay, no se ha reportado ningún caso de Influenza Aviar en las aves de corral, ni de baja ni de alta patogenicidad.

Los virus de Influenza aviar (AI) en especies silvestres se han aislado muy esporádicamente en Sudamérica. Se aisló una cepa del virus LPAI H7 en Bolivia en una especie de pato silvestre (*Anas cyanoptera*) que estuvo relacionado filogenéticamente con

la cepa del H7 aislada en Chile en 2002 en aves de corral (Spackman 2007). Las aves acuáticas son posibles reservorios de Influenza en Sudamérica, dado que en esta región hay anátidos emparentados con las especies del hemisferio norte.

La vigilancia extensiva realizada en aves silvestres en Argentina durante 2006-2007, permitió hacer 12 detecciones de virus de Influenza Aviar de 2895 muestras de hisopados cloacales por la técnica RRT-PCR. Dos muestras positivas a Influenza tipo A de baja patogenicidad (no H5 ni H7) pertenecían a dos especies de patos, cutirí (*Amazoneta brasiliensis*) y pato de collar (*Callonetta leucophrys*) capturados en el sur de Corrientes. El virus del subtipo H13N9 se pudo aislar de la gaviota cocinera (*Larus dominicanus*) capturada en la costa Sud-atlántica de Argentina. La caracterización de este virus revela cierta relación con aquellos aislados en Chile y Bolivia y muestran evidencias de evolución independiente con mínimo intercambio de genes con virus de Influenza de otras latitudes (Pereda, 2008).

Chile detectó 2 aislamientos de LPNAI en gaviotas (*Larus pipixcan* y *Larus dominicanus*), un H13N6 en el 2007 y un H5N9 en el 2008, mientras que Brasil reportó tres aislamientos de H3 LPNAI a partir de 1200 muestras colectadas durante los años 2006 y 2007 (Senne, 2010). Los aislamientos fueron realizados en gaviota (*Larus dominicanus*), chorlito enano (*Calidris pusilla*) y playero (*Actitis macularia*).

Uruguay reportó resultados negativos en 181 muestras de aves silvestres procesadas durante un monitoreo virológico molecular en el año 2008 (Días, 2010).

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS DE PARAMIXOVIRUS AVIAR Y VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN PALOMAS

2.1. PARAMIXOVIRUS DE LA PALOMA

2.1.1. HISTORIA

Las palomas domésticas (*Columba livia domestica*), junto con más de 300 especies de aves, pertenecen a la familia Columbidae. Esta familia está integrada por cinco especies diferentes: *Streptopelia turtur* y *Streptopelia decaorto* (torcazas), *Columba palumbus*, *Columba oenas* y *Columba livia* de la cual la paloma doméstica ha evolucionado genéticamente mediante un proceso de selección progresiva (Marlier y Vindevogel , 2006).

A partir de 1971 se registran los primeros casos de infección natural por el Paramixovirus Aviar tipo 1 en palomas mensajeras en Holanda, Gran Bretaña, Bélgica y Alemania durante la epizootia de la Enfermedad de Newcastle que devastó a la avicultura en Europa (Vindevogel,1988). Las aves infectadas presentaban sintomatología digestiva y nerviosa y los virus aislados de las mismas eran idénticos a las cepas clásicas velogénicas APMV-1 lo que indica que las palomas se infectaron al estar en contacto con las aves de corral enfermas.

En 1980 se aíslan cepas lentogénicas de APMV-1 de palomas con síntomas respiratorios y de acuerdo con investigaciones serológicas se determina que el 7% de las palomas mensajeras de Bélgica y el 19% en Francia, estaban infectadas sin mostrar signos clínicos de la enfermedad (Landre, 1982).

En 1981 se reporta, por primera vez en los países del Mediterráneo, una enfermedad en palomas mensajeras con características clínicas similares a la forma neurotrópica de la Enfermedad de Newcastle y el primer caso se publica en Bélgica donde se aísla un virus con características de APMV-1 en dos palomas mensajeras importadas de Italia (Kaleta, 1985).

En 1983, la enfermedad se extiende rápidamente por toda Europa, posiblemente debido a los contactos de las aves durante las competencias y por el intercambio comercial de las mismas.

En 1984, la paramixovirus de la paloma adquiere las características de panzootia y a partir de 1985 se propaga por todo el mundo (Alexander, 1997).

Con el desarrollo de una vacuna específica, en estos últimos años se ha logrado controlar la aparición de brotes en palomas aunque esta enfermedad se considera aun enzoótica en algunos países (Alexander, 2001; Liu, 2006)

Se han reportado aislamientos de APMV-7 avirulentos en palomas cuarentenadas y en palomas silvestres en Inglaterra, USA y Japón. También se ha aislado APMV-1 virulento durante brotes de Enfermedad de Newcastle en aves de corral y APMV-1 avirulento durante los períodos interepizooticos de la enfermedad. (Marlier y Vindevogel, 2006)

2.1.2. CARACTERÍSTICAS DEL PARAMIXOVIRUS DE LA PALOMA

2.1.2.1. Termoestabilidad de la hemaglutinina

La actividad hemaglutinante de PPMV-1 se mantiene luego de un tratamiento térmico a 56°C por un lapso igual o mayor a 30 minutos, mientras que las cepas lentogénicas La Sota y Hitchner B1 se inactivan antes de los 15 minutos (Biancifiori y Fiorini, 1983, Gelb y col., 1985).

2.1.2.2. Formación de placas

Los aislamientos de PPMV-1 producen efecto citopático al ser inoculados en cultivos primarios de embrión de pollo formando placas de 1,3-3,5 mm de diámetro después de las 96 hs. de incubación. Por otra parte las cepas mesogénicas y velogénicas (cepas Roakin y Texas GB respectivamente) forman placas de un diámetro de 2-4 mm y las lentogénicas (cepa La Sota) no desarrollan placas (Biancifiori y Fiorini, 1983, Gelb y col., 1985).

2.1.2.3. Caracterización antigénica

En un principio se sostuvo que el agente causal de la paramixovirus de la paloma era un Paramixovirus Aviar tipo 3, pero posteriormente mediante estudios serológicos de Inhibición de la Hemaglutinación (Biancifiori, 1983; Alexander, 1984) se determinó que los aislamientos realizados de palomas mensajeras con enfermedad clínica en diferentes países de

Europa eran similares y pertenecían al serotipo 1. Los virus aislados de las palomas se distinguen del Paramixovirus Aviar tipo 1 clásico (APMV-1), por presentar títulos significativamente diferentes (Alexander, 1984).

La caracterización antigénica se puede determinar mediante el estudio de la reactividad del virus con un panel de anticuerpos monoclonales (mAbs) producidos para reconocer epítopes específicos de las diferentes proteínas virales.

Alexander y col. (1984) mediante esta técnica logra diferenciar las cepas de Paramixovirus Aviar aisladas en palomas de las clásicas por la reactividad con solo tres (481 F, 38 NP y 479 NP) de los nueve anticuerpos monoclonales producidos contra la cepa lentogénica Ulster C de NDV.

Pearson y col. (1987), corroboran que siete de ocho cepas aisladas en palomas en Estados Unidos son similares a las europeas al reaccionan en forma idéntica con los anticuerpos monoclonales 481, 38 y 479.

Gelb y col. (1985) distinguen dos aislamientos procedentes de palomas como diferentes antigénicamente a las cepas de la Enfermedad de Newcastle porque no reaccionan con el anticuerpo monoclonal 2F12 específico de las cepas de APMV-1 en las pruebas de HI.

En un estudio posterior (Alexander y col., 1997), se examinaron un total de 1525 viriones de Paramixovirus Aviar tipo 1 usando un panel con nueve mAbs, y 818 de los mismos fueron estudiados con un panel adicional de 17 mAbs. Los mAbs fueron producidos contra las cepas Ulster 2C y Pigeon/England/617/83 y se estudió su reactividad con los diferentes péptidos virales: Nucleoproteína (NP), Fosfoproteína (P), Matriz (M), péptido de fusión (F), Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN) (ver tabla 1).

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales (mAbs) y su reactividad con los polipéptidos virales

<i>MAbs produced against Ulster 2C</i>									
Code	a	b	c	d	e	f	g	h	i
mAb	14	32	38	86	424	445	479	481	688
Viral polypeptide	HN	HN	NP	HN	M?	HN	NP	F	P

<i>MAbs produced against Ulster 2C</i>											
Code	j	k	l	m	n	o	p	q	r	t	v
mAb	U11	U23	U32	U45	U49	U53	U57	U67	U68	U70	U85
Viral polypeptide	HN	F	NP	F	HN	HN	HN	HN	HN	F	HN

<i>MAbs produced against pigeon/England/617/83</i>						
Code	w	x	y	z	£	§
mAb	3/617	38/617	43/617	54/617	161/617	165/617
Viral polypeptide	NP	NP	NP	F	HN	HN

○ = reactividad del mAb con las proteínas virales de PPMV-1 HN, F y NP. Fuente: Alexander y col., 1997.

Los 1525 virus fueron clasificados en 15 grupos antigénicos en base al panel de nueve mAbs producidos contra la cepa Ulster 2C (mAb a al i). La mayoría de los aislamientos del grupo antigénico P (tal como lo muestra la tabla 2) correspondían a palomas. También se incluyeron en el mismo grupo aislamientos obtenidos de otros huéspedes que fueron infectados como resultado de la diseminación del virus por palomas silvestres y mensajeras infectadas.

Tabla 2. Propiedades de los NDV agrupados usando panel de 9 mAbs.

Group	Binding of mAbs ^a a b c d e f g h i	In group	with virulence			Main host (number)	Year of isolation of:	
			High ^b	Medium ^c	Low ^d		Earliest	Most recent
A	+++--+-	31	31	—	—	Chickens (21)	1970	1992
B	+++--+-	159	156	3	—	Chickens (81)	1933	1995
C1	++++-+-	116	115	1	—	Chickens (68)	1968	1994
C2	++++-+-	11	—	—	11	Waterfowl (7)	1976	1994
D	+++++-	18	4	11	3	Chickens (9)	1940	1993
E	+++++-	284	—	—	284	Chickens (253)	1948	1995
F	+++++-	10	—	—	10	Chickens (5)	1949	1989
G & Q	+++++-	60	—	—	60	Waterbirds (44)	1966	1992
H	---+-	43	1	—	42	Waterbirds (36)	1972	1993
L	+++++-	12	—	—	12	Waterbirds (9)	1972	1995
I	---+-	26	26	—	—	Chickens (13)	1971	1993
P	---+-	625	—	variable	—	Pigeons (580)	1978	1995
NP	++++-	77	77	—	—	Chickens (36)	1991	1994
PORT	---+-	54	54	—	—	Chickens (44)	1991	1995

Fuente: Alexander y col., 1997.

Los aislamientos de los virus responsables de la panzootia en las palomas mostraron homogeneidad antigénica. Según lo evaluado con el panel de 26 mAbs, 145 de los 158 virus ubicados en el grupo P pertenecían al patrón 32 (ver tabla 3). Los autores consideraron que el mAb 161/617 era específico para detectar PPMV-1 en la prueba de HI debido a que reaccionó con todos los virus del grupo antigénico P con excepción de 10 virus pertenecientes al patrón antigénico 34 y 36.

Tabla 3. Patrón de unión para las diferentes cepas y aislamientos de NDV usando el panel ampliado de 26 mAbs.

Pattern 9-mAb no. ^a	Group ^b	Binding of mAbs:																				Number ^c						
		a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r	t	v	w	x	y	z	£	\$	
32	P	--	+	--	--	--	+	+	--	--	+	+	+	+	--	+	--	+	--	+	--	+	--	+	--	+	--	145
33	P	--	+	--	--	--	+	+	--	--	+	+	+	+	--	+	--	+	--	+	--	+	--	+	--	+	--	3
34	P	--	+	--	--	--	+	+	--	--	+	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	2
35	P	--	+	--	--	--	+	+	--	--	+	+	+	+	--	+	--	+	--	+	--	+	--	+	--	+	--	5
36	P	--	+	--	--	--	+	+	--	--	+	+	+	+	--	+	--	+	--	+	--	+	--	+	--	+	--	3

Fuente: Alexander y col., 1997.

La principal utilidad de los mAbs radica en el estudio de las diferencias y similitudes entre los aislamientos en el transcurso de una epizootia.

Un ejemplo de aplicación de los mAbs, fue el estudio realizado por Werner y col. (1999), quienes caracterizaron antigénicamente 635 aislamientos de Paramixovirus Aviar tipo 1 obtenidos de aves de corral, aves exóticas y palomas durante el período

comprendido entre los años 1992-1996. Este autor utilizó un panel de anticuerpos monoclonales producidos para reconocer a las cepas velogénicas, mesogénicas y lentogénicas de virus de la Enfermedad de Newcastle (APMV-1) y a las cepas de Paramixovirus de la paloma (PPMV-1). De esta manera caracteriza aislamientos obtenidos de las palomas como PPMV-1, y APMV-1 lentogénico (cepa La Sota). Comprueba que el mAb 39 preparado contra PPMV-1 aislado en Alemania presenta la misma reactividad que el mAb 161/617 en los ensayos de HI.

Por otro lado, mediante el estudio con los mAbs, fue posible determinar que las palomas mensajeras infectadas por la variante de NDV provocaron la epizootia de la Enfermedad de Newcastle en aves de corral en 1984 en Gran Bretaña y en 1991 en Irlanda.

Finalmente, fue en base al patrón específico de reactividad con mAbs de los virus aislados en las palomas mensajeras de todo el mundo que se le confirió el carácter de panzootia a esta enfermedad.

2.1.2.4. Caracterización biológica

Como se mencionó anteriormente la patotipificación del agente es de suma importancia debido a que la misma va a indicar el poder patógeno del agente en las aves de corral. En ese sentido, una de las pruebas biológicas más utilizadas es el ICPI la cual ha caracterizado a los PPMV-1 en diversas áreas geográficas como mesogénicos, aunque también se reportan cepas lentogénicas y velogénicas aunque en menor proporción.

Por ejemplo, los aislamientos de PPMV-1 realizados en Italia, y la mayoría de los aislamientos realizados en Bélgica, Francia y Alemania en 1983 y 1984 se caracterizaron como mesogénicos para los pollos (Alexander y col., 1984, Werner y col., 1999).

En América del Norte también se han comunicado aislamientos de cepas mesogénicas de PPMV-1. Pearson y col. (1986) estudiaron la patogenicidad de 44 aislamientos de PPMV-1 obtenidos de palomas en cautiverio (excepto una silvestre) con sintomatología clínica en varios estados de USA. Estas cepas presentaban un ICPI compatible con las cepas mesogénicas (0,89-1,64), excepto dos que fueron lentogénicas (0,06 y 0,29).

También Kim y col. (2008) caracterizaron biológicamente 15 aislamientos de PPMV como mesogénicas con un ICPI entre 0,98 a 1,35. Dichos aislamientos se obtuvieron durante un programa de

vigilancia de la enfermedad del Nilo del Oeste entre los años 2000 al 2007 donde se colectaron 5608 muestras de cerebro de aves muertas recolectadas en espacios públicos en Rhode Island y en el Oeste de Texas.

Con respecto a estudios realizados en América del Sur, el primer aislamiento de PPMV-1 de palomas silvestres se realizó en Argentina (Zanetti y col., 2001), y fue caracterizado como una cepa mesogénica con un ICPI de 1,29.

A su vez en el continente asiático también se han caracterizado PPMV-1 y en un estudio en palomas enfermas en China durante el periodo 1996-2005, once aislamientos de PPMV-1 resultaron mesogénicos y dos fueron velogénicos. Solo un aislamiento se identificó como una cepa lentogénica vaccinal tipo La Sota.

Estas pruebas biológicas presentan el inconveniente de que cuando se caracterizan los PPMV-1, las mismas resultan ser muy variables y no presentan resultados concordantes entre sí.

Por ejemplo, Gelb (1984) al usar la prueba MDT caracteriza dos aislamientos realizados en palomas de carrera en Estados Unidos de América como lentogénicas, pero resultaron mesogénicas con la prueba de ICPI. También determinan que dichos aislamientos de palomas, se comportaron como mesogénicas o velogénicas (100% de mortalidad), cuando fueron inoculadas por vía intratraqueal a pollitos de un día de edad. Sin embargo, las mismas resultaron lentogénicas (infección con 0% de mortalidad) cuando se inoculan por la misma vía a pollos de 15 días de edad.

Por otra parte, Alexander y col. (1984) comprueban que 51 aislamientos obtenidos de 15 países europeos presentaban valores de ICPI (Índice de Patogenicidad Intracerebral) muy homogéneos en el entorno de 1,44, mientras que los valores de IVPI (Índice Patogenicidad Intravenoso) eran muy variables desde 0,0 a 2,44. También Pearson y col., (1986) obtienen valores de IVPI muy heterogéneos (de 0 a 1.33) en diez aislamientos de PPMV-1 estudiados.

Otros autores (Pearson y col., 1986, Zanetti y col., 2000) reportan resultados muy variables, ya que reproducen la enfermedad en las palomas, pero no lo logran en los pollos.

2.1.2.5 Caracterización genética

Los PPMV-1 tienen una secuencia de múltiples aminoácidos básicos en el sitio de corte y un residuo de fenilalanina en la posición 117 de la proteína F (Muelemans y col., 2002, Zoman Rojs y col., 2002).

Sin embargo a diferencia de los APMV-1, la misma no está relacionada con la patogenicidad en pollos ya que está presente en cepas mesogénicas o lentogénicas (Collins y col., 1994). Diferentes aislamientos de PPMV-1 con la secuencia ¹¹²**G-R-Q-K-R-F**¹¹⁷ fueron clasificados como moderadamente virulentos o virulentos mediante ensayos de patogenicidad. A su vez, aislamientos de palomas que presentaron la secuencia ¹¹²**R-R-Q-K-R-F**¹¹⁷, típica de aislamientos de NDV virulentos, presentaron valores de moderada a baja patogenicidad.

Zanetti y col. (2001) también encuentran el motivo virulento RRQRK/F en el análisis de la secuencia de aminoácidos en el sitio de clivaje de la proteína F de un aislamiento de PPMV-1 que presentaba una patogenicidad intermedia para los pollos, indicando que otros factores genéticos y ambientales influyen en la determinación de la patogenicidad.

Con el propósito de esclarecer la relación entre la secuencia de aminoácidos de la proteína F y el patotipo, Collins y sus colaboradores (1996) determinaron las secuencias nucleotídicas del gen de la proteína F en aislamientos de PPMV-1 que fueron sometidos a pasaje en pollos con valores de IVPI que oscilaban entre 0,0 a 2,01 y concluye que la estructura primaria de F no está vinculada a la patogenicidad ya que no hay diferencias en la secuencia de aminoácidos de la proteína F entre las cepas a pesar de tener diferentes IVPI. En el estudio filogenético incluyen a los PPMV-1 y una cepa muy virulenta (cepa WARW, aislada en Warwickshire en 1966) en el linaje 4, lo cual indicaría el origen evolutivo de los PPMV-1.

Werner y sus colaboradores (1999) hallaron que la secuencia genética que codifica el sitio de clivaje de la proteína F de los aislamientos de PPMV-1 mesogénicos presentaba variaciones ya que tenía un patrón de 5 aminoácidos básicos (secuencia de clivaje ¹¹²**R-R-K-K-R-F**¹¹⁷) detectando por primera vez lisina (K) en la posición 114. La hibridación con oligonucleótidos derivados de estas secuencias fue positiva en 15 de los 21 aislamientos estudiados. El mismo autor sostiene que la secuencia de múltiples aminoácidos básicos del sitio proteolítico de F de PPMV-1 no está asociada a la patogenicidad en los pollos debido

a que están presentes en aislamientos con valores altos y bajos de ICPI, y que por lo tanto deben existir otros factores genéticos o ambientales que la determinen.

Asimismo, se han descrito en aislamientos de palomas patotipos de baja virulencia basados en los valores de ICPI asociados con un patrón genético del sitio de clivaje de la proteína F de alta virulencia (Collins y col., 1994, Meulemans y col., 2002). En uno de estos estudios Meulemans y col. (2002) investigaron las características de 27 aislamientos de PPMV-1. Si bien todos los aislamientos se patotipificaron como velogénicos en función de la secuencia del sitio de clivaje de la proteína F (¹¹²RR(Q//K/R)KRF¹¹⁷), 14 aislamientos presentaban un ICPI menor a 0,7.

