

AISLAMIENTO, PATOGENICIDAD Y ESTUDIO DE ALGUNAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE UNA CEPA DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

Isolation, Pathogenicity and Study of Some Biological Properties of an Strain of Newcastle Disease Virus

Carmen de Noguera¹, Antonio León¹, Dilia Infante¹, Morella de Rolo¹, Roel Sánchez² y Antonio Herrera¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Instituto de investigaciones Veterinarias, Apartado 70. Maracay 2102, Venezuela. ²Departamento de Microbiología, Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Núcleo Aragua, Venezuela.

RESUMEN

El presente estudio se realizó con la finalidad de evaluar la patogenicidad y algunas propiedades biológicas de una cepa del virus de la Enfermedad de Newcastle aislado de un lote de pollos de engorde. Las pruebas realizadas fueron Índice de patogenicidad intracerebral (IPIC), índice de patogenicidad intravenoso (IPIV), índice de patogenicidad intracloacal (IPIC) en aves libres de anticuerpos, el tiempo medio de muerte embrionaria (TMM), la Termoestabilidad de la hemoaglutinina y el tiempo de elusión. Los resultados mostraron un IPIC de 1,9 y un IPIV de 2,2. En el IPIC el 100% de las aves presentaron secreción mucosa en tráquea y hemorragia severa en cloaca, el 75% presentó hemorragia en proventrículos y 25% hemorragia y necrosis en el tracto intestinal. El TMM fue de 57,6 horas y la termoestabilidad de la hemoaglutinina fue de 15 min. La cepa presentó un tiempo de elusión intermedio. Las pruebas de patogenicidad concuerdan con las descritas para las cepas velogénicas viscerotrópicas responsable de la forma Doyle's de la enfermedad, siendo las propiedades biológicas consideradas intrínsecas de cada cepa e independientes de la virulencia.

Palabras clave: Newcastle, patogenicidad, termoestabilidad hemoaglutinina, elusión.

ABSTRACT

A Newcastle virus strain isolated from broilers flock, was evaluated for pathogenicity and other biological properties. The tests made were intracerebral pathogenicity index (ICPI), intra-

venous pathogenicity index (IVPI), intracloacal pathogenicity (ICPI) index in chickens free of antibodies, the mean death time (MDT) in chicken embryos, thermoestability of hemagglutinin activity (THA) and rate of elution were done. The results showed an ICPI of 1,9 and an IVPI of 2,2. For the ICPI, 100% of the chickens showed some mucous secretion in trachea and severe bleedina in cloaca, 75% had presented hemorrhagic proventriculus and 25% hemorrhagic and necrosis in the intestinal tract. MDT was 57,6 hours and the THA was 15 min. The strain showed an intermediate elution time. The pathogenicity tests agree with those described in velogenic viscerotropic strains responsible for the Doyle type of the disease. The biological properties were considered intrinsics for each strain as well as independent of the virulence.

Key words: Newcastle, pathogenicity, hemagglutinin thermoestability, elution.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Newcastle (EN) es infectocontagiosa en las aves, reportada por primera vez en 1926 en Java, Indonesia y en Newcastle, Inglaterra. En Venezuela la enfermedad fue reconocida por primera vez por Divo [5]. Es causada por un virus de la familia Paramyxoviridae, subfamilia paramyxovirinae género Rubulavirus denominado paramyxovirus 1. Considerada una de las patologías más temidas por los productores avícolas debido a la alta morbilidad que ocasiona, generando como consecuencia cuantiosas pérdidas económicas y menor disponibilidad de una de las proteínas de origen animal con alto valor nutritivo y de fácil adquisición. Esta enferme-

dad es de declaración obligatoria ante la Oficina Internacional de Epizootias (OIE).

