



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Electroforesis Comparativa de las Proteínas del Virus de la Enfermedad de Newcastle (Cepas Querétaro, Chimalhuacán, B. y La Sota) en Gel de Poliacrilamida.



T E S I S

Que para obtener el título de:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

Fabiola Esther Gómez Arroyo

**Asesores: M.V.Z. AURORA VELAZQUEZ E.
M.V.Z. MOISES FRAIRE C.**



México, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS	13
DISCUSION	17
CONCLUSION	19
LITERATURA CITADA	20

ELECTROFORESIS COMPARATIVA DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS DE LA
ENFERMEDAD DE NEWCASTLE (CEPAS QUERETARO, CHIMALHUACAN B₁
Y LA SOTA) EN GEL DE POLIACRILAMIDA

FABIOLA ESTHER GOMEZ ARROYO

A S E S O R E S:

M.V.Z. Aurora Velázquez
M.V.Z. Moises Fraire C.

R E S U M E N

El virus de la enfermedad de Newcastle comprende una amplia variedad de cepas las cuales difieren en su patogenicidad por su hospedero natural, el pollo.

Para investigar la relación de las cepas del virus de la enfermedad de Newcastle aisladas de brotes de campo en México con cepas estudiadas - en otros países, se purificaron las cepas Querétaro y Chimalhuacán por el método de adsorción y elución de eritrocitos y se corrieron en electroforesis en gel de poliacrilamida para tratar de encontrar el patrón característico de las cepas patógenas reportado por Nagai (25). Los resultados obtenidos demuestran que las cepas Querétaro y Chimalhuacán muestran los componentes HN y F que son característicos de las cepas patógenas.

I N T R O D U C C I O N

La enfermedad de Newcastle (ENC) es un padecimiento viral de elevada incidencia y muy contagiosa que afecta principalmente a las aves aunque - algunos mamíferos, entre ellos el hombre, también son susceptibles (3). Representa una serie de entidades clínicas que fluctúan de una forma subclínica a una entidad fulminante y fatal, siendo más grave en aves jóvenes (4,15).

El agente causal es un miembro de los paramixovirus que comprende -- una amplia variedad de cepas, las cuales difieren marcadamente en la virulencia por su hospedero natural, las aves. Las partículas maduras del virus son relativamente grandes (100-250 nm) y generalmente esféricas; tienen una cubierta o envoltura que es característica de los paramixovirus - formada por lípidos y proteínas. El material nuclear está constituido -- por RNA de cadena sencilla (9):

Los estudios que se han realizado con respecto al virus de la enfermedad de Newcastle han tratado de encontrar alguna propiedad de este que sea fácilmente demostrable en el laboratorio, y que se halle relacionada a la virulencia e identificación de las diversas cepas. Nagai et al., -- (24,25) han establecido que las cepas patógenas y apatógenas difieren en la susceptibilidad de las glucoproteínas a la proteólisis y que la diferencia es un factor importante que puede determinar el tropismo y la patogenicidad del virus. Se han hecho estudios en Estados Unidos, Alemania e

Inglaterra con distintas cepas (B₁, La Sota, Texas, Beaudette, etc.) uti lizando la electroforesis en gel de poliacrilamida.

Existen al menos 10 componentes del virus (1,5,16,17,22) de los cua les dos han sido asociados con actividades biológicas durante el inicio de la infección y que corresponden a 2 glucoproteínas de la envoltura que forman proyecciones similares a espigas y cubre la superficie de los para mixovirus (25). Estas glucoproteínas son diferentes entre si y tienen -- tres actividades biológicas separadas la de hemaglutinación, la actividad enzimática de neuraminidasa y la de fusión celular (27). La capacidad de aglutinar eritrocitos de pollo y la actividad enzimática de la neuramini- dasa residen en sitios diferentes de una de las 2 proteínas, la hemoaglutini- nina-neuraminidasa (HN) con un peso molecular de 74,000 Daltons (27), la cual representa el 25% de la proteína viral total; algunos estudios le -- confieren propiedades de unión a la célula. La adherencia del virus a -- las células involucra de manera clara la unión de la glucoproteína al áci do neuramínico, mientras que la neuraminidasa puede ser necesaria para la fusión de la envoltura con las membranas celulares (13). Se ha propuesto que el carbohidrato de la molécula desempeña alguna función estabilizante y de maduración intracelular de la glucoproteína y en las actividades bio lógicas asociadas a esta (23).