De manera de poder aclarar estos hallazgos contradictorios, Dortmans y col. (2009) trataron de encontrar otros factores determinantes de la virulencia, mediante la secuenciación de los genomas virales de dos clones de un aislamiento de PPMV-1. Las secuencias de los sitios de clivaje de la proteína de fusión presentaban múltiples aminoácidos básicos (RRQKR/F), pero se caracterizaban por tener valores de ICPI diferentes (0,0025 y 1,3). Encontró solo cuatro nucleótidos diferentes, de las cuales dos eran irrelevantes ya que se encontraban en los virus con ICPI 0,025 y en cepas virulentas. Para estudiar el papel de las otras dos diferencias, se usó cDNA de un clon de una cepa virulenta Hertz de NDV, para introducir, individual y en forma conjunta, las secuencias con las dos mutaciones idénticas a las encontradas en la proteína F y L del virus lentogénico 0,025. A pesar de que estos cambios reducían el ICPI, el efecto era muy reducido y por lo tanto no explica la diferencia de patogenicidad entre ambos PPMV-1.

Todos estos hallazgos ponen en duda la asociación de fenotipo de virulencia (ICPI) con datos de la secuencia de nucleótidos. Los autores enfatizan que la secuencia del sitio de clivaje de la proteína F no es un indicador confiable de virulencia para los PPMV-1 a diferencia de lo que sucede con el NDV clásico.

Por lo tanto, hasta tanto no se determine una correlación entre otras secuencias del genoma y el patotipo viral es necesario caracterizar biológicamente los aislamientos obtenidos de palomas antes de llegar a una conclusión final acerca de su virulencia.

Los estudios de secuenciación y análisis filogenético han permitido agrupar al Paramixovirus Aviar en varios genotipos o linajes genéticos permitiendo la caracterización de los PPMV-1 (Collins y col., 1994, Aldous y col., 2003).

Estos agrupamientos se determinan por el secuenciamiento de los nucleótidos de los genes que codifican el sitio de clivaje de la proteína F debido a que el mismo presenta más variaciones genéticas en relación a otros genes con secuencias más conservadas (Aldous, 2004).

Abolnik (2004) secuenció el área de clivaje del gen de la proteína F de un aislamiento de Paramixovirus Aviar tipo 1 obtenido en pollos con enfermedad clínica y determinó que el mismo se trata de un PPMV-1. El análisis filogenético señaló que tiene similitud con las cepas de PPMV-1 europeas y que además está estrechamente relacionado con cepas aisladas en Japón a finales de los 90 (98% homología en la secuencia de nucleótidos). En base a estos datos sugiere que el PPMV-1 podría haber ingresado al país por medio de aves migratorias procedentes del Este Asiático.

Aldous (2004), determinó que 178 cepas de PPMV, excepto una, se agrupan filogenéticamente en el linaje 4b, sinónimo al genotipo VI descrito por Lomniczi (1998), y se divide en los grupos 4bi y 4bii (ver figura 11). A su vez cada grupo se subdivide en 3 subgrupos. El mismo autor agrupó 91 aislamientos obtenidos en el período 1983-2002 en Asia y Europa (principalmente Reino Unido) en el subgrupo 4bi. Además clasificó otros 114 aislamientos en el subgrupo 4bii que fueron obtenidos en el período 1984-2002 en Europa, Estados Unidos de América, y Asia, siendo éste el más predominante en los últimos años.

Mediante el mismo análisis filogenético llegó a la conclusión de que el brote de la Enfermedad de Newcastle que afectó a los pollos de Reino Unido en 1985 fue originado por el mismo virus que se aisló contemporáneamente en palomas ya que están genéticamente relacionados. Además verifica que el virus aislado de faisanes infectados en 1996 en Reino Unido es genéticamente idéntico a los aislamientos de palomas realizados en el mismo tiempo. Se observa que la mayoría de los aislamientos analizados (>64%) hechos en Reino Unido en el período 1980 y los primeros años de 1990 pertenecían al grupo 4bi, mientras que los posteriores (hechos de mediados de 1990 a 2002) se agrupan en el sublinaje 4bii. Esta variación se puede deber a la selección inmunológica inducidas por la vacunación. Sin embargo esto no quiere decir que exista una progresión secuencial entre estos subgrupos ya que pueden circular en un mismo lugar y al mismo tiempo diferentes cepas genéticamente diferentes (Alexander, 2001). La relaciones entre los aislamientos pueden estar vinculados geográficamente, pero éstas pueden estar alteradas

por los movimientos realizados por acción del hombre en el transporte y comercialización de palomas mensajeras.

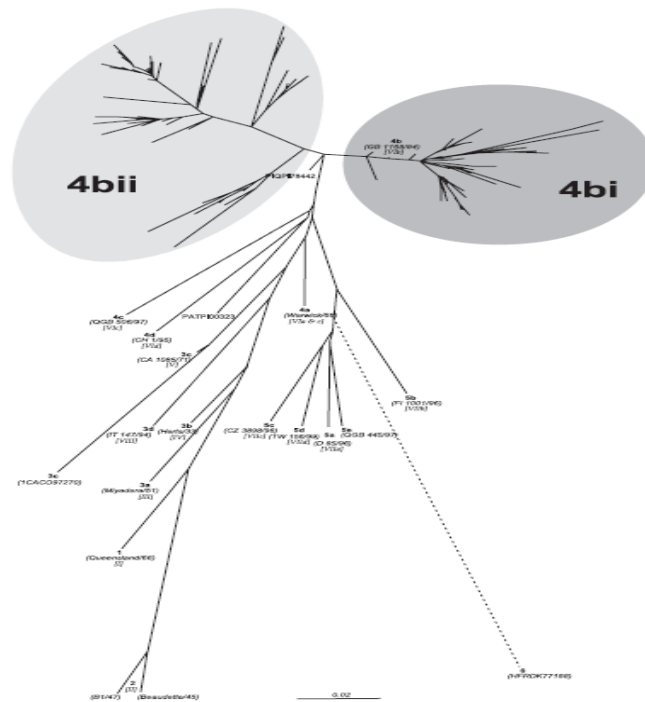


Figura 11. Filograma radial de la secuencia nucleotídica de 225 aislamientos de APMV-1 incluyendo 208 PPMV-1 y 17 representantes de otras líneas genéticas, basado en el análisis del fragmento de 375 nucleótidos del extremo 3' (42 al 422) del gen del péptido F. Fuente: Aldous, 2004.

Liu (2006) secuenció el sitio funcional de la proteína F y encontró que 13 de los 14 aislamientos realizados en palomas presentan múltiples aminoácidos básicos en las posiciones 112 a 116 y un residuo de fenilalanina en la posición 117 lo que se asemeja a lo hallado en otras cepas de PPMV-1 por otros autores. Solo un aislamiento presentó una secuencia con patrón idéntico al de las cepas vacunales lentogénicas de APMV-1. La homología de la secuencia de nucleótidos del extremo 3' del gen de la proteína F (nucleótido 47-470) varió entre un 86,9% a un 100%, excepto el aislamiento caracterizado como cepa vacunal de APMV-1 que presentó una homología con las demás cepas de 82,1%-84,9%. En el análisis filogenético 10 cepas fueron agrupadas en el genotipo VIb (representativo del grupo PPMV-1), 3 en el grupo VIId (cepas que causan alta mortalidad en pollos y palomas) y una en el genotipo II (donde se encuentra la cepa APMV-1 La Sota).

Kim y col., (2008) obtienen 15 aislamientos de PPMV de 1416 muestras de cerebros obtenidos de aves de la familia Columbidae colectadas en lugares públicos en Rodhe Island y en el Este de Texas en el período 2000 a 2007. Además logra detectarlos mediante un ensayo de rRT-PCR, validado por USDA, que identifica secuencias específicas del gen de la proteína M de APMV-1 y del gen de la proteína F de cepas virulentas de NDV (presencia de nucleótidos que codifican múltiples aminoácidos básicos en el sitio de clivaje). Sin embargo gran número de los aislamientos escaparon a la detección del gen F. Mediante la modificación de tres nucleótidos de la secuencia de la sonda usada para detectar gen de la proteína F de las cepas virulentas de NDV se pudo detectar a los mismos por el rRT-PCR (ver Fig. 12).

Fusion probe F-4894		T	G	A	G	G	A	A	G	G	A	G	A	C	A	G	A	A	A	C	G	C	T	T									
Pigeon-specific probe		T	G	A	G	T	A	A	G	G	A	G	G	A	C	A	G	A	A	A	C	G	C	T	T								
Majority		C	A	C	A	T	C	A	G	G	A	G	T	A	A	G	G	A	G	G	A	C	G	C	T	T	T	A	T	A	A		
GenBank	Sequence position	4871																															
Accession	Virus name																																
EU477188	* Pigeon/US(TX)/04		
AY562989	Dove/Italy/2736/00	A
AY175759	Turtle Dove/Italy/00	A
AY471769	Pigeon/Italy/99	A
AY471758	Pigeon/UK/90	A
AY150149	† Pigeon/Germany/98	G
AY471767	Pigeon/Germany/94	C
AB070434	Pigeon/Japan/00	C
AY150153	Pigeon/Germany/99	T	T

Figura 12. Comparación de PPMV-1 que codifican la secuencia RRKKRF en el sitio de clivaje de la proteína de Fusión. Los mismatches de la secuencia de la sonda de fusión están en negrita y los cambios en la sonda para detectar PPMV-1 están subrayados .Fuente: Kim y col., 2008.

En base al análisis filogenético de la secuencia genómica parcial estos virus fueron agrupados en un nuevo sublinaje dentro de la clase II genotipo VIb y presentaban la secuencia ¹¹²RRKKRF¹¹⁷ en el sitio de clivaje del gen de la proteína F. (ver fig. 13). Estos resultados concuerdan con lo expresado por Aldous y col. (2004), quienes sugieren que el subgrupo 4bii comenzó a predominar sobre el subgrupo 4bi a partir de 1990 probablemente debido a la presión selectiva de las vacunas.

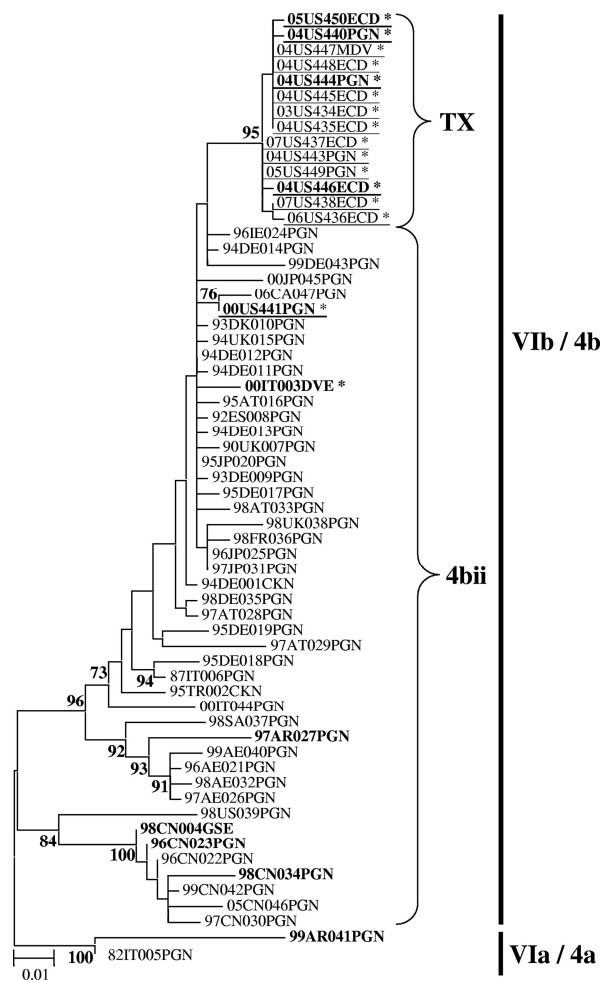


Figura 13. Análisis filogenético de fragmento de 374 bases del gen de la proteína F de PPMV-1- Los asteriscos representan los aislamientos que escaparon a la detección del gen F usando el protocolo rRT-PCR validado por USDA. La escala indica el largo del brazo basado en el número de sustituciones de bases. El nombre de virus se representa en 10 dígitos, dos indican el año, dos letras indican el país, 3 dígitos para la identificación de la muestra y 3 letras para el nombre de la especie de ave. Fuente: Kim y col., 2008.

Ujvári y col. (2005) desarrollaron un método genético específico para identificar a más de 100 cepas PPMV aisladas entre los años 1978 y 2002 en 16 países basados en el uso de las enzimas de restricción: HinfI, BstOI y RsaI. De esta manera las pudieron agrupar en 9 patrones diferentes y a pesar de esta significativa variación, todas las cepas carecían del sitio de clivaje para la enzima BstOI en la posición correspondiente al nucleótido 1601 a diferencia de otras cepas de NDV aisladas en pollos.

El mismo autor (2006) logra describir la secuencia del genoma completo de una cepa de PPMV aislada en el inicio de la

panzootia en palomas mensajeras de la década de los 80 (IT-227/82) la cual tiene un longitud de 15192 nucleótidos, 6 bases más larga que las cepas avirulentas que se agrupan en la Clase II, debido a la inserción de 6 bases en el extremo 5' no codificante del gen de la nucleoproteína NP. Clasifica los genotipos viejos (I, II, III y IV) con una longitud de 15186 bases, y los genotipos nuevos (V, VI, VII y VIII) con una longitud de 15192. Comprueba que esta cepa codifica la proteína W con mayor longitud (227 aa) aunque esto no constituye una característica filogenética.

La longitud de la hemaglutinina-neuraminidasa HN es de 571 aminoácidos (similar a los genotipos IV, V y VII, mientras que los genotipos I y II presentan 616 y 577 aminoácidos respectivamente, hecho que tiene valor filogenético.

2.1.3. TRASMISIÓN NATURAL DE PPMV-1 A LAS AVES DE CORRAL

En 1984 se observa por primera vez la aparición de 23 focos de la Enfermedad de Newcastle en establecimientos avícolas en Gran Bretaña causado por el Paramixovirus tipo 1 de la paloma. Los aislamientos virales realizados en 22 focos se estudiaron con un panel de monoclonales y se identificaron como similares a los aislamientos realizados en palomas en el año anterior. Mediante investigación epidemiológica demuestran que 19 de estos focos estaban vinculados directa o indirectamente con la diseminación de la infección en palomas que contaminaban con sus deyecciones y plumas los depósitos de ración para aves de corral. Los ICPI oscilan en un rango de 1,5-2 y los valores de IVPI son mayores a 2 en la mayoría de los aislamientos. Estos valores son superiores a los ICPI de los aislamientos en palomas, lo que refleja que el Paramixovirus de la paloma debe adaptarse en sucesivos pasajes en pollos para poder ser patógeno para los mismos. (Alexander y col., 1985, King., 1996).

Los virus PPMV-1 fueron los causantes de brotes infecciosos producidos principalmente por la propagación del virus en las granjas de pollos a través de alimentos contaminados por palomas silvestres infectadas, en 1991 en Irlanda del Norte. En este caso las medidas de control fueron bastante íntegras, comportando una mejora en la bioseguridad de las explotaciones y un refuerzo en el tratamiento de la ración por calor en fábrica.

Werner y col., (1999) al caracterizar 635 aislamientos realizados durante la epizootia de la Enfermedad de Newcastle en el período

1992-1996 en Alemania determinan que seis cepas aisladas en pollos, una de faisán y otra de un pato tienen el patrón antigénico del Paramixovirus de la paloma lo que evidencia la importancia de los PPMV-1 en la transmisión de la enfermedad de las palomas a las aves de corral del sector industrial. Sin embargo la gravedad de la enfermedad no es tan severa como la provocada por las cepas velogénicas de APMV-1.

En el año 2002 C. Abolnik registra el primer aislamiento y caracterización de PPMV-1 en Sud África obtenido a partir de vísceras de pollos con síntomas de traqueítis moderada con un MDT mayor a 90 horas, propio de las cepas lentogénicas a pesar de presentar otras características similares a las de las cepas velogénicas (termoestabilidad y secuencia de múltiples aminoácidos básicos en el sitio de clivaje de la proteína F) (Abolnik, 2004). El mismo autor establece que se trata de un PPMV-1 ya que tiene un 98% de identidad con la secuencia nucleotídica del PPMV-1 aislados en el Este Asiático.

2.2. INFLUENZA AVIAR EN LAS PALOMAS

Panigrahy y col. (1996) realizan un estudio experimental de susceptibilidad de las palomas inoculando por vía intravenosa e intratraqueal virus de Influenza Aviar de alta (cepas CK/PA H5N2, CK7AUSTRALIA H7N7) y baja patogenicidad (cepas CK/PA H5N2, EMU/TX H7N1). Concluyen que las palomas son resistentes a la infección ya que las aves no enfermaron, no desarrollaron anticuerpos ni tampoco eliminaron virus durante un período de observación de 21 días.

Por otra parte Perkins y Swayne (2002) al inocular palomas por vía intranasal el virus HPAI A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) comprueban que las mismas eran resistentes al no encontrar lesiones histológicas importantes y al no poder aislar el virus, lo que sugiere que las palomas no jugarían un papel importante en la epidemiología de la enfermedad.

Sin embargo, Elis y col. (2004) aíslan virus HPAI H5N1 de una paloma que se encontró muerta durante un brote de que afectó a gansos, patos, cisnes y flamencos en un parque de aves acuáticas en Hong Kong a finales del 2002.

Por otra parte, otros autores consideran que las palomas no son susceptibles a Influenza Aviar de Alta y de Baja Patogenicidad (Marlier y Vindevogel, 2006)

2.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Avicultura en el Uruguay usufructúa una excelente condición sanitaria ya que nunca se reportaron casos clínicos de Influenza Aviar y desde 1984 no se han declarado focos de Enfermedad de Newcastle. Esta situación constituye una gran ventaja para el comercio internacional de la industria avícola y por lo tanto es muy importante contar con un sistema de vigilancia sanitaria para prevenir la aparición de estas enfermedades en el sector avícola.

En Uruguay en el año 2001, veterinarios colombófilos reportaron por primera vez la sospecha clínica de Paramixovirus en palomas silvestres y mensajeras y se piensa que la misma aún persiste en nuestro país. De acuerdo con los antecedentes descritos, las aves de corral pueden padecer la Enfermedad de Newcastle transmitida por ingestión de ración contaminada con carcasas y heces de palomas infectadas.

Si bien la literatura científica no incluye a la paloma doméstica como un reservorio relevante de la Influenza Aviar, debido a la importancia de la enfermedad, la detección de AIV en esta especie podría contribuir a agregar información acerca del papel epidemiológico que podría jugar esta especie.

Por otra parte las técnicas moleculares permiten detectar y caracterizar rápidamente a estos agentes sin necesidad de requerir laboratorios con nivel alto de bioseguridad (BSL-3) ya que en las mismas no se manipula virus infeccioso.

Por lo tanto la detección y la caracterización por técnicas moleculares de Paramixovirus Aviar tipo 1 y el Virus de Influenza Aviar en la paloma doméstica podrían constituir un elemento de apoyo en la vigilancia de estas enfermedades y aportar información para conocer su papel en la transmisión de la Enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar a la industria avícola.