El virus es capaz de infectar pollos, pavos, aves silvestres, en cautiverio y ocasionalmente a los humanos. Se han descrito cinco formas o patotipos de la enfermedad de acuerdo con los signos clínicos que presentan las aves susceptibles [3]. Estos signos varían con la virulencia de la cepa, la especie infectada y la predilección del virus infectante por los sistemas respiratorio, digestivo y nervioso [8]. La entrada del virus por las rutas oral, nasal u ocular, incrementan los signos respiratorios, mientras que la penetración del virus por las rutas intravenosa, intramuscular e intracerebral acentúan las manifestaciones nerviosas [1].

La diferencia entre cepas virulentas y avirulentas, está dada por la susceptibilidad de las glicoproteínas de envoltura del virus a cortes proteolíticos. Un aminoácido dibásico que rodea a la glutamina en la posición 114, está presente en el sitio de corte de la proteína de fusión en las cepas mesogénicas y velogénicas mientras que en las cepas lentogénicas está ausente [11, 16, 17]. La presencia de esos aminoácidos en la secuencia de la proteína de fusión permite la diseminación sistémica de las cepas velogénicas mientras que la replicación de las lentogénicas ocurre en las mucosas [13].

Las pruebas utilizadas para determinar in vivo la patogenicidad de aislamientos del virus de Newcastle, son los índices de patogenicidad intracerebral, intravenoso, intraoculoal y el tiempo medio de muerte embrionaria [1].

La envoltura del virus posee glicoproteínas, dentro de las cuales la hemoaglutinina neuroaminidasa (HN), es la responsable de aglutinar glóbulos rojos de diferentes especies y del fenómeno denominado elusión, el cual puede ser rápido, intermedio o lento [6,11]. Mientras que la proteína de fusión (F), está involucrada en la fusión a las células, la penetración del virus y la hemólisis. Entre las propiedades biológicas más utilizadas para caracterizar cepas del virus de Newcastle, están el tiempo de elusión y la termoestabilidad de la hemoaglutinina la cual permite distinguir cepas virulentas de avirulentas [7].

El propósito de este trabajo fue estudiar la patogenicidad y algunas propiedades de una cepa del virus de la enfermedad de Newcastle.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del virus

Para el aislamiento del virus, se procesaron muestras de pulmón y tráquea de pollos de engorde de 6 semanas de edad de un lote de 72.000 aves, que presentaba 10% de mortalidad, procedentes de una granja ubicada en el estado Aragua. Las muestras fueron procesadas siguiendo la técnica descrita por Alexander [2]. La fuente de virus identificada como protocolo 6184, fue pool de fluido alantoideo (FA), obtenido de los embriones inoculados con las muestras y que resultaron libres de

bacterias y con hemoaglutinación positiva, la cual fue inhibida con un suero hiperinmune contra el virus de Newcastle.

Pruebas de patogenicidad realizadas

Para determinar la patogenicidad de la cepa, se determinaron los índices de Patogenicidad intracerebral (IPIC) en pollitos susceptibles de 1 día de edad, el índice de patogenicidad intravenoso (IPIV) en pollos de 6 semanas y el índice de patogenicidad intraoculoal (IPIOC) en pollos de 6 semanas y el tiempo medio de muerte en embriones (TMM), siguiendo la metodología recomendada por Alexander [2], la Oficina Internacional de Epizootias [12] y Methods for the Examination of Poultry Biologics [9].

Propiedades biológicas

Se realizaron pruebas de termoestabilidad de la hemoaglutinina a 56°C, sometiendo el FA a esa temperatura durante 15-30-60 y 120 minutos, determinando posteriormente la capacidad hemoaglutinante (HA) tanto al FA no sometido al efecto de la temperatura como al sometido a los cuatro tiempos. Una vez leída la HA, se determinó la rata de elusión viral de los eritrocitos a 4°C de manera similar a lo descrito por Hanson [6].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inoculación en huevos embrionados causó 100% de mortalidad en el II pase y un título hemoaglutinante de 16. La TABLA I muestra los resultados de las pruebas de patogenicidad y la elusión realizadas. La cepa presentó un TMM de 57,6 horas, correspondiendo al patotipo velogénico de acuerdo a lo reportado por Alexander [2] y Seal [17], quienes señalan que cepas con un TMM inferior a 60 horas se clasifican como velogénicas. Resultados de otros estudios [4], señalan TMM en el rango de 49 horas en cepas velogénicas las cuales están de acuerdo con nuestros resultados, reportes de cepas lentogénicas [10], señalan TMM de 126 horas.