La menor de las glucoproteínas, conocida como F o proteína de fusión tienen un peso molecular de 68,000 Daltons (23). Esta se encuentra en -- proyecciones diferentes a las de HN en la envoltura viral. Para que la - proteína de fusión adquiriera su actividad biológica se requiere que haya -

rompimiento de la glucoproteína, esta se sintetiza como un precursor (F_0) el cual es subsecuentemente fragmentado a F_1 (peso molecular 56,000 D) y F_2 (peso molecular 16,000 D) (14).

La conversión de F_0 a F se lleva a cabo durante la migración de F_0 - hacia la membrana plasmática, específicamente en membranas intracelulares lisas (12,26). Se ha observado que el procesamiento proteolítico de la glucoproteína F_0 es un fenómeno específico del hospedero y que depende de la presencia de las proteasas adecuadas. Se ha demostrado que existen variaciones dependiendo de las cepas, a la susceptibilidad de la glucoproteína F_0 al rompimiento proteolítico. Por ejemplo solo algunos sistemas de células son permisivos para cepas avirulentas, esto significa que producen virus patógenos, mientras que otros sistemas son no permisivos -- produciendo virus no patógenos. Lo anterior es explicable ya que solo un pequeño número de hospederos tienen la enzima requerida para el procesamiento de F_0 a F para las cepas avirulentas (6,12,24). También se ha visto que el precursor F_0 puede ser procesado a su forma activa (F) "in vitro" por tripsina, lo que hace suponer que la enzima celular pueda ser una proteasa semejante a tripsina (24,29). En contraste con las cepas avirulentas la glucoproteína F_0 de las cepas virulentas es procesada por una enzima (o enzimas) presente en todos los sistemas-hospedero probados (24).

La proteína F está involucrada en actividades de: fusión celular, - hemólisis y en la penetración celular mediante la fusión de las membranas virales y celulares. La actividad de fusión celular permite la diseminación de la infección de la células infectada a células susceptibles adya-

centes mediante la fusión de sus membranas plasmáticas además del modo usual de diseminación de la infección por liberación de virus (16).

Se ha demostrado mediante la producción de anticuerpos específicos contra la proteína F que la diseminación de célula a célula es el resultado de la actividad de esta proteína ya que los anticuerpos dirigidos contra ésta, previenen la infección de células adyacentes; así como la -- formación de sincitios en un sistema en el cual puede ocurrir la fusión (6).

Se ha descrito la existencia de otros componentes virales, aunque - estos no parecen participar en la infectividad del virus (5,16,17,23).

Desde los primeros estudios se ha tratado de encontrar alguna propiedad del virus fácilmente medible en el laboratorio y que además esta relacionada a la virulencia de las diferentes cepas (1,2,10,18,22). Una de las técnicas empleadas para estos fines es la electroforesis en gel - de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (EGPAOSDS) que es una técnica relativamente simple y versátil para analizar las proteínas y ácido nucleicos de los virus y otros sistemas biológicos (10,11). Una de las ma yores ventajas que ofrece este método es que se requieren cantidades extremadamente pequeñas de proteína (10-50 ug) que pueden ser separadas y visualizadas fácilmente (11,21,19). Con la presencia de SDS en el gel - se eliminan las interacciones proteína-proteína, proteína-ácidos nucleicos y proteína-lípidos de tal manera que las mezclas crudas tales como - las preparaciones totales de virus se pueden separar sin la formación de