2.4. OBJETIVO GENERAL

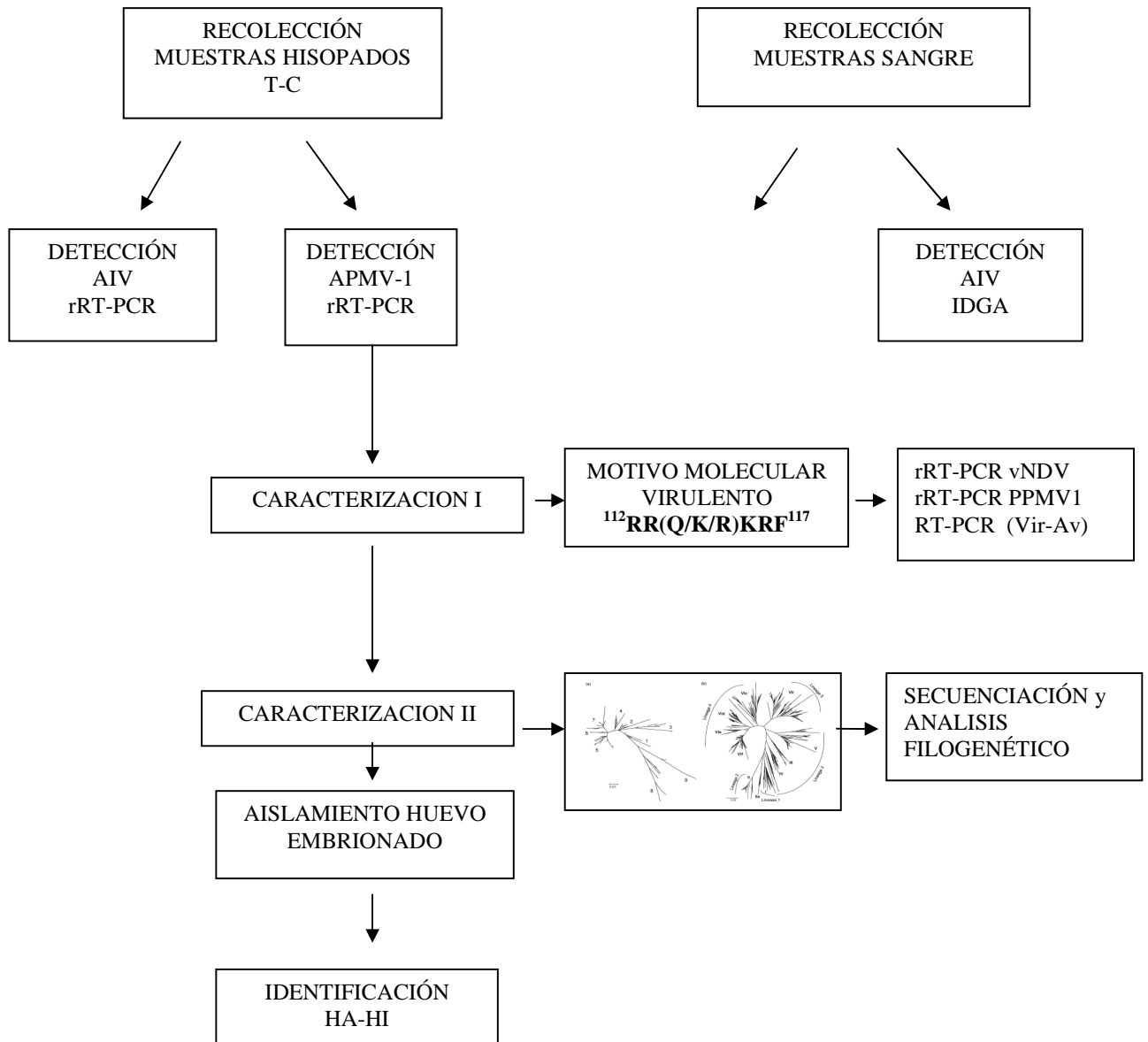
Detectar la presencia de Paramixovirus Aviar y del Virus de la influenza Aviar en las palomas domésticas y caracterizar ambos virus mediante el uso de técnicas moleculares.

2.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar por ensayos serológicos, anticuerpos para los virus de Influenza Aviar y de la Enfermedad de Newcastle de las muestras de sangre colectadas.
- Poner a punto RT-PCR y rRT-PCR para detectar y caracterizar Virus de Influenza Aviar y Paramixovirus Aviar tipo 1.
- Detectar Virus de Influenza Aviar y Paramixovirus Aviar tipo 1 por rRT-PCR de los hisopados traqueales y cloacales colectados.
- Caracterizar por RT-PCR, rRT-PCR y secuenciamiento nucleotídico los genomas virales detectados.
- Realizar aislamiento viral en las muestras de hisopados traqueales y cloacales recolectadas de las palomas.

2.6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Las actividades se organizaron en el siguiente orden estratégico:



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MUESTRAS

Se tomaron muestras de sangre y de hisopados traqueales y/o cloacales de 20 palomas silvestres (*Columba livia*) capturadas en los corrales de la División de Laboratorios Veterinarios "M.C. Rubino" (Ruta 8 km. 17,5 Montevideo-Uruguay) donde se alimentan con ración administrada a los bovinos destinados a pruebas de control de zooterápicos durante los meses de febrero, marzo y abril de 2008. Luego de recolectar las muestras, las aves fueron sacrificadas por dislocación cervical.

En el mismo período, se tomaron muestras de sangre y de hisopado cloacal y traqueal de una paloma mensajera remitida por un colombófilo con diagnóstico presuntivo clínico de Paramixovirus de la paloma (diarrea, tortícolis, temblores, ataxia).

Las muestras de sangre se tomaron por punción de la vena del ala de las palomas, se centrifugaron y el suero obtenido se conservó a -20°C.

Las muestras de hisopados traqueales y cloacales se colectaron con hisopos con mango de plástico y tubos conteniendo medio de transporte con solución de antibióticos -antimicóticos y DMEM (SIGMA) y se conservaron a -70°C.

En el caso de los hisopados procedentes de las palomas silvestres, se realizó *pool* de hasta 5 palomas, evitando mezclar hisopados traqueales con los cloacales en el mismo *pool*. En el siguiente cuadro se indica la identificación de los *pools*:

Número de <i>Pool</i>	Tipo de hisopado	Número muestras por <i>Pool</i>
1	Cloacal	5
2	Traqueal	5
3	Cloacal	5
4	Traqueal	5
5	Cloacal	5
6	Traqueal	5
7	Cloacal	5
8	Traqueal	5

3.2. SEROLOGÍA

3.2.1. Paramixovirus aviar

Las muestras de suero se procesaron por la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (HI), según lo descrito por el Manual de la OIE (2006a). El antígeno, los sueros controles positivos y negativos procedieron de Laboratorios de Referencia Internacional (NVSL, Ames, USA y CLV, Weybridge, Reino Unido).

En una placa de 96 hoyos con fondo en U se colocaron 25 µl de PBS en todos los pocillos. En cada hoyo de la primera columna de la placa, se colocaron 25 µl suero control positivo (suero anti-NDV procedente de NVSL-USDA, Ames) y suero control negativo (suero de pollos SPF procedente de NVSL-USDA, Ames) y 25 µl de los sueros problema. Se realizaron diluciones dobles partiendo de la primera hilera hasta la 12. Luego se agregaron 25 µl de control de Virus con 8 UHA/50 µl, de la segunda columna hasta la última. En la primera columna se agregó 25 µl de PBS como control de suero. Se incubó a temperatura ambiente durante una hora y luego se agregó 25 µl de suspensión de glóbulos rojos al 1%, nuevamente se incubó 30 minutos y se realizó la lectura (HI= formación de un botón de eritrocitos sedimentados en el fondo del hoyo). Se verificaron los títulos de los sueros controles positivo y negativos y del control de Virus (8 UHA/ 50 µl), control de glóbulos y de sueros. Los sueros son positivos a la reacción cuando los mismos inhiben la hemaglutinación en diluciones iguales o mayores a 1/16.

3.2.2. Influenza Aviar

Las muestras de suero se procesaron por la técnica de Inmunodifusión en Gel Agar de acuerdo con lo descrito por Panigrahy (2005). El antígeno y los sueros controles (positivos y negativos) provenían del Laboratorio de Referencia Internacional NVSL.

Se cargaron Placas de Petri de 100 mm de diámetro con una suspensión al 1% de agarosa (Sigma) previamente fundida mediante autoclavado a 110°C durante 10 minutos. Se dejaron enfriar y al quedar gelificadas se perforaron con un perforador con especificaciones establecidas por el Laboratorio de Referencia NVSL-USDA (Marca Veterinary Diagnostic Technology Inc). Se vaciaron los hoyos y se cargaron los pocillos de la periferia en forma alternada 3 con sueros problema y 3 con suero control positivo. El hoyo central se cargó con el control de antígeno de AIV. Se incubó a temperatura ambiente en cámara húmeda y se realizó la lectura con lupa en un transiluminador a las 24-48 horas. Se verificaron las bandas de precipitación originadas por los sueros controles positivos y se determinó la formación de líneas de precipitación entre los pocillos cargados con los sueros problema y los cargados con el control de

antígeno. Se consideraron los sueros como positivos, al observar líneas de precipitación específicas.

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En los ensayos serológicos se estimó el Intervalo de Confianza (IC) del 95% para la proporción de seropositivos con la Distribución Binomial usando el Programa Statacorp 2009.

3.4. DETECCIÓN MOLECULAR

3.4.1. Extracción ARN viral

Los hisopados se procesaron por la técnica de extracción de RNA con Trizol, según lo descrito por Chomczynski y Sacchi (2006). Posteriormente los extractos fueron sometidos a una segunda extracción utilizando el Kit Rneasy Mini Qiagen, siguiendo sus propias indicaciones, eluyéndose la muestra en un volumen final de 50 µl para ser usado como templado en las pruebas de RT-PCR convencional y rRT-PCR (RT-PCR en tiempo real).

3.4.2. Detección molecular por rRT-PCR

Los extractos de ARN fueron retrotranscritos a c-DNA y amplificados por PCR en un solo paso, utilizando sondas de hidrólisis Taqman y oligos específicos para detección de la secuencia blanco. La sonda está marcada en el extremo 5' con FAM (fluorocromo donador o reporter), y en el extremo 3' con BHQ-1 (fluorocromo aceptor o quencher). Cuando la sonda se hibrida con el templado durante la reacción de PCR, la Taq polimerasa la hidroliza (gracias a su actividad de nucleasa en el extremo 5') liberando el quencher y permitiendo la emisión de fluorescencia por el colorante FAM cuando es excitado por la onda de luz en la cual fluoresce. La reacción se visualiza bajo la forma de una curva de amplificación en la cual se determina el Ct que corresponde al número de ciclo en el cual el valor de la fluorescencia emitida cruza la línea de base.

3.4.2.1. Virus Influenza Aviar

Se basa en la detección de regiones conservadas del gen de la proteína M del virus de Influenza Aviar (Spackman y col, 2002).

Las secuencias de los oligos y la sonda diseñadas por Spackman y col. (2002) y sintetizados por Operon, fueron las siguientes:

M+25*(oligo 5'): 5'- AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG-3'
 M+64*(sonda): 5'- FAM- TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-GA-TAMRA-3'
 M-124*(oligo 3'): 5'- TGC AAA AAC ATC TCC AAG TCT CTG-3'
 (*) Se refiere a la posición del nucleótido donde el extremo 5' se hibrida con el genoma viral.
 FAM: 6-carboxilfluoresceína
 TAMRA: 6-carboxiltetrametilrodamina

Se usó el Kit Qiagen RT-PCR One Step y se preparó un volumen de 17 µl de la premezcla (volumen final de la reacción 25 µl) de acuerdo con las siguientes condiciones: 5 µl Buffer 5X del Kit, 1 µl de la mezcla de enzimas (incluyendo la RT y la Hot Start Taq-polimerasa), 0,12 µM de la sonda, 13 unidades de Inhibidor de Rnasa (Promega), 10 pmoles de cada oligo, 10 µM de cada de cada dNTP, y 3,75 mM de MgCl₂ (Invitrogen).

La reacción de RT-PCR se realizó utilizando el termociclador Tiempo Real Stratagene 3005X siguiendo el siguiente protocolo:

Paso	Nº ciclos	Etapa	temperatura	Tiempo
1	1	RT	50°C	30'
		Desnaturalización	95°C	15'
2	45	Desnaturalización	94°C	1''
		Alineamiento	60°C	20''

Se utilizaron como controles positivos a la cepa AIV/Swine/ Indiana/83/H1N1 procedente de FADC Winnipeg-Canadá, y como control negativo agua libre de RNasa.

Las muestras se consideraron positivas cuando se observaba una amplificación del ADN con un Ct menor a 35.

3.4.2.2. Paramixovirus Tipo 1

Se basó en la detección de regiones conservadas del gen de la proteína M del virus de Influenza Aviar (Wise y col, 2004., Manual de NVSL ,2005).

Las secuencias de los oligos y la sonda diseñadas por Wise y col, (2004) y sintetizados por Operon, fueron las siguientes:

M+ 4100* (oligo 5'): 5'- AGT GAT GTG CTC GGA CCT TC-3'
 M+4169* (sonda): 5'- FAM-TTC TCT AGC AGT GGG ACA GCC TGC-BHQ-3'
 M-4220* (oligo 3'): 5'- CCT GAG GAG AGG CAT TTG CTA-3'
 (*) Se refiere a la posición del nucleótido donde el extremo 5' se hibrida con el genoma viral.
 BHQ: Black hole quencher

Se usó el Kit Qiagen RT-PCR One Step y se preparó un volumen de 17 μ l de la premezcla (volumen final de la reacción 25 μ l) de acuerdo con las siguientes condiciones: 5 μ l Buffer 5x del Kit, 1 μ l de la mezcla de enzimas (incluyendo la RT y la Hot Start Taq-polimerasa), 0,24 μ M de la sonda, 13 unidades de Inhibidor de Rnasa (Promega), 10 pmoles de cada oligo, 10 μ M de cada de cada dNTP, y 3,75 mM de MgCl₂ (Invitrogen).

La reacción de RT-PCR se realizó utilizando el termociclador Tiempo Real Stratagene 3005X siguiendo el siguiente protocolo:

Paso	Nº ciclos	etapa	temperatura	Tiempo
1	1	RT	50°C	30´
		Desnaturalización	95°C	15´
2	40	Desnaturalización	94°C	10´´
		alineamiento	56°C	30´´
		extensión	72° C	10´´

Se utilizaron como controles positivos a la cepa La Sota Clon 30 de NDV (INTERVET), plásmidos del gen de proteína de Matriz de la cepa La Sota de NDV y de PPMV-1 El tigre, procedentes del Instituto de Biotecnología de INTA-Castelar (gentilmente cedidos por la Dra. Flavia Zanetti). Se usó como control negativo agua libre de RNasa.

Las muestras se consideraron positivas cuando se observaba una amplificación del ADN con un Ct menor a 35.

3.5. DETECCIÓN VIRAL DE APMV-1

3.5.1. Aislamiento

La totalidad de las muestras de hisopados traqueal y cloacal se sometieron al aislamiento viral en huevo embrionado de pollo de 9 a 11 días de edad de acuerdo con lo descrito por el Manual de la OIE (2006a).

Primeramente se preparó un inóculo realizando una suspensión al 10% p/v en PBS estéril conteniendo una solución comercial de mezcla de antibióticos y antimicóticos (SIGMA). Se dejó actuar durante una hora a temperatura ambiente y luego se inoculó 0,2 ml. de cada muestra en la cavidad alantoidea de 5 huevos embrionados de pollo de 9-11 días de edad procedentes del plantel de aves libres de IA y NDV de DILAVE. Se incubó a 37°C durante 4 días. Posteriormente se cosecharon los líquidos alantoideos para ser procesados por la técnica de identificación de Hemaglutinación e Inhibición de la Hemaglutinación (HA-HI). Las muestras negativas a dicha prueba fueron sometidas a un nuevo pasaje en huevos embrionados.

3.5.2. Identificación

Se procedió de la siguiente manera, según lo descrito por el Manual de la OIE (2006a):

3.5.2.1. Hemaglutinación (HA)

En una placa de 96 hoyos con fondo en U se colocaron 50 µl de PBS en todos los pocillos. Posteriormente se agregó en la primer columna 50 µl de las muestras y 50 µl del control positivo (cepa Vacuna La Sota Clon 30 de APMV-1, Intervet) y 50 µl de control negativo (líquido alantoideo de huevo embrionado de pollo normal de 9 a 11 días de edad). Se realizaron diluciones dobles y finalmente se adicionó 25 µl por hoyo de una suspensión al 1% de eritrocitos de pollo. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta visualizar la formación de botón del control de glóbulos rojos. Finalmente se procedió a realizar la lectura de la reacción para observar la hemaglutinación. El título hemaglutinante fue determinado como la inversa de la dilución más alta que produjo hemaglutinación total; esta cantidad de antígeno representa 1UHA.

3.5.2.2. Inhibición de la Hemaglutinación (HI)

La identidad de los líquidos alantoides hemaglutinantes se confirmó por la reacción de HI. En una placa de 96 hoyos con fondo en U se colocó en todos los pocillos 25 µl de PBS. En la primer columna se colocó 25 µl suero control positivo (suero anti-NDV procedente de NVSL-USDA, Ames) y suero control negativo (suero de pollos SPF procedente de NVSL-USDA, Ames). Se realizaron diluciones dobles y luego se agregaron 25 µl de líquidos hemaglutinantes y de control de Virus con 8 UHA/50 µl., de la segunda columna hasta la última. En la primera columna se agregó 25 µl de PBS como control de suero. Se incubó a temperatura ambiente durante una hora y luego se agregó 25 µl de suspensión de glóbulos rojos al 1%. Se incubó 30 minutos y se realizó la lectura. Se verificaron los controles de titulación de sueros positivos y negativos, titulación de dilución de virus y líquidos hemaglutinantes con 8 UHA/50µl, control de glóbulos y de sueros.

3.6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Las muestras positivas a la detección del gen de la proteína M de APMV-1 se procesaron por los siguientes ensayos de caracterización molecular:

3.6.1. RT-PCR APMV-1 Virulento-Avirulento

Se pretendió establecer la virulencia, mediante la detección del gen de la proteína F usando cebadores que reconocen secuencias de nucleótidos específicas de las cepas virulentas y avirulentas de acuerdo con la técnica RT-PCR en un solo paso (Vilj en, 2004, Kant, 1997 y Wang 2001).

Se utilizaron como controles positivos la cepa La Sota Clon 30 de NDV (Intervet). Se usaron como control negativo suspensiones de pulmón y tráquea de pollitos BB libres de IA y ND y agua libre de RNasa.

Los oligos fueron diseñados para detectar secuencias específicas del gen de la proteína de Fusión de todas las cepas de NDV, de las cepas virulentas y de las cepas avirulentas (Vilj en, 2004). Fueron sintetizadas por Operon y sus secuencias fueron las siguientes:

ALLs 5' - TTG ATG GCA GGC CTC TTG C -3'
 ALLe 5' - GGA GGA TGT TGG GAG CAT T -3'
 VLTe 5' - AGC GT(C/T) TCT GTC TCC T -3'
 AVLe 5' - G(A/G)C G(A/T)C CCT GT(C/T) TCC C -3'

Se usaron los siguientes pares de oligos para diferenciar los patotipos de virus:

Tipo	Par de oligos	Tamaño amplicón
Grupo Newcastle	ALLs + ALLe	362 pb
Newcastle virulento	ALLs + VLTe	254 pb
Newcastle avirulento	ALLs + AVLe	254 pb

Se usó el Kit Qiagen RT-PCR One Step y se preparó un volumen de 17 él de la mezcla (volumen final de la reacción 25 él) de acuerdo con las siguientes condiciones: 5 él Buffer 5x del Kit, 1 él de la mezcla de enzimas (incluyendo la RT y la Hot Start Taq-polimerasa), 13 unidades de Inhibidor de RNasa (Promega), 10 pmoles de oligo +, y 10 pmoles de oligo -, 10  M de cada de cada dNTP, y 3,75 mM de MgCl₂ (Invitrogen).

La reacción de RT-PCR se realizó utilizando el termociclador Applied Biosystem 7500 siguiendo el siguiente protocolo:

Paso	Nº ciclos	etapa	temperatura	Tiempo
1	1	RT	42°C	40´
		Inactivación	95°C	7´
2	55	Desnaturalización	94°C	30´´
		alineamiento	53°C	30´´
		extensión	72° C	30´´

Los productos de PCR se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Gibco) teñido con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio en Buffer TAE 1X (Promega) a 120 V durante 45 minutos. Los bandas de los productos fueron visualizadas por rayos ultravioletas (UV) con un sistema de documentación fotográfica. Se sembraron en el gel 10 µl de la muestra previo agregado de 2 µl de buffer de siembra (FERMENTAS SMO311). Se incluyó en la corrida marcadores de peso molecular (FERMENTAS SMO311 1kb y SBS 100pb)

3.6.2. rRT-PCR APMV-1 Virulento

Se trató de determinar la virulencia mediante el ensayo de rRT-PCR usando cebadores y sondas de hidrólisis Taqman que reconocen secuencias de nucleótidos específicas de la proteína F de las cepas virulentas de NDV (Aldous, 2001).

Las secuencias de los oligos y la sonda diseñadas por Aldous (2001) y sintetizadas por Operon, fueron las siguientes:

F+ 4829* (oligo 5´): 5´- CGT GAG TCT ATC CGG ARG ATA CAA G-3´
 F+ 4894* (sonda): 5´- FAM- AAG CGT TTC TGT CTC CTT CCT CCA-BHQ-3´
 F- 4939* (oligo 3´): 5´- AGC TGT TGC AAC CCC AAG-3´
 (*) Se refiere a la posición del nucleótido donde el extremo 5´se hibridiza con el genoma viral.