El IPIC fue de 1,9 coincidiendo con los hallazgos de Seal et al. [17], quien obtuvo valores de IPIC entre 1,71 y 1,9 para aislamientos altamente patógenos. El IPIV fue de 2,2, estando este valor dentro del rango establecido para las cepas velogénicas [2]. En el IPIOC, el 100% de las aves presentaron secreción en tráquea y hemorragia y necrosis en tracto intestinal, estos resultados concuerdan con los criterios utilizados en la clasificación de cepas velogénicas viscerotrópicas [2,12].

En la TABLA II se describen los resultados del análisis de termoestabilidad de los FA, incubados a 56°C durante diferentes tiempos, donde se observa que el título de hemoaglutinación inicial fue bajo, lo cual es opuesto con los estudios publicados por otros autores [14,15], quienes reportaron títulos hemoaglutinantes elevados para cepas velogénicas viscerotrópicas. Este título se mantuvo durante los primeros 15 minutos de incubación y decreció hasta llegar a cero a los 120 minutos,

en cepas lentogénicas se reporta una termoestabilidad de la hemoaglutinina menor de 5 minutos.

Con respecto a la rata de elusión del virus, esta fue clasificada como intermedia de acuerdo con lo descrito por Hanson [7].

En vista de que la capacidad hemoaglutinante de la cepa siempre fue baja y considerando que la rata de elusión y la termoestabilidad de la hemoaglutinina están relacionadas con la proteína HN, se presume la existencia de alguna alteración de esa proteína, que pudiera explicar la elusión intermedia lo cual ocurre con poca frecuencia [18].

Los resultados de las pruebas de patogenicidad, demuestran la independencia entre la virulencia y las propiedades biológicas estudiadas a la cepa.

CONCLUSIONES

Los resultados de las pruebas de patogenicidad concuerdan con las descritas para las cepas velogénicas viscerotrópicas, responsables de la forma Doyle's de la enfermedad de acuerdo con la clasificación de Beard y Hanson [3]. No se encontró relación entre la virulencia de la cepa y la capacidad hemoaglutinante de la misma, la cual siempre fue baja.

A todas las cepas aisladas del virus de Newcastle, se le deben realizar las pruebas recomendadas por la OIE [8], a fin de establecer un diagnóstico de la enfermedad. De igual forma, las cepas que de acuerdo a IPIC o por determinación de la secuencia de aminoácidos correspondan con cepas patógenas, se debe realizar el IPIC lo cual permite conocer si la misma corresponde con cepas viscerotrópicas, requisito exigido por países libres de este patotipo [2].

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ALEXANDER, D.J. Newcastle Disease and other Avian Paramyxoviridae Infection. Diseases of Poultry 10th ed. B.W. Calnek, Barnes, H.J.; Beard, C.W.; Reid, W.M.; Yoder, H.W. Iowa State University Press, Ames, Iowa. Edition. 541-569. 1997.

[2] ALEXANDER, D.J. Newcastle Diseases Virus and other Avian Paramyxoviruses. A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens 4th Edition. The American Association of Avian Pathologists. 156-163. 1998.

[3] BEARD, C.W.; HANSON R.P. Newcastle Disease. Diseases of Poultry 8th ed. Hofstad, M.S.; Barnes, H.J.; Calnek, B.W.; Reid, W.H.; Yoder, H. W. State University Press, Ames, Iowa State University Press, Ames, Iowa. 452-470. 1984.

[4] CRESPO, R.; SHIVAPRASAD, H.L.; WOOLCOCK, P.R.; CHIN, R.P.; DAVIDSON-YORK D.; Tarbell, R. Exotic

TABLA I
RESULTADO DE LAS PRUEBAS DE PATOGENICIDAD Y PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LA CEPA P = 6184

Prueba	Valor
IPIC	1,9
IPIV	2,2
IIC	100% secreción mucosa en traquea y hemorragia severa en cloaca. 75% hemorragia en proventrículo. 25% hemorragia y necrosis en tracto intestinal.
TMM	57,6 Horas
Termoestabilidad A 56°C	15 min.
Tiempo de Elusión	Intermedio

IPIC: índice patogenicidad intracerebral. IPIV: índice patogenicidad intravenoso IIC: índice patogenicidad intracloacal. TMM: tiempo medio de muerte embrionaria.

TABLA II
TERMOESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE DE LA CEPA P = 6184 INCUBADA A 56°C

Minutos de Incubación	Título Hemoaglutinante
0	16 UH
15	16 UH
30	8 UH
60	4 UH
120	0

UH: unidades hemoaglutinantes.

Newcastle Disease in a Game Chicken Flock. Avian Dis. 43:349-355. 1999.

[5] DIVO, A. La Enfermedad de Newcastle (Neumoencefalitis) en Venezuela. Boletín del Instituto de Investigaciones Veterinarias. Vol. 3:547-575. 1950.

[6] HANSON, R.P. Newcastle Disease. Isolation and identification of avian pathogens, 2nd. edition. **American Association of Avian Pathology**. 63-66 p. 1980.

[7] HANSON, R.P.; J. Spalatin. Thermoestability of the hemagglutinin of Newcastle disease virus as a strain marker in epizootiological studies. Avian Dis. 22:659-665. 1978.

[8] KING, D.J. Enfermedad de Newcastle. **Memorias del XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura**. Lima. Perú. 56-62. 1999.

[9] Methods for the Examination of Poultry Biologics 2th Edition. National Academy of Sciences-National Research Council. 41-43 p. 1963.

- [10] MURAKAWA, Y.; TAKASE, K.; SAKAMOTO, K.; SUE-SOSHI, M.; NAGATOMO, H. Characterization of a Lentogenic Newcastle Disease Virus Isolated from Broiler Chickens in Japan. *Avian Dis.* 44: 686-690. 2000.
- [11] NAGAI, Y.; KLENK, H.D.R. Role. Proteolytic of the viral glycoproteins and its significance for the incidence of Newcastle disease virus. *Virology* 72:494-508, 1976.
- [12] Office International des Epizooties. Manual of standards for Diagnostic Tests and vaccines. 130-141. 1992.
- [13] OGASAWARA, T.; GOTOH, B.; SUZUKI, H.; ASAKA, J.; SHIMOKATA K.; ROTT R.; NAGAI, Y. Expression of factor X and its significance for determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo, *EMBO J.* 11:467-472. 1992.
- [14] QUIROZ, C.; AYALA, R.; LEÓN, A. Una cepa Velogénica Viscerotrópica del Virus de la Enfermedad de Newcastle en Venezuela. **Memorias IV Congreso Latinoamericano de Avicultura.** Caracas, Venezuela. 70-71 p. 1975.
- [15] ROBALINO, A.; SALAZAR, R.; TORRES, M. Estudio de algunas características de cinco cepas de Virus de Newcastle de campo en Ecuador. **Memorias IV Congreso Latinoamericano de Avicultura.** Caracas, Venezuela. 46-48. 1975.
- [16] SEAL, B.; KING, D.; BENNETT, J.D. Characterization of Newcastle disease virus vaccines by biological properties and sequence analysis of the Hemagglutinin-neuraminidase protein gene. *JVAC*: 339:50032511. 1-6. 1996.
- [17] SEAL, B.; KING, D.; LOCKE, D.; SENNE, D.; M. Jackwood. Phylogenetic Relationships among highly virulent Newcastle disease virus isolated obtained from exotic birds and poultry from 1989 to 1996. **Journal of clinical Microbiology.** 36:4:1141-1145. 1998.
- [18] SPALANTIN, J.; HANSON, R.P.; BEARD, P.D. The hemagglutination-elution pattern as a marker in characterizing Newcastle disease virus. *Avian Dis.* 14:542-549. 1970.