Se usó el Kit Qiagen RT-PCR One Step y se preparó un volumen de 17 µl de la premezcla (volumen final de la reacción 25 µl) de acuerdo con las siguientes condiciones: 5 µl Buffer 5x del Kit, 1 µl de la mezcla de enzimas (incluyendo la RT y la Hot Start Taq-polimerasa), 0,18 µM de la sonda, 13 unidades de Inhibidor de Rnasa (Promega), 13,4 pmoles de oligo-, 26,8 pmoles de oligo +, 10 µM, de cada dNTP, y 3,75 mM de MgCl₂.(Invitrogen).

La reacción de RT-PCR se realizó utilizando el termociclador Tiempo Real Stratagene 3005X siguiendo el siguiente protocolo:

Paso	Nº ciclos	etapa	temperatura	Tiempo
1	1	RT	50°C	30´
		Desnaturalización	95°C	15´
2	40	Desnaturalización	94°C	10´´
		alineamiento	58°C	30´´
		extensión	72° C	10´´

Además de usar los tiempos y temperaturas de termociclado establecidos por Aldous (2001), se usó un protocolo que difería solo en la temperatura de alineamiento que en vez de ser de 58° C, fue modificada a 50° C. Se usaron los mismos controles positivo y negativo que los empleados en la prueba anterior con el agregado de plásmido de la proteína F de la cepa PPMV-1 El Tigre procedente del Instituto de Biotecnología INTA-Castelar.

3.6.3. rRT-PCR PPMV-1

A su vez las muestras fueron procesadas por la misma técnica arriba descrita, pero usando una sonda de hidrólisis Taqman que reconoce secuencias de nucleótidos específicas de la proteína F de cepas de PPMV-1 que escapan a la detección de cepas virulentas de NDV por el ensayo de rRT-PCR descrito anteriormente. La secuencia de la sonda (Kim y col, 2008) es la siguiente:

F-4894 (sonda): 5´-FAM-TGG AGT AAG GAG GAAA GAA ACG CTT-BHQ-3´

Además de usar los tiempos y temperaturas de termociclado establecidos por los autores de la técnica, se usó un protocolo que difería solo en la temperatura de alineamiento que en vez de ser de 58° C, fue modificada a 50° C.

También se usaron los mismos controles positivo y negativo de la prueba anteriormente descrita.

3.6.4. Secuenciamiento de nucleótidos

Los extractos de ARN fueron procesados por RT-PCR empleando los oligos descritos por Aldous y col. (2004) para secuenciar un segmento de 518 nucleótidos correspondiente al extremo 3´del gen de la proteína de Fusión que codifica su sitio de clivaje.

Características de los oligonucleótidos utilizados:

Nombre	Secuencia 5'- 3'	Polaridad*	Posición	Fuente
Seq55 (sense)	TTA GAA AAA ACA CGG GTA	+	1207 [◇]	Aldous y col, 2004
Seq56 (antisense)	CCT TGG TGA ITC TAT CCG IAG	-	507 ^{◇◇}	Aldous y col, 2004

*Los oligonucleótidos de polaridad positiva son aquellos que tienen igual secuencia que el genoma de NDV y los de polaridad negativa son aquellos cuya secuencia es complementaria a la del genoma de NDV.

◇ Posición correspondiente a la secuencia de la cepa de NDV Roakin, ARNm proteína M (cds completo) . GenBank: AF124443.1

◇◇ Posición correspondiente a la secuencia de la cepa de NDV Roakin, ARNm bicistrónico proteínas F y HN (cds completo) GenBank: AY289000.

Purificación de los fragmentos PCR obtenidos

Los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos "sec" se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 1% (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo., USA) con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio y en buffer TAE 1X (Tris-acetato 10 mM, pH = 8, EDTA 1 mM). Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 Volts/cm y a temperatura ambiente. Las muestras de ADN se sembraron en el gel, previo agregado de 1/10 del volumen de la muestra de buffer de siembra (azul de bromo fenol 0,5%, glicerol 50%, TAE 1X). Se incluyó en la corrida un marcador de peso molecular (1 Kb Plus *ladder* de *Invitrogen*). Luego de la corrida, las bandas se visualizaron por fluorescencia a la luz ultravioleta (UV), se escindieron del gel y se purificó el ADN amplificado usando el *kit QIAEX II* (*Qiagen, GmbH, Germany*) según instrucciones del fabricante.

La concentración de ADN obtenida luego de la purificación se determinó por medición espectrofotométrica a 260 nm utilizando un equipo *NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 V3 3.0* de *NanoDrop Technologies Inc.*

Secuenciación de los productos de amplificación de PCR

La secuencia nucleotídica de los fragmentos obtenidos por PCR se determinó mediante secuenciación automática. Este análisis se realizó en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA- Castelar de Argentina (Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria);

Para ello se utilizó el método de terminadores de cadena de Sanger (Sanger y col, 1977) con el sistema de *BigDye^R Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Applied Biosystems*) que utiliza dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con fluorocromos. Cada reacción de secuenciación se realizó utilizando 45 a 50 ng

de ADN purificado y el oligonucleótido sec55 (sentido) o el oligonucleótido sec56 (antisentido).

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un termociclador *Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems)* y las condiciones de reacción fueron las siguientes:

Desnaturalización Inicial		1 min, 96 °C
25 ciclos	desnaturalización	10 seg, 96°C
	annealing	5 seg, 50°C
	extensión	4 min, 60°C

Una vez finalizado el ciclado, el exceso de ddNTPs se eliminó mediante precipitación con etanol/EDTA. Los productos de las reacciones de secuenciación purificados se sometieron a electroforesis capilar y análisis de datos utilizando el equipo *ABI PRIS^R 310 Genetic Analyzer* de *Applied Biosystems* para la obtención de los electroferogramas.

Deducción de la Secuencia de Aminoácidos

Las secuencias de aminoácidos correspondientes al extremo aminoterminal de la proteína de Fusión, fueron deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas usando el Programa BioEdit v7.0.5 (Hall, 1999).

3.6.5. Análisis Filogenético de los Aislamientos

Para realizar el análisis filogenético de los aislamientos se usó la secuencia nucleotídica correspondiente al fragmento de F amplificado de la muestra de hisopado traqueal positiva a la detección de APMV-1

En el análisis genético correspondiente al sitio de clivaje de la proteína F de NDV, se incluyeron las siguientes secuencias de aislamientos reportados en palomas y cepas de referencia de NDV publicadas GenBank:

Número	Aislamiento o cepa	Número acceso GenBank
1	Usted (A)	M24694
2	Q-V4 (A)	AF217084
3	B D26-76 (A)	M24692
4	B1 (L)	NC002617
5	VGGA (L)	U22273
6	La Sota (L)	AF077761
7	Roakin (M)	U22284
8	Michigan (M)	U22281
9	Mass.-MK (M)	U22280
10	Kimber (M)	U22278
11	Texas-GB (VN)	M33855
12	T.-Lauquen (VV)	AF100299
13	Beaudette-C (VN)	X04719
14	Italy-Milano (VN)	U22294
15	Aust.-Vict. (VN)	M21881
16	Largo (VV)	U22279
17	Fontana (VV)	U22274
18	Pigeon/Argentina/Capital 3/97	AY734536.1
19	Paloma tigre/98	-
20	Paloma/Uruguay/Montevideo/2/08	-
21	Pigeon/GB/1168/84	AF109885
22	Pigeon/TX/17498/98	AY008330
23	Pigeon NY/84	AY008329

Se construyó un árbol filogenético con las secuencias de 375 nt de largo del extremo 3' del gen de la proteína F, correspondientes a 134 cepas y aislamientos de NDV registrados en el GenBank. El número de acceso al GenBank, linaje genético, procedencia y fecha (Aldous, 2003) se describen en Anexo 1.

Se incluyen en esta lista las secuencias de los aislamientos realizados en palomas de Argentina y Uruguay (paloma/Tigre/6/99, paloma/Argentina/Capital 3/97, gb|AY734536.1 y paloma/Uruguay/Montevideo/2/08).

Se analizaron los mismatches de las secuencias de las sondas y los oligos usados en los ensayos de rRT-PCR y RT-PCR con la secuencia del aislamiento correspondiente a paloma/Uruguay/Montevideo/2/08.

El alineamiento y las relaciones filogenéticas de las secuencias fue realizado con los programa BioEdit v7.0.5 (Hall, 1999) y MEGA 5 (Tamura, 2007), sitios web: www.bioedit.com y www.megasoftware.net respectivamente. Las secuencias fueron alineadas comenzando por el codón de inicio (ATG en la

posición 47) del gen de la proteína F y terminando en la posición 422 que está por debajo del sitio de clivaje, usando el método de alineamiento múltiple Clustal W 5. Los resultados fueron expresados como un árbol filogenético neighbour-joining, método Bootstrap con 500 réplicas, modelo Tamura-Nei sin raíz con longitud de las ramas proporcional al número previsto de sustituciones.

4. RESULTADOS

4.1. SEROLOGÍA

Se recolectaron 20 muestras de sangre de palomas silvestres (*Columba livia*) y una de paloma mensajera. La totalidad de las mismas se procesaron por las pruebas de Inmunodifusión en Gel Agar e Inhibición de la Hemaglutinación, previamente descritas en Serología de Material y Métodos, para detectar AIV y APMV-1 respectivamente.

Todas las muestras resultaron negativas a la detección de AIV por la prueba de Inmunodifusión en Gel Agar, debido a que no se visualizaron bandas de precipitación antígeno-anticuerpo específicas.

La muestra de sangre de la paloma mensajera fue positiva a la detección de anticuerpos para APMV-1 ya que presentó un título HI mayor al límite de seropositividad establecido de 1/16 (título HI obtenido 1/32).

Una muestra de sangre de las palomas silvestres también presentó anticuerpos para APMV-1 con un título HI de 1/256.

La proporción media estimada de seropositividad en las palomas silvestres fue del 5% con un IC 95% que osciló entre el 1,3% al 24,9%.

4.2. PUESTA A PUNTO RT-PCR y rRT-PCR

Se adquirieron los Kits, reactivos y material fungible necesarios para realizar todas las pruebas dispuestas en la metodología de la investigación. Se realizaron todas las pruebas de RT-PCR y rRT-PCR de acuerdo con los protocolos de las técnicas descritas en Material y Métodos y se verificó la conformidad de los resultados de los controles positivos y negativos.

4.3. DETECCIÓN MOLECULAR (rRT-PCR)

4.3.1. Influenza Aviar

Se procesaron los 8 *pools* de muestras de hisopados cloacales y traqueales de las palomas silvestres y los hisopados traqueal y cloacal de la paloma mensajera enferma, por rRT-PCR para detectar secuencias conservadas del gen de la proteína M de AIV.

La totalidad de las muestras resultaron negativas a la detección, debido a que no se observaron curvas de amplificación en ninguno de los *pools*, con excepción de la muestra correspondiente al Pool N° 2 (ver Tabla 4). Sin embargo, la misma se consideró negativa ya que el valor de Ct igual a 38,08 fue mayor al límite de positividad (Ct=35).

Tabla 4: Resultados rRT-PCR Gen M AIV

Identificación de la muestra	Valor Ct rRT-PCR Gen M AIV
<i>Pool 1</i>	no Ct
<i>Pool 2</i>	38,08
<i>Pool 3</i>	no Ct
<i>Pool 4</i>	no Ct
<i>Pool 5</i>	no Ct
<i>Pool 6</i>	no Ct
<i>Pool 7</i>	no Ct
<i>Pool 8</i>	no Ct
Hisopado traqueal paloma mensajera	no Ct
Hisopado traqueal paloma mensajera	no Ct
Control Positivo AIV	14,09
Control Negativo Hisopado cloacal aves plantel Libres de NDV y AIV	no Ct

4.3.2. Paramixovirus Aviar tipo 1

Los 8 *pools* de muestras de hisopados cloacales y traqueales de las palomas silvestres y los hisopados traqueal y cloacal de la paloma mensajera enferma fueron procesados por rRT-PCR para detectar secuencias conservadas del gen de la proteína M de NDV.

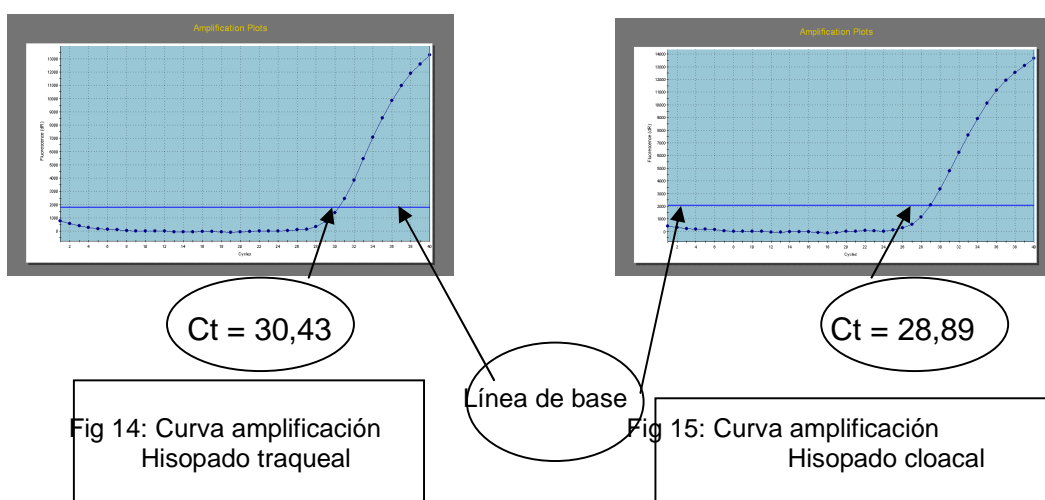
Tal como lo muestra la tabla 5, todas las muestras obtenidas de las palomas silvestres fueron negativas ya que los Pooles N° 1,2,5 y 8 no amplificaron, y los Pooles N° 3 y 4 mostraron valores de Ct de 37,32 y 38,35 respectivamente, superiores al límite de positividad (Ct = 35).

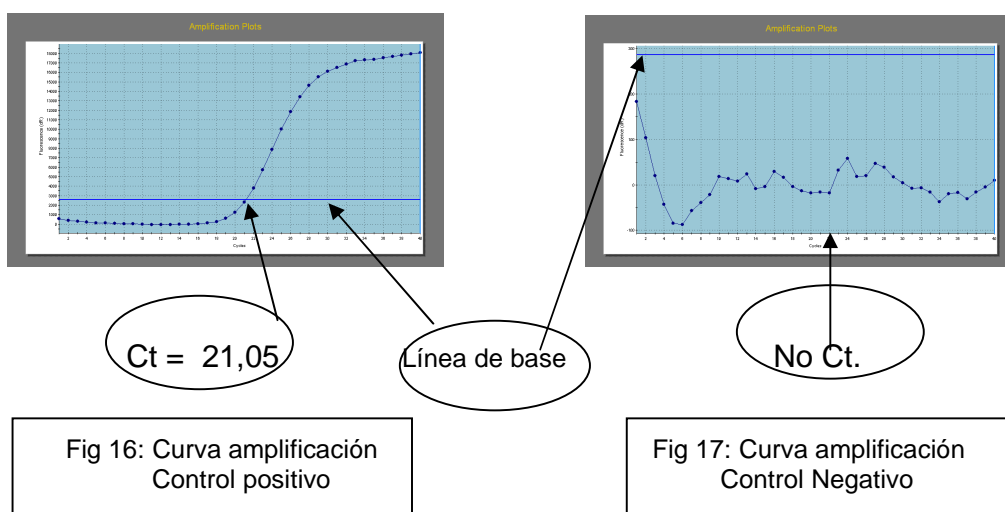
Tabla 5: Resultados rRT-PCR Gen M APMV-1

rRT-PCR gen M APMV-1	
Identificación de la muestra	Valor Ct
<i>Pool 1</i>	no Ct
<i>Pool 2</i>	no Ct
<i>Pool 3</i>	37,32
<i>Pool 4</i>	38,36
<i>Pool 5</i>	no Ct
<i>Pool 6</i>	no Ct
<i>Pool 7</i>	no Ct
<i>Pool 8</i>	No Ct
Hisopado cloacal paloma mensajera	28,89
Hisopado traqueal paloma mensajera	30,43
Control Positivo	21,05
Control Negativo	No Ct

Contrariamente a lo hallado en las palomas silvestres, se detectó APMV-1 en las muestras de hisopado traqueal y cloacal de la paloma mensajera enferma ya que como se muestra en la Tabla 5, los valores de Ct obtenidos son inferiores al límite de seropositividad establecido en Detección Molecular por rRT-PCR de Material y Métodos (Ct = de 35).

Las figuras 14 y 16 ilustran la curvas de amplificación obtenidas con las muestra de hisopado traqueal y cloacal de la paloma mensajera.





4.4. AISLAMIENTO VIRAL

Con el objetivo de aislar AIV y NDV las ocho muestras de Pooles de hisopados cloacales y traqueales obtenidos y procesados como se describió en Muestras de Materiales y Métodos, fueron inoculadas en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de 9-11 días de edad. A los 4 días se cosechó el líquido alantoideo y se realizaron dos pasajes ciegos.

No se detectó actividad hemaglutinante en los líquidos alantoides cosechados en el segundo pasaje en huevo embrionado de pollo en ninguna de las muestras de pool de hisopados traqueales y cloacales de las palomas silvestres.

Por el contrario, los líquidos alantoideos del segundo pasaje en huevo embrionado de pollo de las muestras de hisopado cloacal y traqueal de la paloma mensajera enferma presentaron un título 16 y 64 UHA respectivamente. No se observó mortalidad embrionaria en ninguno de los dos pasajes.

La especificidad de la HA se determinó al comprobar que el suero control anti-NDV inhibió la actividad hemaglutinante de los líquidos alantoides en la prueba de HI (ver Fig. 18)

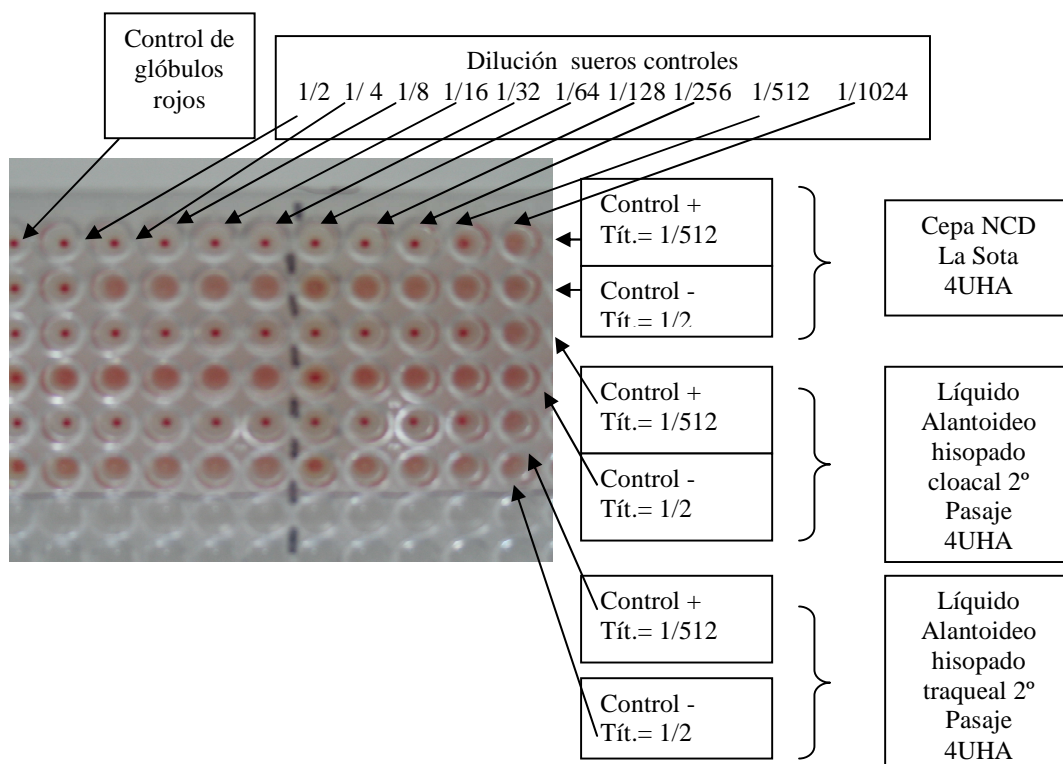


Figura 18: Prueba HI. Se visualiza la Inhibición específica de la Hemaglutinación del 2º pasaje hisopado traqueal y cloacal de la paloma mensajera enferma, y de la cepa La Sota de NDV por el suero específico anti-NDV (Título HI=1/512). En la primer hilera se observa los controles de glóbulos rojos, mientras que en las restantes se observan las reacciones de las diversas diluciones de los antisueros negativos y positivos con el antígeno control (cepa La Sota) y los sobrenadantes de los hisopados cloacal y traqueal de la paloma enferma.

El aislamiento se nombra **Paloma/Uruguay/Montevideo/2/08**.

4.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

4.5.1. RT-PCR virulento-avirulento

Con el objetivo de caracterizar molecularmente las muestras de la paloma mensajera positivas a la detección de NDV, el ARN total fue extraído y procesado por RT-PCR de acuerdo con lo descrito en RT-PCR Virulento-Avirulento de Material y Métodos.

Se determinó la virulencia, mediante la detección del gen de la proteína F usando cebadores que reconocen secuencias de nucleótidos específicas de las cepas virulentas y avirulentas.

Como ya se mencionó anteriormente, PPMV-1 a semejanza de las cepas virulentas de NDV, contiene múltiples aminoácidos básicos en el sitio de clivaje de la proteína de Fusión F. Por lo tanto es de esperar que los PPMV-1 se puedan detectar por RT-PCR usando oligos específicos para las cepas virulentas que amplifican las secuencias genéticas que codifican el sitio de clivaje de la proteína F.

Sin embargo, las muestras de hisopados traqueales y cloacales de la paloma mensajera procesadas por este ensayo fueron caracterizadas como avirulentas debido a que generaron amplicones con los oligos específicos de Virus del Grupo Newcastle (362 pb) y del Patotipo Avirulento (254 pb). En la Fig. 19 se pueden observar las bandas obtenidas.

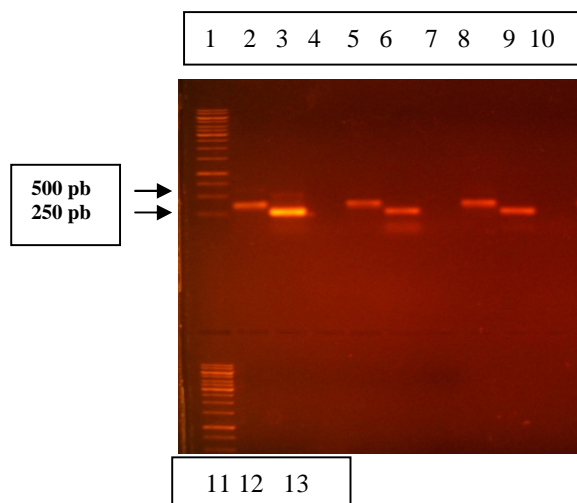


Fig. 19. Electroforesis gel de agarosa RT-PCR NDV virulento-avirulento (hisopados traqueal y cloacal paloma mensajera)

Calle	oligo	Producto PCR	Resultado
1		Marcador tamaño molecular 1 Kb	
2	Grupo NDV	Control positivo (NDV La Sota)	+
3	Avirulento	Control positivo (NDV La Sota)	+
4	Virulento	Control positivo (NDV La Sota)	-
5	Grupo NDV	Hisopado traqueal	+
6	Avirulento	Hisopado traqueal	+
7	Virulento	Hisopado traqueal	-
8	Grupo NDV	Hisopado cloacal	+
9	Avirulento	Hisopado cloacal	+
10	Virulento	Hisopado cloacal	-
11		Marcador tamaño molecular 1 Kb	
12	Grupo NDV	Control Negativo (Agua libre RNAsa)	-
13	Avirulento	Control Negativo (Agua libre RNAsa)	-
14	Virulento	Control Negativo (Agua libre RNAsa)	-

4.5.2. rRT-PCR virulento

Tal como se había descrito en rRT-PCR virulento de Material y Métodos, las muestras positivas a la detección de Paramixovirus Aviar tipo 1, se procesaron por la técnica de rRT-PCR para determinar su virulencia.

Por lo tanto, las muestras de hisopados traqueal y cloacal de la paloma mensajera enferma se procesaron por rRT-PCR para detectar secuencias

conservadas del gen de la proteína de Fusión de cepas virulentas de NDV (vNDV).

Se esperaba obtener resultados positivos debido a que PPMV-1 presenta en el sitio de clivaje de la Proteína de Fusión F, una secuencia semejante a las cepas virulentas de NDV. Sin embargo, tanto las muestras como el Plásmido de PPMV-1 El Tigre usado como control positivo, no amplificaron.

Como consecuencia de este resultado, dichas muestras se volvieron a procesar por la misma técnica, pero bajando la temperatura de alineamiento a 50°C. De esta manera se obtuvieron curvas de amplificación. En la tabla 6 se indican los valores de Ct obtenidos:

Tabla 6: rRT-PCR gen F vNDV

Identificación de la muestra	Valor de Ct temperatura alineamiento 58° C	Valor de Ct temperatura alineamiento 50° C
Hisopado traqueal paloma mensajera	no Ct	20,82
Hisopado cloacal paloma mensajera	no Ct	21,47
Plásmido F PPMV-1 "El Tigre"	no Ct	7,91
Plásmido F APMV-1 La Sota	no Ct	no Ct
Control Negativo	no Ct	no Ct

Sin embargo las mismas no tenían la forma exponencial como la obtenida en la rRT-PCR para detectar gen de M de APMV-1 (ver figura 20).

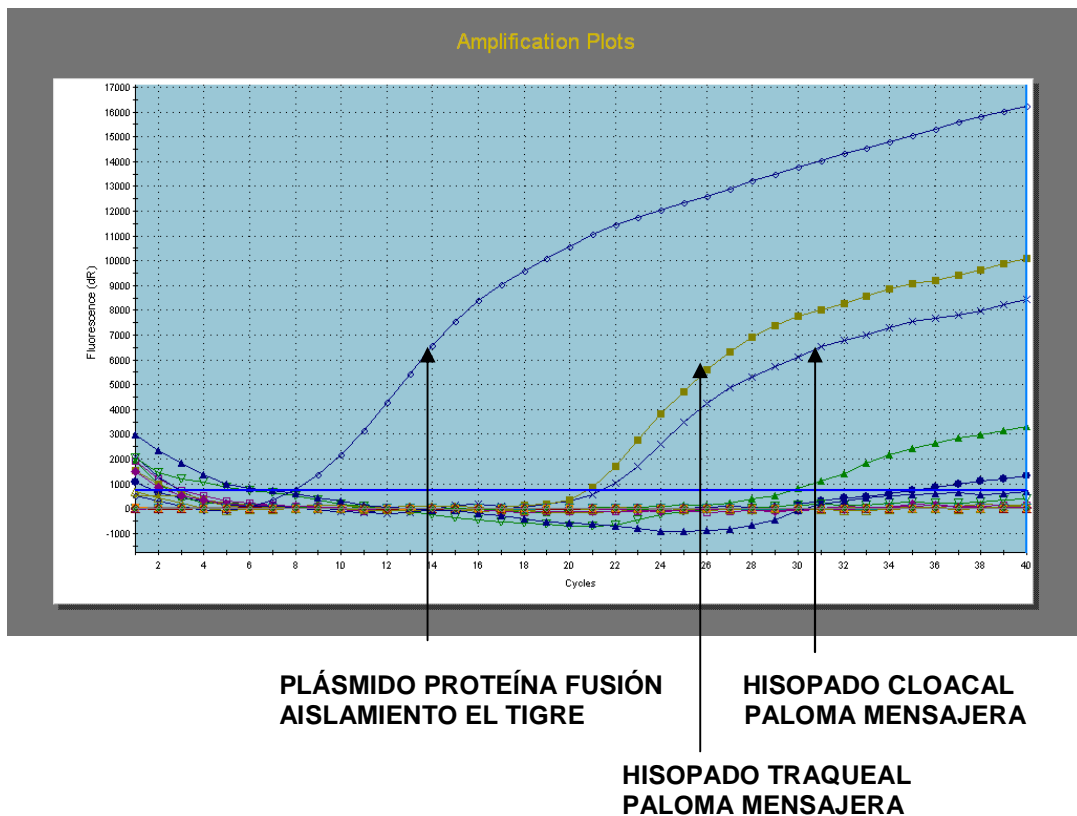


Figura 20. *rRT-PCR Gen F vNDV (alineamiento a 50°C). Se muestran las curvas de amplificación obtenidas con los extractos de ARN de los hisopados traqueal y cloacal de la paloma enferma y del plásmido de la Proteína de Fusión del aislamiento "El Tigre". Las mismas no son exponenciales lo que evidencia baja eficiencia de amplificación.*

4.5.3. rRT-PCR Paramixovirus de la Paloma (PPMV-1)

Las muestras positivas a la detección de Paramixovirus Aviar tipo 1 (muestras de hisopados traqueal y cloacal de la paloma mensajera enferma), se procesaron por la técnica de rRT-PCR descrita en: rRT-PCR Paramixovirus de paloma (PPMV-1) de Material y Métodos, para poder determinar si se identificaban con los PPMV-1 que escapan a la detección de NDV virulento por rRT-PCR (según Kim y col, 2008).

Tanto las muestras como el Plásmido de PPMV-1 El Tigre usado como control positivo no amplificaron.

Como consecuencia de este resultado, dichas muestras se volvieron a procesar por la misma técnica, pero bajando la temperatura de alineamiento a 50°C a los

efectos de poder facilitar la hibridación. Tal como lo muestra la tabla 7, tampoco se logró amplificar las muestras ni los plásmidos usados como controles.

Tabla 7: rRT-PCR gen F PPMV-1

Identificación de la muestra	Valor de Ct temperatura alineamiento 58° C	Valor de Ct temperatura alineamiento 50° C
Hisopado traqueal paloma mensajera	no Ct	no Ct
Hisopado cloacal paloma mensajera	no Ct	no Ct
Plásmido F PPMV-1 "El Tigre"	no Ct	no Ct
Plásmido F APMV-1 La Sota	no Ct	no Ct
Control Negativo	no Ct	no Ct

4.5.4. Secuenciamiento y deducción de aminoácidos

A los efectos de poder realizar la caracterización genética, los extractos de ARN de las muestras de hisopado traqueal y cloacal de la paloma enferma fueron procesados por RT-PCR empleando los oligos Seq 55 y Seq 56 para secuenciar por el método de terminadores de cadena, la región correspondiente al extremo 3' del gen de la proteína de Fusión que codifica su sitio de clivaje, de acuerdo con lo descrito en Secuenciamiento y Deducción de aminoácidos de Material y Métodos.

El secuenciamiento de nucleótidos de los productos de PCR de los cDNA de los extractos de RNA del hisopado traqueal permitió obtener fragmentos de ADN cuyas secuencias fueron las siguientes:

Muestra Hisopado cloacal paloma mensajera (487 nt)

```

NNNNNNNNNNNNCNGNTAGAAGAGTCTGGATCCCGACTGGCACACTCAAAGTGCA
ACATGGGCTCCAAACCCTCCATCAAGATCCCAGCAACTCTGATGCTGATCATCAGGAT
TACGCTGATACTGAGCTGCATCTGTTGACGAGCTCTTTGACGGCAGGCCTCTTGC
AGCTGCAGGGATTGTGGTAACAGGAGATAAGGCAATCAATANNNNNNNNNNCATCTCA
GACAGGGTCAATCATAGTCAAGTTGCTTCCGAATATGCCCAAAGACAAGGAGGCATG
TGCAAAGGCCCCATTAGAAGCATAACAAGCAACTGACCACTTTGCTCACCCCCCTT
GGTGATTCCATCCGCAGGATACAAGGGTCTGTGTCCACATCAGGAGGGAGGAGGCA
GAAGCGTTTTATAGGNGCCATTATAGGCAGTGTAGCTCTTGGGGTTGCGACGTCGGC
NCAGANNANNGNNGCCGNNNNNNNNNNNNNNNN.

```

Muestra Hisopado traqueal paloma mensajera (523 nt)

```

NTTTNNNNAAANNNNNNNNGTAGAAGAGTCTGGATCCCGACTGGCACACTCAAAGTGC
AACATGGGCTCCAAACCTCCATCAAGATCCCAGCAACTCTGATGCTGATCATCAGG
ATTACGCTGATACTGAGCTGCATCTGTTTCGACGAGCTCTCTTGACGGCAGGCCTCTT
GCAGCTGCAGGGATTGTGGTAACAGGAGATAAGGCAATCAATATATACACCTCATCTC
AGACAGGGTCAATCATAGTCAAGTTGCTTCCGAATATGCCCAAAGACAAGGAGGCAT
GTGCAAAGGCCCCATTAGAAGCATAACAAGGACTGACCACTTTGCTCACCCCCC
TTGGTGATTCCATCCGCAGGATAACAAGGGTCTGTGTCCACATCAGGAGGGGAGGAGG
CAGAAGCGTTTTATAGGTGCCATTATAGGCAGTGTAGCTCTTGGGGTTGCGACGTCG
GCACAGATAACAGCAGCCGCGGCCCTAATACAAGCCAACCAAAATGCTGCCANNNNN
NNCCNACTAN

```

A continuación se muestra la secuencia aminoacídica deducida (se incluye secuencia de nucleótidos) y se subraya la secuencia "**R R Q K R F**" correspondiente al sitio de clivaje de la proteína F de fusión característica de las cepas virulentas de NDV.

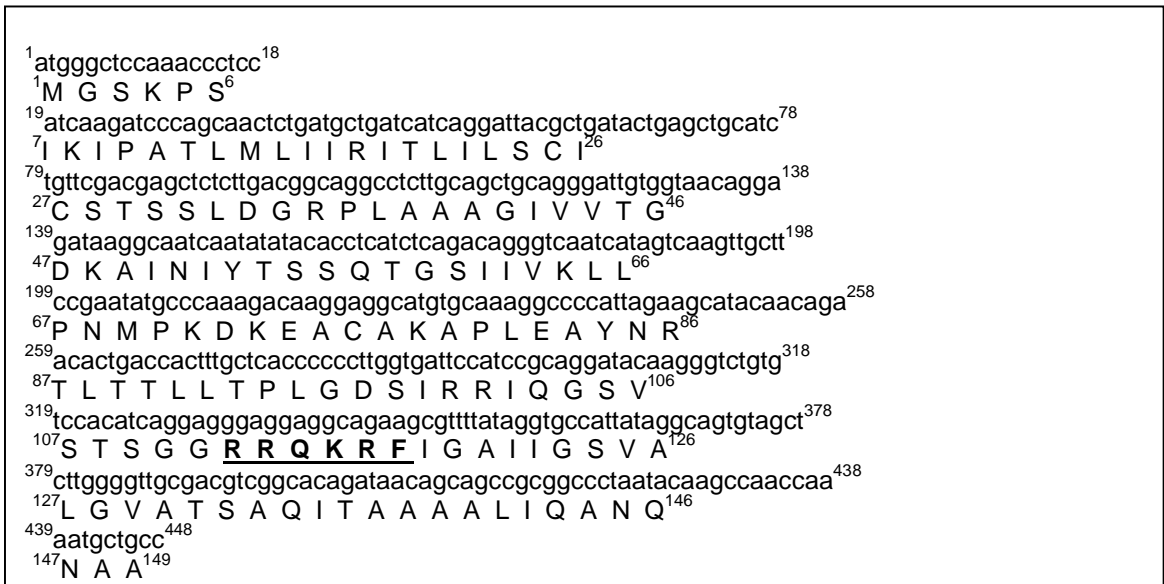
Como resultado de este hallazgo el aislamiento de Paramixovirus tipo 1 realizado en la paloma mensajera se identificó como perteneciente al patotipo virulento.

Hisopado cloacal

```

1atgggctccaaacctccatcaagatcccagcaactctgatgctgatcatcaggattacgctg65
1M G S K P S I K I P A T L M L I I R I T L21
66a t a c t g a g c t g c a t c t g t t c g a c g a g c t c t t g a c g g c a g g c c t c t t g c a g c t g c a g g g125
22I L S C I C S T S S L D G R P L A A A G41
126a t t g t g g t a a c a g g a g a t a a g g c a a t c a a t a n n n n n n n n c a t c t c a g a c a g g g t c a a t c185
42I V V T G D K A I N X X X S Q T G S I61
186a t a g t c a a g t t g c t c c g a a t a t g c c c a a a g a c a a g g a g g c a t g t g c a a a g g c c c c a t t a245
62I V K L L P N M P K D K E A C A K A P L81
246g a a g c a t a c a a c a g a a c a c t g a c c a c t t t g c t c a c c c c c t t g g t g a t t c c a t c c g c a g g305
82E A Y N R T L T T L L T P L G D S I R R101
306a t a c a a g g t c t g t g t c c a c a t c a g g a g g g a g g a g g c a g a a g c g t t t t a t a g g n g c c a t t365
102I Q G S V S T S G G R R Q K R F I X A I121
366a t a g g c a g t g a g c t c t t g g g g t t g c g a c g t c g399
122I G S V A L G V A T S133

```

Hisopado traqueal.

En la figura 21 se muestra el alineamiento nucleotídico del fragmento amplificado del hisopado traqueal junto con la secuencia del gen de la proteína de fusión F del aislamiento Pigeon/Argentina/Capital/3/97 (gb|AY734536.1) mostrando una homología del 96%.

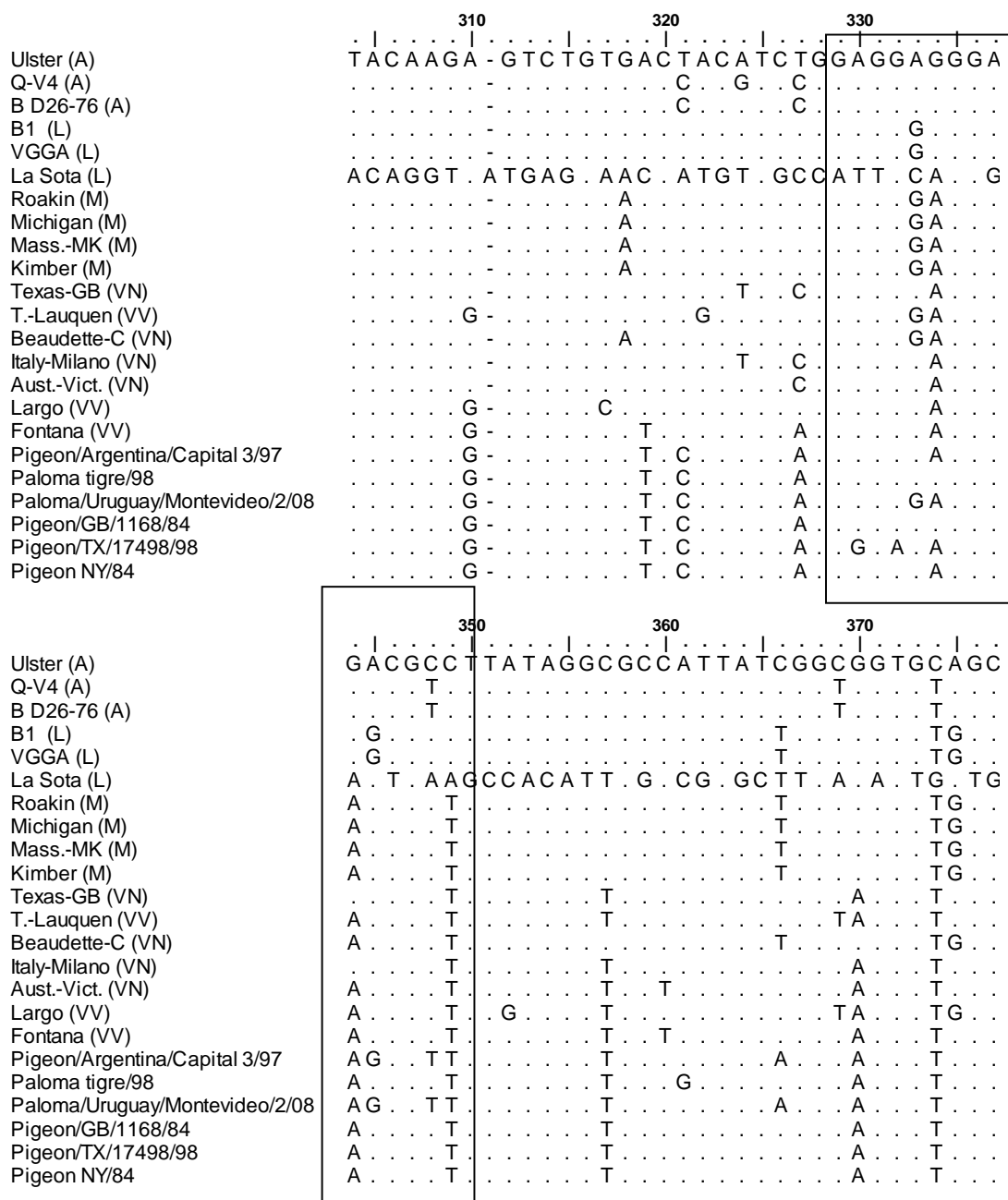


Figura 22. Alineamiento nucleotídico de Paloma/Uruguay/Montevideo/2/08 con cepas referencia de NDV y de PPMV-1 (Sólo se indican las diferencias nucleotídicas respecto de la cepa Ulster (avirulenta). En los recuadros se indican los nucleótidos que codifican el sitio de clivaje de la alicoproteína F.

El hisopado traqueal correspondiente al aislamiento Paloma/Uruguay/Montevideo/2/08 presentó arginina (R) en las posiciones 112, 113 y 116, lisina (K) en la posición 115 y fenilalanina (F) en la posición 117.

Este motivo fue idéntico al del aislamiento Pigeon/NY/84 y a otros aislamientos de palomas reportados por Collins y col. (1994).

En ambos casos los aminoácidos presentes en el sitio de clivaje son característicos de cepas virulentas de NDV. Fuera del sitio de clivaje, las secuencias de aminoácidos de ambos hisopados de paloma mensajera y Pigeon/GB/1168/84 fueron similares en un 98,6% presentando un cambio conservativo (V/I) en posición 122.

Todos los aislamientos de palomas, presentados en la Figura 23, compartieron fuera del sitio de clivaje una serina en la posición 132. Este aminoácido fue diferente para las demás cepas de NDV estudiadas las cuales presentaron alanina en la misma posición.

Secuencias deducidas extremo aminoterminal proteína F

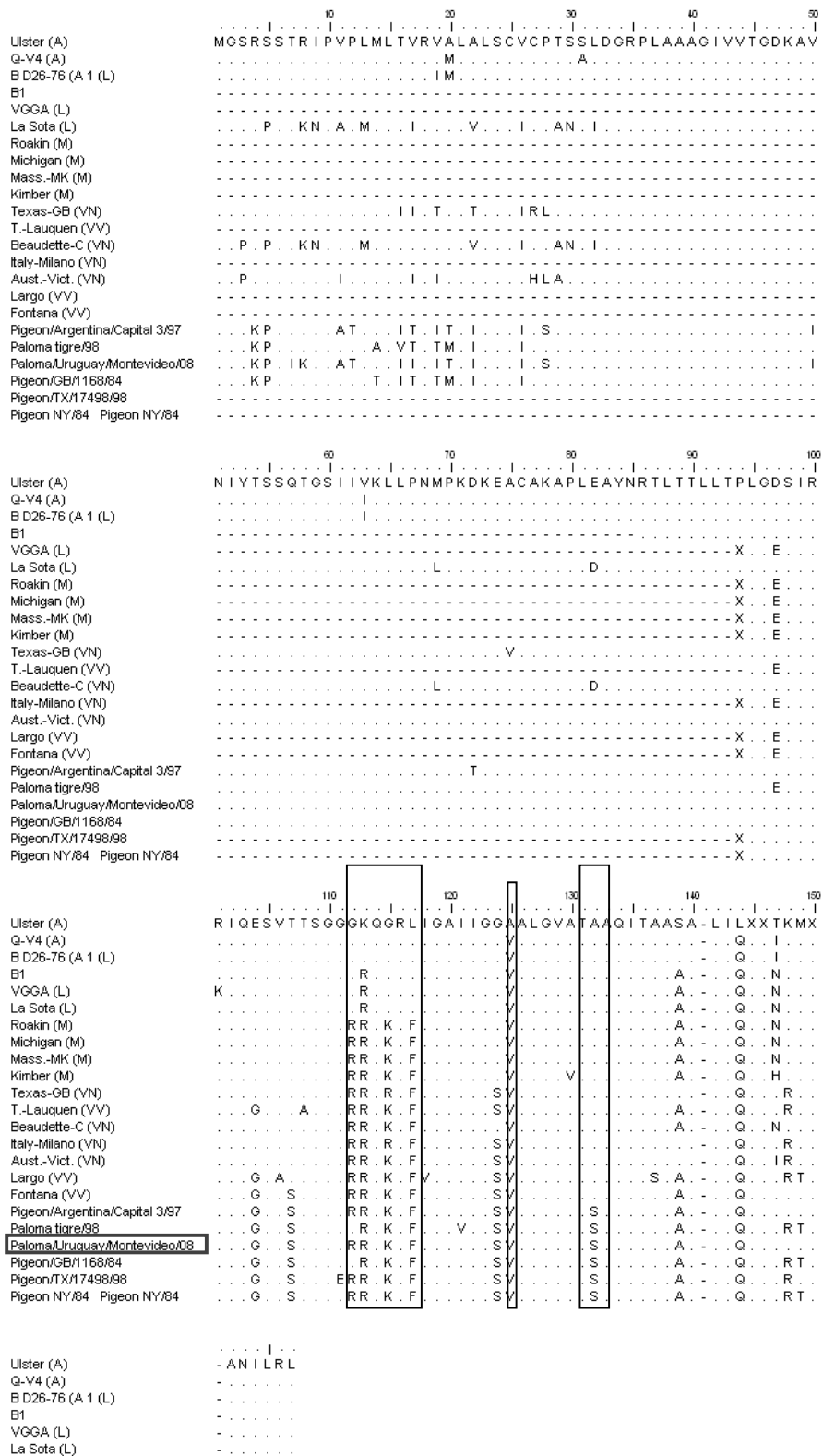


Figura 23. Secuencia deducida de aminoácido del extremo amino terminal de la proteína F
 Alineamiento Paloma/Uruguay/Montevideo/2/08 con cepas referencia de NDV y de PPMV-1 (Sólo se
 indican las diferencias aminoacídicas respecto de la cepa Ulster (avirulenta).

Con el fin de determinar la causa de la detección del aislamiento de Paramixovirus tipo 1 por rRT-PCR usando la sonda descrita por Aldous, 2001 y la falla de la misma al usar la sonda descrita por Kim y col (2008), se alinearon ambas sondas con las secuencias del aislamiento para poder cuantificar el número de mismatches en cada alineamiento.

Tal como lo muestra en el siguiente cuadro, el alineamiento de las sondas con la secuencia correspondiente a Paloma/Uruguay/Montevideo/02/08 mostró mayor homología con la sonda usada por Aldous (2001) para detectar vNDV (5 mismatches) en comparación con la sonda usada por Kim y col. (2008) para detectar PPMV-1 (6 mismatches).

Alineamiento de sondas con secuencia Paloma/Uruguay/Montevideo/02/08

Paloma/Uruguay/Montevideo/02/08	AGGAGGGAGGAGGCAGAAGCGTTT
Sonda PPMV-1 (6 mismatches)	TGGAGTAAGGAGGAAGAAACGCTT
Paloma/Uruguay/Montevideo/02/08	AAACGCTTCTGCCTCCTCCCTCCT
Sonda vNDV (5 mismatches)	AAGCGTTTCTGTCTCCTTCCTCCA

Nota: Mismatches resaltados en gris.

4.5.5. Analisis Filogenético

En la figura 24 se diagrama un árbol filogenético en el cual se puede observar el aislamiento de paloma/Uruguay/Montevideo/2/08 junto con diversas cepas de Referencia representativas de los diferentes linajes genéticos de Paramixovirus Aviar tipo 1. Como se puede apreciar, el mismo se agrupó, junto con los aislamientos el Tigre/99, Capital/98 y los demás PPMV-1, en el linaje 4b. Dicho linaje solo contiene aislamientos y cepas de PPMV-1.



Figura 24: Arbol filogenético de aislamientos y cepas de diferentes linajes de Paramixovirus Aviar tipo 1 en donde se observa el agrupamiento del aislamiento Paloma/Uruguay/2/08 en el linaje 4 b junto a los demás PPMV-1.

5. DISCUSIÓN

5.1. SEROLOGÍA

Existen opiniones encontradas en cuanto a la susceptibilidad de las palomas a AI. Mientras algunos autores han registrado casos de aislamiento de AIV (Ellis y col., 2004), otros descartan la posibilidad de infección. (Marlier y Vindevogel, 2006, Panigrahy y col., 1996, y Perkins y Swayne, 2002).

Este estudio investiga la presencia de AIV en las palomas domésticas silvestres. Los ensayos serológicos de IDGA realizados en las muestras de sangre de las palomas fueron negativos; y demuestran ausencia de circulación de AIV en las palomas domésticas estudiadas, lo que estaría indicando que esta especie no tendría un papel importante en la epidemiología de la enfermedad. Sin embargo, no se logró obtener un número de muestras necesario para realizar inferencias estadísticas sobre la prevalencia de APMV-1 en la población de palomas del Uruguay.

La Paramixovirus de la paloma se reportó por primera vez en el inicio de la década del 80 (Vindevogel y col., 1982, Kaleta y col., 1985) y a pesar de que se ha desarrollado una vacuna específica para controlar la aparición de brotes, la misma aún se considera enzoótica en algunos países. Esta enfermedad tiene gran importancia para la avicultura debido a que se ha comprobado la transmisión del agente a las aves de corral como pollos (Alexander y col., 1985) y faisanes (Werner, 1999) provocando brotes de Enfermedad de Newcastle.

En Argentina esta enfermedad se reportó por primera vez en palomas silvestres en el año 2001 (Zanetti y col., 2001) y en nuestro país existe sospecha de su presencia en palomas mensajeras y silvestres.

Con el objetivo de detectar serológicamente Paramixovirus tipo 1 en las palomas domésticas silvestres (*Columba livia*) capturadas, las muestras de sangre obtenidas fueron procesadas por la prueba HI.

El 5 % de las muestras resultaron positivas a APMV-1. Sin embargo no se pudo establecer la prevalencia del agente, debido a que el intervalo de confianza fue muy amplio (1,3-24,9%), provocado por el escaso número de muestras obtenido.

Por otro lado, el alto título HI obtenido con la muestra de sangre positiva (1/256), estaría confirmando la especificidad de la reacción debido a que el mismo es cuatro veces más alto que la dilución límite seropositividad (1/16).

Sin embargo, estos hallazgos serológicos no permiten determinar las características del virus detectado ya que podría tratarse de Paramixovirus

avirulento que habitualmente circula en aves silvestres, o virus vaccinal que presente en granjas avícolas de la zona, o bien PPMV-1.

A su vez la seropositividad de la muestra de sangre de la paloma mensajera enferma sin antecedentes de vacunación, permite realizar el diagnóstico serológico de infección por APMV-1, y el título HI relativamente bajo (1/32) estaría indicando que la paloma se encontraba en la fase aguda de la enfermedad.

Todos estos hallazgos estarían apoyando la hipótesis de la presencia de Paramixovirus Aviar tipo 1 en palomas domésticas en nuestro país.

Varios autores han realizado estudios serológicos de Paramixovirus tipo 1 en la paloma con diversos resultados como ausencia total de positivos a diversos valores de seropositividad. Los valores de seropositividad del 7% de las palomas mensajeras de Bélgica y el 19% en Francia, que estaban infectadas sin mostrar signos clínicos de la enfermedad (Landre. F., 1982; Vindevogel, H., 1982a), coinciden con estos hallazgos ya que estarían dentro de intervalo de confianza estimado.

Por otra parte, existen reportes de ausencia de seropositividad en palomas en regiones en donde no se había reportado la enfermedad. Chang (1999) no detectó presencia de anticuerpos a APMV-1 en 135 muestras de sangre de aves silvestres Columbiformes capturadas en la Provincia de Chancay del Perú, lo cual lo llevó a concluir que esta especie no era un importante reservorio del virus.

En un estudio serológico de NDV realizado en el período 1989-1991 en la Provincia de Andalucía de España (Maldonado y col., 1994) no se detectaron anticuerpos a APMV-1 en 51 muestras de sangre de palomas en cautiverio en 5 establecimientos.

Toro y col. (1999) no encontraron títulos significativos HI en 100 muestras de sangre recolectadas de palomas silvestres de vida libre en un área urbana de Santiago de Chile.

5.2. AISLAMIENTO VIRAL

El Aislamiento Viral de la totalidad de las muestras de pools de hisopados traqueales y cloacales de las palomas detectó actividad hemaglutinante en las muestras pertenecientes a la paloma mensajera enferma.

La actividad hemaglutinante, testada en los líquidos alantoideos cosechados después del segundo pasaje de las muestras en huevos embrionados de pollo,

presentó un título HA igual a 32 UHA para el aislamiento denominado Paloma/Uruguay/Montevideo/2/08.

Títulos similares al obtenido, fueron reportados por varios autores para aislamientos de palomas (Biancifiori y Fiorini, 1983, King, 1996). Finalmente, el ensayo de HI identificó al virus aislado como Paramixovirus Aviar tipo 1.

5.3. DETECCIÓN MOLECULAR

A su vez los ensayos de rRT-PCR para detectar AIV y APMV-1 en la totalidad de las muestras de las palomas estudiadas, arrojaron resultados positivos para la detección de APMV-1 en las muestras de hisopado traqueal y cloacal de la paloma enferma.

Se pudo constatar total concordancia en los resultados entre los ensayos de rRT-PCR y el aislamiento viral para detectar APMV-1 y AIV, lo cual comprueba la alta sensibilidad y especificidad de estas pruebas moleculares (Aldous, 2001).

Cabe mencionar que el uso de estas técnicas moleculares ofrece como ventaja frente al Aislamiento Viral, mayor rapidez ya que la duración de las mismas es de 2-3 horas, y en cambio el Aislamiento Viral tarda entre 2 y 12 días (el Aislamiento Viral de Paloma/Uruguay/Montevideo/2/08 se obtuvo a los 8 días de la inoculación). Otra ventaja adicional es que no es necesario contar con laboratorios de alta seguridad biológica (BSL-3) para manipular virus de alta patogenicidad ya que en estas técnicas se trabaja con el virus inactivado y por lo tanto no tienen riesgo de escape de virus infeccioso.

En consecuencia, se puede considerar a esta técnica molecular como una herramienta válida por ser usada en la detección precoz de PPMV-1 en palomas.

5.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

La patogenicidad de las cepas de NDV está relacionada con la secuencia de aminoácidos en el sitio de clivaje del precursor F_0 y la disponibilidad en los diferentes tejidos de proteasas específicas capaces de clivarlo (Nagai y col., 1976, Ogasawara y col., 1992). El precursor F_0 de las cepas virulentas de NDV contiene, en este sitio, mayor proporción de aminoácidos básicos que las cepas no virulentas. El motivo $^{112}\text{K/R-R-Q-K/R-R-F}^{117}$ es característico de cepas velogénicas y mesogénicas mientras que la secuencia $^{112}\text{G/E-K/R-Q-G/E-R-L}^{117}$ se presenta en cepas de baja virulencia (Nagai y col., 1976).

Se han desarrollado diversas técnicas moleculares para caracterizar el punto de escisión de F_0 .

Mediante el RT-PCR y usando cebadores específicos se puede obtener productos de PCR que amplifican la secuencia de nucleótidos que codifican el sitio de escisión de F_0 a partir de aislamientos, tejidos y heces procedentes de aves infectadas (Vilj en, 2005).

A su vez el rRT-PCR permite identificar cepas velogénicas cuando se emplean cebadores y sondas específicas que reconocen secuencias representativas de los virus velogénicos (Aldous, 2001).

La presencia de múltiples aminoácidos básicos en el punto de escisión de F_0 caracteriza a los virus virulentos o potencialmente virulentos y esto se ha incorporado en la definición de la Enfermedad de Newcastle en el Manual de la OIE. Sin embargo hay que tener en cuenta que la ausencia de los mismos no confirma ausencia de patogenicidad del virus debiéndose recurrir al uso de pruebas biológicas confirmatorias.

5.4.1. RT-PCR Virulento-Avirulento

El RT-PCR usado para determinar el patotipo del PMV-1 no obtuvo resultados concordantes con la secuenciación de nucleótidos ya que el hisopado fue caracterizado como avirulento mientras que la secuenciación determinó una secuencia en el sitio que codifica el sitio de clivaje de la proteína F compatible con las cepas virulentas (¹¹²RRQKRF¹¹⁷).

Si bien esta técnica ha demostrado ser eficaz para patotipificar aislamientos de NDV de pollos (Wang, 2001), no demostró ser confiable para patotipificar aislamientos de PPMV-1 (Kant, 1997).

Para poder explicar esta falla en la detección del patotipo virulento del Paramixovirus de la Paloma habría que secuenciar los productos de PCR obtenidos por esta técnica para poder determinar los sitios de alineamiento con el genoma de PPMV-1.

Por lo tanto debería usarse otra técnica RT-PCR para poder diferenciar PPMV-1 de los restantes Paramixovirus aviares tipo 1. En tal sentido se propone usar una técnica RT-PCR que utiliza oligonucleótidos específicos que reconocen la región genómica codificante de la señal de localización nuclear de la proteína M de NDV pero no de PPMV-1 (Seal y col., 1995).

Se propone además, ensayar y validar otras técnicas de RT-PCR para detectar PPMV-1 tales como el nested RT-PCR descrito por otros autores (Barbezange y Jestin, 2003, Lei Zhang, 2010).

5.4.2. rRT-PCR Virulento

En cuanto a los resultados obtenidos con el rRT-PCR para determinar la virulencia, se pudo constatar que la técnica validada por NVSL-USDA, Ames para detectar cepas virulentas de la Enfermedad de Newcastle (vNDV) no logró amplificar ADN de los extractos de ARN de los hisopados de la paloma mensajera enferma, a pesar de que la misma detecta secuencias que presentan múltiples aminoácidos básicos en el sitio de clivaje de la Proteína de Fusión F presentes en vNDV y PPMV-1.

Sin embargo al bajar la temperatura de alineamiento, la sonda para detectar gen de proteína F de vNDV generó curvas de amplificación aunque no en forma exponencial, como las obtenidas con la sonda para detectar gen de proteína M de APMV-1.

Tal como lo describen Kim y col. (2006) esto se puede explicar por el hecho de que existe menor grado de homología entre las secuencias de las sondas usadas con las de los aislamientos de PPMV-1 y por lo tanto ambas no logran alinearse cuando se someten a la temperatura de hibridación establecida. Al bajar la temperatura, las cadenas se unen y por lo tanto se produce la amplificación de ADN pero con una eficiencia menor, tal como lo muestra la forma de la curva.

Por lo tanto, para poder validar el rRT-PCR para detección del gen de la proteína F de PPMV-1 debería optimizarse la temperatura de hibridación de la sonda con un gradiente de temperatura. Una vez alcanzado este objetivo se debería estudiar el comportamiento de la misma en la detección de un número significativo de aislamientos de PPMV-1.

Recientemente Fratnik y col. (2010) describen un rRT-PCR que utiliza sondas MGB diseñadas para reconocer específicamente motivos virulentos y avirulentos del sitio de clivaje de la proteína F de APMV-1 y PPMV-1.

5.4.3. rRT-PCR PPMV-1

Por otro lado, no se obtuvieron curvas de amplificación cuando se usó la sonda empleada por Kim y col. (2008) para detectar cepas de PPMV-1 que escapan a la detección por la técnica anteriormente mencionada (rRT-PCR Virulento), en ninguna de las dos temperaturas de alineamiento ensayadas.

Como se mostró en la Sección: rRT-PCR Paramixovirus de la Paloma (PPMV-1) en Resultados, la sonda para detectar vNDV descrita por Aldous (2001), pudo amplificar ADN probablemente debido a que presenta menor número de mismatches que la sonda descrita por Kim y col. (2008).

5.4.4. Analisis genético

El análisis molecular del hisopado traqueal de la paloma mensajera enferma permitió determinar la secuencia ¹¹²RRQKRF¹¹⁷ en el sitio de clivaje de la proteína de fusión. Este motivo fue idéntico al de otros aislamientos de palomas reportados por Collins y col. (1994) y es característico de cepas virulentas de NDV.

Sin embargo, es importante mencionar que en el caso de PPMV-1 no existe una correlación estricta entre la secuencia aminoacídica del sitio de clivaje de la glicoproteína F y su virulencia en pollos debido a que se han encontrado PPMV-1 virulentos y avirulentos con estos motivos de secuencia molecular en el sitio de clivaje de la proteína de fusión F (Collins y col., 1994, Meulemans y col., 2002, Smietanka y col., 2006, Dortman y col., 2010).

Por lo tanto para poder evaluar la virulencia del virus Paloma/Uruguay/Montevideo/2/08 sería necesario recurrir al uso de pruebas biológicas como el Índice de Patogenicidad Intracerebral (ICPI).

Esto está indicando que otros factores, tanto ambientales como genéticos, influyen en la patogenicidad de la variante de palomas y que la determinación de este motivo tendría más importancia en la caracterización filogenética que en la asociación con patogenicidad cuando se trata de aislamientos de PPMV-1.

La caracterización genética sugiere que el aislamiento Paloma/Uruguay/Montevideo/2/08 podría tener un origen en común con el aislamiento Pigeon/Argentina/Capital/3/97 (gb|AY734536.1|) debido a su alto grado de homología genética (96%) y a la proximidad en el tiempo en que se detectaron.

En el análisis filogenético, el hisopado traqueal de la paloma mensajera correspondiente al aislamiento Paloma/Uruguay/Montevideo/02/10 se agrupó junto a otros aislamientos de PPMV-1 en el linaje 4b (Aldous, 2004, Liu, 2006) formando un grupo diferenciado del resto de las cepas y aislamientos de NDV que caracteriza a esta variante de NDV.

La presencia confirmada de PPMV-1 por los ensayos de secuenciación y análisis filogenético, en la población de las palomas domésticas en el Uruguay, podría tener importancia epidemiológica a tener en cuenta en los Programas Sanitarios de Vigilancia de la Enfermedad de Newcastle para tomar decisiones sobre adopción de medidas preventivas, tales como la vacunación y el fortalecimiento de la bioseguridad en los establecimientos de cría de palomas mensajeras.

Mediante la adopción de estas medidas se lograría disminuir la circulación de PPMV-1 y el riesgo de transmisión del virus de las palomas mensajeras a las aves silvestres y a las de corral. De esta forma se estarían tomando acciones destinadas a mantener la excelente condición sanitaria de la avicultura del país, de ser libre de la Enfermedad de Newcastle.

7. CONCLUSIONES

Se obtuvieron hallazgos de serología negativa a infección por AIV y positiva a infección por APMV-1 en las palomas silvestres capturadas.

El rRT-PCR resultó ser un ensayo eficaz para la detección rápida de Paramixovirus Aviar tipo 1 en las palomas domésticas.

El secuenciamiento nucleotídico y el análisis filogenético permitió caracterizar al Paramixovirus Aviar tipo 1 detectado como un Paramixovirus de la Paloma (PPMV-1).

Se realizó el primer aislamiento de Paramixovirus de la Paloma (PPMV-1) en el Uruguay.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abolnik, C., Horner, R., Maharaj, R., Viljoen, G.J. (2004) Characterization of a pigeon paramyxovirus (PPMV-1) isolated from chickens in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 70(2):157-160.
2. Aldous, E.W., Collins, M.S., McGoldrick, A., Alexander, D.J. (2001) Rapid pathotyping of Newcastle disease virus (NDV) using fluorogenic probes in a PCR assay. *Veterinary Microbiology* 80(3):201-221.
3. Aldous, E.W., Fuller, C.M., Mynn, J.K., Alexander, D.J. (2004) A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (PPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons. *Avian Pathology* 33(2):258-269.
4. Aldous, E.W., Manvell, R.J., Cox, W.J., Ceeraz, V., Harwood, D.G., Shell, W., Alexander, D.J., Brown, I.H. (2007) Outbreak of Newcastle disease in pheasants (*Phasianus colchicus*) in south-east England in July 2005. *Veterinary Record* 160(14):482-484.
5. Aldous, E.W., Mynn, J.K., Banks, J., Alexander, D.J., (2003) A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathology* 32(3):239–257.
6. Alexander, D.J, Russell, P.H, Collins, M.S. (1984) Paramyxovirus type 1 of racing pigeons: 1 characterization of isolated viruses. *Veterinary Record* 114(18):444-446.
7. Alexander, D.J. (1997) Newcastle disease and other Paramyxoviridae infections. En: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L., Saif, Y.M. eds. *Diseases of poultry*. 10^a ed. Ames, Iowa State University Press. p.541-569.
8. Alexander, D.J. (2001) Newcastle disease. *British Poultry Science* 42(1): 5-22.
9. Alexander, D.J., Manvell, R.J., Lowings, J.P., Frost, K.M., Collins, M.S., Russell, P.H., Smith, J.E. (1997) Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathology* 26:399-418.
10. Alexander, D.J., Russell, P.H., Parsons, G., Abu Elzein, E., Ballouh, A., Cernik, K., Engstrom, B., Fevereiro, M., Fleury, H.J.A., Guittet, M.E., Kaleta, F., Kihm, U., Kusters, J., Lomniczi, B., Meister, J., Meulemans, G., Nerome, K., Petek, M., Pokomunski, S., Polten, B., Prip, M., Richter, R., Saghy, E., Samberg, Y., Spanoghe, L., Tumova, B. (1985a) Antigenic and biological characterisation of avian paramyxovirus type I isolates from pigeons: an international collaborative study. *Avian Pathology* 14:365-376.

11. Alexander, D.J., Wilson, G.W.C., Russell, P.H., Lister, S.A., Parsons, G. (1985b) Newcastle disease outbreaks in fowl in Great Britain during 1984. *Veterinary Record* 117(17):429-434.
12. Asociación Latinoamericana de Avicultura (ALA) Comité Sanidad Aviar (2009) Influenza Aviar: actualización a julio de 2008. Boletín N° 50. Disponible en: <http://www.avicolatina.org/comu.htm>. Fecha de consulta: 22 de mayo de 2009.
13. Barbezange, C., Jestin, V. (2003) Monitoring of pigeon paramyxovirus type-1 in organs of pigeons naturally infected with *Salmonella Typhimurium*. *Avian Pathology* 32(3):277-283.
14. Beard, C.W., Hanson, R.P. (1981) Newcastle disease. En: Hofstad, M.S., ed. *Diseases of Poultry*. 7ª ed. Ames, Iowa State University Press. p.452-470.
15. Biancifiori, F., Fioroni, A. (1983) An occurrence of Newcastle disease in pigeons: virological and serological studies on the isolates. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 6(3): 247-252.
16. Capua, I., Alexander, D. (2010) Perspectives on the global threat: the challenge of avian Influenza viruses for the world's veterinary community. *Avian Diseases* 54(S1):176-178.
17. Chambers, P., Pringle, C.R., Easton, A.J. (1990) Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *Journal of General Virology* 71:3075-3080.
18. Chang, P., Icochea, E., Alba, M. (1999) Detección de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle en aves silvestres paseriformes y columbiformes en la Provincia de Chancay. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 10(2):79-81.
19. Chomczynski, P., Sacchi, N. (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols* 1(2):581-585.
20. Collins, M.S., Strong, I., Alexander, D.J. (1994) Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses". *Archives of Virology* 134:403-411.
21. Collins, M.S., Strong, I., Alexander, D.J. (1996) Pathogenicity and phylogenetic evaluation of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses" based on the nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Archives of Virology* 141:635-647.
22. Creelan, J.L., Graham, D.A., McCullough, J.M. (2002) Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Pathology* 31:493-494.

23. De Leeuw, O.S., Koch, G., Hartog, L., Ravenshorst, N., Peeters, B.P.H (2005) 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. *Journal of General Virology* 86:1759–1769.
24. Días, L.E. (2010) Establecer el estado sanitario de las explotaciones avícolas del Uruguay e implementar un sistema de vigilancia para Influenza aviar y Newcastle como primer paso para el desarrollo de un Sistema Sanitario Avícola Nacional sostenible. Montevideo, INIA. Serie FPTA N°25. 35 p.
25. Dortmans, J.C., Fuller, C.M., Aldous, E.W., Rottier, P.J., Peeters, B.P. (2010) Two genetically closely related pigeon paramyxovirus type 1 (PPMV-1) variants with identical velogenic fusion protein cleavage sites but with strongly contrasting virulence. *Veterinary Microbiology* 143(2-4):139-44.
26. Doyle, T.M. (1927) A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. (Abstract) Disponible en: http://icu.olgwebhosting.com/rural_poultry/content/publications/Doyle1927_0032.htm. Fecha de consulta: 22 de abril de 2010.
27. Easterday, B.C., Hinshaw, V.S., Halvorson, D.A. (1997) Influenza. En: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L., Saif, Y.M. (ed.) *Diseases of poultry*. 10th ed. Ames, Iowa State University Press. p.583-605.
28. Elis, T.M., Bousfield, R.B., Bissett, L.A., Dyrting, K.C., Luk, G.S., Tsim, S.T., Sturm-Ramirez, K., Webster, R.G., Guan, Y., Malik Peiris, J.S. (2004) Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathology* 33(5):492-505.
29. Fouchier, R.A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Van Der Kemp, L., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D. (2000) Detection of Influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *Journal of Clinical Microbiology* 38(11):4096–4101.
30. Fratnik, A., Steyer, A., Zorman Rojs, O., Krapež, U., Slavec, B., Barlić-Maganja, D. (2010) A diagnostic method based on MGB probes for rapid detection and simultaneous differentiation between virulent and vaccine strains of avian paramyxovirus type 1 *Journal of Virological Methods* 166 (2010) 28–36.
31. Fujii, Y., Sakaguchi, T., Kiyotani, K., Yoshida, T. (1999) Comparison of substrate specificities against the fusion glycoprotein of virulent Newcastle disease virus between a chick embryo fibroblast processing protease and mammalian subtilisin-like proteases. *Microbiology and Immunology* 43:133-140.

32. Fusaro, A. (2009) Sequencing (PowerPoint) Seminario de actualización científico-técnica en diagnóstico molecular avanzado. Laboratorio LANAGRO, Campinas, Brasil, 21-25 de septiembre.
33. García-García, J., Ramos, C. (2006) La influenza, un problema vigente de salud pública. *Salud pública México* 48: (3) 48:244-267.
34. Garten, W., Berk, W., Nagai, Y., Rott, R., Klenk, H.D. (1980a) Mutational changes of the protease susceptibility of glycoprotein F of Newcastle disease virus: effects on pathogenicity. *Journal of General Virology* 50:135-147.
35. Garten, W., Kohama, T., Klenk, H.D. (1980b) Proteolytic activation of the haemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus involves loss of a glycopeptide. *Journal of General Virology* 51:207-211.
36. Gelb, J.Jr., Fries, P.A., Peterson, F.S. (1987) Pathogenicity and cross-protection of pigeon paramyxovirus-1 and Newcastle disease virus in young chickens. *Avian Diseases* 31(3):601-606.
37. Giorgi, C., Blumberg, B.M., Kolakofsky, D. (1983) Sendai virus contains over-lapping genes expressed from a single mRNA. *Cell* 35(2):829-836.
38. Glickman, R.L., Syddall, R.J., Iorio, R.M., Sheehan, J.P., Bratt, M.A. (1988) Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *Journal of General Virology* 62(1):354-356.
39. Gotoh, B., Ogasawara, T., Toyoda, T., Inocencio, N.M., Hamaguchi, M., Nagai, Y. (1990) An endoprotease homologous to the blood clotting factor X as a determinant of viral tropism in chick embryo. *EMBO Journal* 9(12): 4189-4195.
40. Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
41. Higgins, D.A., Shortridge, K.F. (1988) Newcastle disease in tropical and developing countries. En: Alexander, D.J. ed. *Newcastle Disease*. Boston: Kluwer Academic. p.113-130.
42. Hightower, L.E., Bratt, M.A. (1974) Protein synthesis in Newcastle disease virus-infected chicken embryo cells. *Journal of Virology* 13:788-800.
43. Horimoto T., Kawaoka, Y. (2001) Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 14(1): 129-149.
44. Huang, C., Kiyotani, K., Fujii, Y., Fukuhara, N., Kato, A. (2000) Involvement of the zinc-binding capacity of sendai virus V protein in viral pathogenesis. *Journal of Virology* 74(17):7834-7841.
45. Jørgensen, P.H., Handberg, K.J., Ahrens, P., Hansen, H.C., Manvell, R.J., Alexander D.J. (1999) An outbreak of Newcastle Disease in free-living

- pheasants (*Phasianus colchicus*). *Journal of Veterinary Medicine Series B* 46(6):381-387.
46. Jørgensen, P.H., Handberg, K.J., Ahrens, P., Therkildsen, O.R., Manvell, R.J., Alexander, D.J. (2004) Strains of avian paramyxovirus type 1 of low pathogenicity for chickens isolated from poultry and wild birds in Denmark. *Veterinary Record* 154(16): 497-500.
 47. Kaleta, E.F., Alexander D.J., Russell, P.H. (1985) The first isolation of the avian PMV-1 virus responsible for the current panzootic in pigeons? *Avian Pathology* 14: 553-557.
 48. Kaleta, E.F., Baldauf, C. (1988) Newcastle disease in free-living and pet birds. En: Alexander, D.J. ed. *Newcastle Disease*. Boston: Kluwer Academic. p.197-246.
 49. Kant, A., Koch, G., Van Roozelaar, D.J., Balk, F., Ter Huurne, A. (1997) Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. *Avian Pathology* 26:837-849.
 50. Kato, A., Kiyotani, K., Yoshida, T., Shioda, T., Nagai, Y. (1997) Importance of the cysteine-rich carboxyl-terminal half of V protein for Sendai virus pathogenesis. *Journal of Virology* 71: 7266-7272.
 51. Kim, L.M., Afonso, C.L., Suarez, D.L. (2006) Effect of probe-site mismatches on detection of virulent Newcastle disease viruses using a fusion-gene real-time reverse transcription polymerase chain reaction test. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18:519-528.
 52. Kim, L.M., King, D.J., Guzman, H., Tesh, R.B., Travassos da Rosa, A.P.A., Bueno, R.Jr., Dennett, J.A., Afonso, C.L. (2008) Biological and phylogenetic characterization of pigeon paramyxovirus serotype 1 circulating in wild north american pigeons and doves. *Journal of Clinical Microbiology* 46(10):3303–3310.
 53. King D.J. (1996) Avian paramyxovirus type 1 from pigeons: isolate characterization and pathogenicity after chicken or embryo passage of selected isolates. *Avian Diseases* 40: 707-714.
 54. Kingsbury, D.W., Hsu, C.H., Murti, K.G. (1978) Intracellular metabolism of Sendai virus nucleocapsids. *Virology* 91(1):86-94.
 55. Kolakofsky, D., Pelet, T., Garcin, D., Hausmann, S., Curranand, J., Roux, L. (1998) Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *Journal of Virology* 72:891-899.
 56. Lamb, R. A., Kolakofsky, D. (2001). *Paramyxoviridae: the viruses and their replication*. En: Knipe, D.M., Howley, P.M. eds. *Fields Virology*. 4^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.1305-1340.
 57. Landre, F., Vindevogel, H., Pastoret, P.P., Schwers, A., Thiry, E., Espinasse, J. (1982) Fréquence de l'infection du pigeon par le Pigeon

- herpesvirus 1 et le virus de la maladie de Newcastle dans le nord de la France. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 158(6):523-528.
58. Liu, H., Wang, Z., Song, C., Wang, Y., Yu, B., Zheng, D., Sun, C., Wu, Y. (2006) Characterization of pigeon-origin Newcastle-disease virus isolated in China. *Avian Diseases* 50(4): 636-640.
 59. Liu, H., Wang, Z., Wu, Y., Zheng, D., Sun, C., Bi, D., Zuo, Y., Xu., T. (2007) Molecular epidemiological analysis of Newcastle Disease virus isolated in China in 2005. *Journal of Virological Methods* 140(1-2):206-211.
 60. Maldonado, A., Arenas, A., Tarradas, M.C., Carranza, J., Luque, I., Mirada, A., Perea, A. (1994) Prevalence of antibodies to avian paramyxovirus 1, 2 and 3 in wild and domestic birds in southern Spain. *Avian Pathology* 23:145-152.
 61. Marlier, D., Vindevogel, H. (2006) Review: viral infections in pigeons. *Veterinary Journal* 172(1):40–51.
 62. Mathieu, C., Moreno, V., Retamal, P., Gonzalez, A., Rivera, A., Fuller, J., Jara, C., Lecocq, C., Rojas, M., García, A., Vasquez, M., Agredo, M., Gutiérrez, C.; Escobar, H.; Fasce, R.; Mora, J.; García, J.; Fernández, J.; Ternicier, C., Avalos, P. (2010) Pandemic (H1N1) 2009 in breeding turkeys, Valparaiso, Chile. *Emerging Infectious Diseases* 16(4). Disponible en: <http://www.cdc.gov/eid/content/16/4/709.htm>. Fecha de consulta: 7 de agosto de 2010.
 63. Mayo, M. A. (2002) A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archives of Virology* 147(8):1655-1656.
 64. McGinnes, L.W., Gravel, K., Morrison, T.G. (2002) Newcastle disease virus HN protein alters the conformation of the F protein at cell surfaces. *Journal of Virology* 76(24):12622–12633.
 65. Meulemans, G., Gonze, M., Carlier, M.C., Petit, P., Burny, A., Lé Long, L. (1986) Protective effects of HN and F glycoprotein-specific monoclonal antibodies on experimental Newcastle disease. *Avian Pathology* 15:761-768.
 66. Meulemans, G., van den Berg, T., Decaesstecker, M., Boschmans, M. (2002) Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. *Avian Pathology* 31:515–519.
 67. Miller, P.J., Decanini, E.L., Afonso, C.L. (2010) Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infection, Genetics and Evolution* 10:26–35.
 68. Mirza, M.A., Sheehan, J.P., Hardy, L.W., Glickman, R.L., Iorio, R.M. (1993) Structure and function of a membrane anchor-less form of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. *Journal of Biological Chemistry* 268(28):21425-21431.

69. Moreno, V., García, A., Mathieu, C. (2009) Caracterización molecular y patogenicidad del virus de la enfermedad de Newcastle (ENC) aislado en cormoranes: Chile, 2007. Boletín Veterinario Oficial, N°9. Disponible en: http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_9_I_semestre_2009/articulos/caracterizacion_ENC_2007.pdf Fecha de consulta: 28 de mayo de 2010.
70. Munch, M., Nielsen, L.P., Handberg, K.J., Jørgensen, P.H. (2001) Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. *Archives of Virology* 146:87-97.
71. Munhoz Soares, P.B., Demétrio, C., Sanfilippo, L., Nagamori Kawanoto, A.H., Brentano, L., Durigon, E.L. (2005) Standardization of a duplex RT-PCR for the detection of Influenza A and Newcastle disease viruses in migratory birds. *Journal of Virological Methods* 123:125-130.
72. Nagai, Y., Klenk, H. D., Rott, R. (1976) Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 72:494-508.
73. Nagai, Y., Klenk, H.D. (1977) Activation of precursors to both glycoproteins of Newcastle disease virus by proteolytic cleavage. *Virology* 77:125-134.
74. Nagai, Y., Shimokata, K., Yoshida, T., Hamaguchi, M., Iinuma, M., Maeno, K., Matsumoto, T., Klenk, H.D., Rott, R. (1979) The spread of a pathogenic and an apathogenic strain of Newcastle disease virus in the chick embryo as depending on the protease sensitivity of the virus glycoproteins. *Journal of General Virology* 45:263-272.
75. Ogasawara, T., Gotoh, B., Suzuki, H., Asaka, J., Shimokata, K., Rott, R., Nagai, Y. (1992) Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. *EMBO Journal* 11(2):467-472.
76. Organización Mundial de Sanidad Animal. OIE. Comisión de Estándares Biológicos. (2006a) Enfermedad de Newcastle. En: OIE, Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). 5ª ed. París, Organización Mundial de Sanidad Animal. p.292-296.
77. Organización Mundial de Sanidad Animal. OIE. Comisión de Estándares Biológicos. (2006b) Gripe aviar muy virulenta. En: OIE, Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). 5ª ed. París, Organización Mundial de Sanidad Animal. p.281-292.
78. Panigrahy, B., Schmitt, B.J. (2005) Agar gel Immunodiffusion (AGID) test principles and techniques. USDA Avian Influenza Virus and Newcastle Disease Virus Diagnostic Workshop, junio 13-17. Ames, Iowa State University. 15 p.

79. Panigrahy, B., Senne, D.A., Pedersen, J.C., Shafer, A.L., Pearson, J.E. (1996) Susceptibility of pigeons to avian influenza. *Avian Diseases* 40(3): 600-604.
80. Pearson, J.E., Senne, D.A., Alexander, D.J., Taylor, W.D., Peterson, L.A., Russell, P.H. (1986) Characterization of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus-1) isolated from pigeons. *Avian Diseases* 31(1):105-111.
81. Pereda, A.J., Uhart, M., Perez, A.A., Zaccagnini, M.E., La Sala, L., Decarre, J., Goijman, A., Solari, L., Suarez, R., Craig, M.I., Vagnozzi, A., Rimondi, A., König, G., Terrera, M.V., Kaloghlian, A., Song, H., Sorrell, E.M., Perez, D.R. (2008) Avian Influenza virus isolated in wild waterfowl in Argentina: evidence of a potentially unique phylogenetic lineage in South America. *Virology* 378(2):363-370.
82. Perkins, L.E; Swayne, D.E. (2002) Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. *Avian Diseases* 46(1):53-63.
83. Pharo, H. (2001) Import risk analysis: avian paramyxovirus type 1 in hens' hatching eggs. Wellington, New Zealand. Ministry of Agriculture and Forestry. 34 p. Disponible en: <http://www.biosecurity.govt.nz/files/regs/imports/risk/avian-paramyxovirus-ra.pdf>. Fecha de consulta: 28 de mayo de 2010.
84. Richardson, C.D., Scheid, A., Choppin, P.W. (1980) Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the F1 or HA2 viral polypeptides. *Virology* 105:205-222.
85. Robinson, W.S. (1971) Sendai virus RNA synthesis and nucleocapsid formation in the presence of cycloheximide. *Virology* 44: 494-502.
86. Rott, R., Klenk, H.D. (1988) Molecular basis of infectivity and pathogenicity of Newcastle disease virus. En: Alexander, D.J. ed. *Newcastle Disease*. Boston: Kluwer Academic. p.98-112.
87. Roulston, A., Marcellus, R.C., Branton, P.E. (1999) Viruses and apoptosis. *Annual Review of Microbiology* 53(1):577-628.
88. Rovid Spickler, A. (2009) Influenza. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/influenza.pdf>. Fecha de consulta: 22 de mayo de 2009.
89. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. (1977) DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12):5463-5467.
90. Santos-López, G., Hernández, J., Borraz-Argüello, M.T., Ramírez-Mendoza, H., Vallejo V., Reyes-Leyva, V.J. (2004) Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del Rubulavirus porcino. *Archivos de Medicina Veterinaria* 36(2):119-136.

91. Scheid, A., Choppin, P.W. (1974) Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology* 57:475-490.
92. Scheid, A., Choppin, P.W. (1977) Two disulfide-linked polypeptide chains constitute the active F protein of paramyxovirus. *Virology* 80:54-66.
93. Scientific Psychic (2010) Clasificación de los virus. Disponible en: <http://www.scientificpsychic.com/health/virus-humano.html>. Fecha de consulta: 4 de agosto de 2010.
94. Seal, B., King, D.J., Bennett, J.D. (1995) Characterisation 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.
95. Senne, D. (2010) Avian Influenza in North and South America, the Caribbean, and Australia, 2006-2008. *Avian Diseases* 54(S1):179-186.
96. Smietanka, K., Minta, Z., Domańska-Blicharz, K., Majer-Dziedzic, B., Pochodyła, A. (2006) Characterization of pigeon paramyxovirus type 1 strains isolated in Poland in 1988-2005. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 50: 283-286.
97. Spackman, E., McCracken, K.G., Winker, K., Swayne, D.E. (2007) An Avian Influenza Virus from waterfowl in South America contains genes from North American Avian and Equine Lineages. *Avian Diseases* 51(S1): 273-274.
98. Spackman, E., Senne, D., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T., Suarez, D.L. (2002) Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Journal of Clinical Microbiology* 40(9): 3256-3260.
99. Spalatin, J., Hanson, R.P. (1975). Epizootiology of Newcastle disease in waterfowl. *Avian Diseases* 19: 573-582.
100. StataCorp. (2009) Stata: Release 11. Statistical Software. College Station, TX: StataCorp LP. Disponible en: <http://www.stata.com>. Fecha de consulta: 8 de mayo de 2010.
101. Stevens, J. (2010) Hemagglutinina del virus de influenza AH1N1 de 1918. Curso de Virología Facultad de Ciencias UNAM. Disponible en: <https://sites.google.com/a/ciencias.unam.mx/curso-de-virologia-2010-1/galeria>. Fecha de consulta: 20 de setiembre de 2010.
102. Steward, M., Samson, A.C.R., Errington, W., Emmerson, P.T. (1995) The Newcastle disease virus V protein binds zinc. *Archives of Virology* 140:1321-1328.

103. Stewart, G.H. (1971) Naturally occurring clinical Newcastle disease in the racing pigeon (*Columba livia*). *Veterinary Record* 89(8):225-226.
104. Takimoto, T., Taylor, G.L., Connaris, H.C., Crennell, S.J., Portner, A. (2002) Role of the Hemagglutinin-Neuraminidase protein in the mechanism of paramyxovirus-cell membrane fusion. *Journal of Virology* 76(24):13028–13033.
105. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599. Disponible en: http://kumarlab.net/pdf_new/TamuraKumar07.pdf. Fecha de consulta: 15 abril 2010.
106. Ternicier, C. (2007) Enfermedad de Newcastle en Chile. Disponible en: http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/nfonddevila/enfermedad_de_newcastlechi.htm. Fecha de consulta: 12 junio de 2009.
107. Tollis, M., Di Trani, L. (2002) Review; recent development in avian influenza research: epidemiology and immunoprophylaxis. *Veterinary Journal* 164(3): 202-215.
108. Toro, H., Saucedo, C., Borie, C., Gough, R.E., Alcaíno, H. (1999) Health status of free-living pigeons in the city of Santiago. *Avian Pathology* 28(6): 619-623.
109. Trenchi, H. (1993) Enfermedad de Newcastle: una visión de la perspectiva uruguaya. Informe a pedido de la Asociación de Avicultores Sur. Montevideo, AAS. 20 p.
110. Ujvári, D. (2006) Complete nucleotide sequence of IT-227/82, an avian paramyxovirus type-1 strain of pigeons (*Columba livia*). *Virus Genes* 32(1):49–57.
111. Ujvári, D., Wehmann, E., Herczeg, J., Lomniczi, B. (2006) Identification and subgrouping of pigeon type Newcastle disease virus strains by restriction enzyme cleavage site analysis. *Journal of Virological Methods* 131:115–121.
112. Viljoen G.J, Nel, L.H., Crowther, J.R. (2005) Detection of Newcastle disease virus using a Triple One-step RT-PCR Assay. En: Viljoen, G.J, Nel, L.H., Crowther, J.R. *Molecular diagnostic PCR handbook*. Dordrecht, IAEA/FAO/Springer. p.127-133.
113. Vindevogel, H., Duchatel, J.P. (1988) Panzootic Newcastle disease virus in pigeons. En: Alexander, D.J. ed. *Newcastle disease*. Boston: Kluwer Academic. p.184-196.
114. Vindevogel, H., Meulemans, G., Halen, P., Schyns, P. (1972) Sensibilité du pigeon voyageur adulte au virus de la maladie de Newcastle. *Annales de Recherches Vétérinaires* 3(4): 519-532.

115. Vindevogel, H., Pastoret, P.P., Thiry, E., Peters, H. Reappearance of severe forms of Newcastle disease in the pigeon. *Annales de Médecine Vétérinaire* 126(1): 5-7.
116. WAHID Interface-OIE (2009a). Enfermedades en el tiempo: Enfermedad de Newcastle. Disponible en: http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_timelines. Fecha de consulta: 4 de agosto de 2010.
117. WAHID Interface-OIE (2009b) Resumen del evento: Enfermedad de Newcastle, Brasil. Disponible en: http://www.oie.int/wahis/public.php?page=event_summary&this_country_code=BRA&reportid=5103. Fecha de consulta: 4 de agosto de 2010.
118. WAHID Interface-OIE (2009c) Resumen del evento: Influenza A H1N1, Chile OIE World Animal Health Information Database. Disponible en: http://www.oie.int/wahis/public.php?page=event_summary&reportid=8389. Fecha de consulta: 29 de diciembre de 2009.
119. Wang, Z., Vreede, F.T., Mitchell, J.O., Viljoen, G.J. (2001) Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus isolates by a Triple One-step RT-PCR. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 68(2):131-134.
120. Werner, O., Romer-Oberdorfer, A., Kollner, B., Manvell, R.J., Alexander, D.J. (1999) Characterization of avian paramyxoviruses type 1 strains isolated in Germany during 1992 to 1996. *Avian Pathology* 28(1):79-88.
121. Wise, M.G., Suarez, D.L., Seal, B.S., Pedersen, J.C., Senne, D.A., King, D.J., Kapczynski, D.R., Spackman, E. (2004) Development of a real-time reverse transcription PCR assay for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 42(1):329-338.
122. Zaitsev, V., von Itzstein, M., Groves, D., Kiefel, M. (2004) Second Sialic acid binding site in Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase: implications for fusion. *Journal of Virology* 78(7): 3733-3741.
123. Zamora, A. (2009) Los virus humanos. Clasificación de los virus. Disponible en: <http://www.scientificpsychic.com/health/virus-humano.html>. Fecha de consulta: 22 de setiembre de 2010.
124. Zanetti, F.A. (2004) Estudio de la estabilidad genética y fenotípica del virus de la enfermedad de Newcastle. Tesis para optar al grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA. 165 p.
125. Zanetti, F., Pereda, A., Taboga, O., Carrillo, E. (2005) Molecular characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolates from healthy wild birds. *Avian Diseases* 49:546-550.
126. Zanetti, F., Mattiello, R., Garbino, C., Kaloghlian, A., Terrera, M.V., Boviez, J., Palma, E., Carrillo, E., Berinstein, A. (2001) Biological and

Molecular characterization of a pigeon paramyxovirus type-1 isolate found in Argentina. *Avian Diseases* 45(3):567-571.

127. Zhang, L., Pan, Z., Geng, S., Chen, X., Hu, S., Liu, H. (2010) Sensitive, semi-nested RT-PCR amplification of fusion gene sequences for the rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus. *Research in Veterinary Science* 89:282–289.
128. Zorman Rojs, O., Krapez, U., Grom, J., Barlic-Maganja, D., (2002) Molecular detection and pathotyping of paramyxovirus type 1 isolates (Newcastle disease virus). *Slovene Veterinary Research* 39:39-45.

ANEXO 1

Número acceso GenBank/linaje/hospedador/País/año
paloma/Uruguay/Montevideo/2/08
paloma/Tigre/6/99
gb AY734536.1 paloma/Argentina/Capital 3/97
gb AY175693.1 linaje 2/aves de corral/Polonia/96
gb AY175708.1 linaje 2/aves de corral/Zambia/95
gb AY175661.1 linaje 2/Sud África/98
gb AY175701.1 linaje 2/España/94
gb AY135740.1 linaje 2/avestruz/Sud África/95
gb AY175697.1 linaje 2/aves de corral importadas/Suiza/99
gb AY175695.1 linaje 2/avestruz/Brasil/98
gb AY175709.1 linaje 2/aves de corral/Zambia/95
gb AY175671.1 linaje 2/pato/Alemania/95
gb AY175707.1 linaje 2/aves de corral/Reino Unido/98
gb AY175696.1 linaje 2/aves de corral/Suiza/97
gb AY175700.1 linaje 2/cotorra/Alemania/95
gb AY175714.1 linaje 2/aves de corral/Italia/94
gb AY175716.1 linaje 2/gorrión/Italia/94
gb AY175705.1 linaje 2/aves de corral/Noruega/96
gb AY175703.1 linaje 2/aves de corral/Italia/95
gb AY175699.1 linaje 2/canario/Alemania/95
gb AY175726.1 linaje 1/pato/Nueva Zelanda/98
gj AY175686.1 linaje 1/pato/Canadá/99
gb AY175659.1 linaje 1/aves de corral/Australia/98
gb AY175658.1 linaje 1/aves de corral/Australia/98
gb AY175660.1 linaje 1/aves de corral/Australia/98
gb AY175718.1 linaje 1/pato/Alemania/85
gb AY175722.1 linaje 1/pato/Irlanda/95
gb AY175719.1 linaje 1/pato/Malasia/97
gb AY175645.1 linaje 1/aves de corral/Noruega/95
gb AY175666.1 linaje 4c/avestruz/Emiratos Árabes Unidos/98
gb AY175680.1 linaje 4c/aves de corral/Arabia Saudita/85
gb AY135741.1 linaje 4c/aves de corral/Bélgica/97
gb AY175738.1 linaje 4a/halcón/Emiratos Árabes Unidos/96
gb AY175742.1 linaje 4d/paloma/Bulgaria/98
gb AY175690.1 linaje 5b/aves de corral/India/96
gb AY175627.1 linaje 5b/aves de corral/Irán/96
gb AY175634.1 linaje 5b/faisán/Irlanda del Norte/97
gb AY175640.1 linaje 5b/avestruz/Sud África/97
gb AY175667.1 linaje 4c/halcón peregrino/Emiratos Unidos/90
gb AY175662.1 linaje 4c/aves de corral/Emiratos Unidos/92
gb AY175731.1 linaje 2/aves de corral/Dinamarca/97
gb AY175741.1 linaje 5b/aves de corral/Portugal/96
gb AY175644.1 linaje 1/aves de corral/Noruega/94
gb AY175656.1 linaje 3c/pato/Tanzania/95
gb AY135747.1 linaje 3c/paloma/Italia/87
gb AY175677.1 linaje 5b/periquito/Malasia/90
gb AY135746.1 linaje 5b/aves de corral/Irlanda del Norte/97
gb AY175633.1 linaje 5b/aves de corral/Irlanda del Norte/97
gb AY175779.1 linaje 4b/paloma/Reino Unido/99
gb AY175770.1 linaje 4b/paloma/Reino Unido/99

gj 32395220 gb AY175754.1 linaje 4b/paloma/Alemania/99
gb AY135745.1 linaje 3a/aves de corral/Singapur/99
gb AY175687.1 linaje 5a/aves ornamentales/Alemania/95
gb AY175775.1 linaje 3a/aves de corral/Singapur/99
gb AY135744.1 linaje 3b/pavo/Italia/94
gb AY175655.1 linaje 4a/pato/Tanzania/95
gb AY175654.1 linaje 3c/aves de corral/Tanzania/95
gb AY175653.1 linaje 3c/aves de corral/Tanzania/95
gb AY175780.1 linaje 3c/cormorán/USA/97
gb AY175639.1 linaje 3c/pavo/USA/92
gb AY175630.1 linaje 3c/cormorán/Canadá/92
gb AY175629.1 linaje 3c/cormorán/Canadá/91
gb AY175628.1 linaje 3c/gaviota/Canadá/91
gb AY175631.1 linaje 3c/pelicano/Canadá/92
gb AY135743.1 linaje 5c/aves de corral/Republica Checa/96
gb AY175650.1 linaje 5b/loro/Suecia/92
gb AY175731.1 linaje 2/aves de corral/Dinamarca/97
gb AY175667.1 linaje 4c/halcón peregrino/Emiratos Árabes Unidos/92
gb AY175774.1 linaje 1/paloma/Sud África/99
gj gb AY175735.1 linaje 2/pato/Taiwán/97
gb AY175723.1 linaje 1/faisán/Irlanda/99
gb AY175663.1 linaje 4c/aves de corral/Emiratos Árabes Unidos/96
gb AY175692.1 linaje 2/codorniz/India/99
gb AY175687.1 linaje 5a/aves ornamental/Alemania/96
gb AY175681.1 linaje 3c/cormorán/Canadá/92
gb AY175635.1 linaje 5b/faisán/Irlanda del Norte/97
gb AY175728.1 linaje 3c/aves de corral/Tanzania/95
gb AY175638.1 linaje 3c/cormorán/USA/96
gb AY135748.1 linaje 4a/halcón sacre/Emiratos Árabes Unidos/92
gb AY175750.1 linaje 1/aves de corral/Noruega/00
gb AY175747.1 linaje 5a/aves de corral/Alemania/94
gb AY175761.1 linaje 5b/pavo/Portugal/92
gb AY175646.1 linaje 1/faisán/Reino Unido/88
gb AY175679.1 linaje 4c/aves de corral/Perú/95
gb AY175749.1 linaje 5a/aves de corral/España/94
gb AY175665.1 linaje 4c/halcón/Emiratos Árabes Unidos/99
gb AY175641.1 linaje 5b/avestruz/Sud África/99
gb AY175670.1 linaje 3c/cormorán/Canadá/93
gb AY175746.1 linaje 5a/aves de corral/Suiza/94
gb AY175715.1 linaje 2/faisán/Italia/94
gb AY175713.1 linaje 2/aves de corral/Italia/94
gb AY175689.1 linaje 2/aves de corral/India/94
gb AY175688.1 linaje 2/aves de corral/India/94
gb AY175773.1 linaje 4b/paloma/Reino Unido/99
gb AY175772.1 linaje 4b/paloma/Reino Unido/99
gb AY175737.1 linaje 1/paloma/Italia/99
gb AY175771.1 linaje 4b/paloma/ Reino Unido/99
gb AY175777.1 linaje 1/pato/Reino Unido/99
gb AY175769.1 linaje 4b/paloma/Reino Unido/90
gb AY175766.1 linaje 4b/paloma/Reino Unido/84
gb AY175768.1 linaje 4b/paloma/Reino Unido/89
gb AY175748.1 linaje 5a/aves de corral/Alemania/96
gb AY175694.1 linaje 4c/aves de corral/Arabia Saudita/95
gb AY175724.1 linaje 2/Nepal/95

gb AY175717.1 linaje 2/aves de corral/Malasia/90
gb AY175702.1 linaje 2/paloma/Francia/99
gb AY175778.1 linaje 4b/paloma/Reino Unido/88
gb AY175721.1 linaje 2/aves de corral/Indonesia/94
gb AY175664.1 linaje 4c/aves de corral/Emiratos Árabes Unidos/96
gb AY175725.1 linaje 1/aves de corral/Nueva Zelanda 90
gb AY175727.1 linaje 1/pato/Nueva Zelanda/99
gb AY175776.1 linaje 4b/aves de corral/Turquía/95
gb AY175698.1 linaje 2/aves de corral/Suiza/99
gb AY175668.1 linaje 4c/paloma/Emiratos Árabes Unidos/99
gb AY175710.1 linaje 2/avestruz/Zimbabwe/95
gb AY175763.1 linaje 4a/paloma/Turquía/95
gb AY175742.1 linaje 1/control de incubaduría/Suecia/95
gb AY175739.1 linaje 5b/aves de corral/Portugal/95
gb AY175755.1 linaje 4b/paloma/Dinamarca/95
gb AY135749.1 linaje 4b/paloma/Alemania/95
gb AY175632.1 linaje 5d/avestruz/Emiratos Árabes Unidos/99
gb AY175762.1 linaje 2/aves de corral/Portugal/93
gb AY175743.1 linaje 1/pato/Reino Unido/90
gb AY175744.1 linaje 1/somorgujo/USA/83
gb AY175729.1 linaje 1/pato/Alemania/93
gb AY175712.1 linaje 2/aves de corral/España/86
gb AY175729.1 linaje 1/pato/Alemania/93
gb AY175751.1 linaje 4b/paloma/emiratos Árabes Unidos/96
gb AY175649.1 linaje 3c/aves de corral/Brasil/90
gb AY175642.1 linaje 1/aves de corral/España/88
gb AY175647.1 linaje 3c/aves de corral/Albania/91
gb AY175651.1 linaje 3c/humano/Alemania/86
gb AY175672.1 linaje 3b/paloma/Hong Kong/89
gb AY175676.1 linaje 3a/laboratorio/India/
gb AY175674.1 linaje 3c/Hungría/84
gb AY175669.1 linaje 3b/aves de corral/Bulgaria/91
gb AY175675.1 linaje 5b/aves de corral/India/94