agregados entre las macromoléculas proteínicas además las confiere una carga negativo uniforme con lo cual la separación depende exclusivamente de los pesos moleculares de las proteínas que corren del cátodo al anodo (11,19,21,23,28). Los resultados iniciales fueron contradictorios ya -- que mientras Shapiro, et al., (22) encontraron diferencias en los componentes proteínicos menores mediante esta técnica bajo condiciones reductoras, (presencia de agentes reductores como por Ej. con 2-mercapto-etanol) (Alexander, et al., (1), no hallaron diversidad en las proteínas de 8 -- cepas examinadas por la misma técnica en iguales condiciones (2). Moore, et al., (22) además de comparar varias cepas bajo experimentación similar a la de Shapiro y Alexander, las analiza bajo situaciones no reductoras (ausencia de 2 mercapto-etanol) con la idea de mostrar alguna diferencia entre las cepas virulentas y las no virulentas y observa que las puede dividir en dos grupos: Las que presentan una glucoproteína de peso molecular de 75,000 daltons y las que poseen poco o nada de esta glucoproteína, pero como los dos grupos tienen cepas virulentas y no virulentas entonces esta diferencia no está asociada a la capacidad de producir enfermedad (22).

En 1973 dos grupos de investigadores describen un precursor de la glucoproteína F_1 denominado F_0 . El estudio lo llevan a cabo con una cepa altamente patógena observando una conversión rápida y completa de F_0 a F_1 y F_2 la cual se demuestra de dos maneras: 1) en EGPA-SDS observan dos bandas, una que migra en la región de peso molecular 69,000 (F_0) y la otra en 56,000 (F_1 y 2) que la aparición del componente F_1 es acompañada de fusión a células BHK21-F (24).

Los primeros en demostrar de manera directa la relación entre la virulencia y la presencia de determinados componentes fueron Nagai, et al., (24,25) en el estudio realizado por ellos analizan la susceptibilidad de las glucoproteínas al rompimiento proteolítico de cepas patógenas y no patógenas y lo que se observan es que en todos los sistemas analizados (células BHK21-F, embriones de pollo, células de embrión de pollo y células de membrana corioalantoidea) la glucoproteína F_0 de las cepas virulentas es procesada a F_1 . También describen por primera vez la presencia de un precursor de HN denominado HN_0 (peso molecular de 82,000). La conclusión obtenida de su trabajo es que pueden dividir a las cepas analizadas con base en la migración electroforética de dos de sus componentes en tres grupos: el primero tiene presente HN y F_1 que migran en la región de peso molecular 74,000 y 56,000 respectivamente, siendo moléculas con actividad biológica que son características de cepas virulentas al segundo grupo pertenecen algunas cepas, las cuales tienen la capacidad de matar a los embriones de pollo solo después de un periodo de incubación prolongado y por ello son consideradas moderadamente patógenas, estas contienen HN activo y la glucoproteína precursora F_0 inactiva que migran en la región de peso molecular 74,000 y 68,000 respectivamente; el tercero, el cual es menos patógeno, ya que permiten a los embriones de pollo sobrevivir, tiene los precursores HN_0 y F_0 inactivos que migran en la región de peso molecular 68,000 y 82,000 respectivamente.

La conclusión que se obtiene de los estudios realizados por los diferentes grupos, (11,12,13,14,23,24,28) en especial el de Nagai, et al., es que las cepas patógenas y las no patógenas difieren en la susceptibi-

lidad de sus glucoproteínas al rompimiento proteolítico y por lo tanto en la presencia de dos componentes proteínicos (F_1 y HN) los cuales son característicos de las cepas virulentas, mientras que las menos patógenas - contienen HN y F_0 ó HN₀ y F_0 , y que estas diferencias son factores importantes que determinan el tropismo y la patogenicidad del virus.

El objetivo de este estudio es diferenciar por medio de la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida las proteínas totales de dos cepas del virus en la enfermedad de Newcastle (Querétaro y Chimalhuacán) aisladas de brotes de campo en México, las que con fines comparativos se correrán al mismo tiempo con otras dos cepas (B_1 y La Sota) que están bien caracterizadas en sus componentes proteicos, las cuales servirán de referencia.

MATERIAL Y METODOS

Obtención del virus. Se utilizaron 4 cepas de virus de la enfermedad de Newcastle (Querétaro, Chimalhuacán, B₁ y La Sota). Estas cepas fueron proporcionadas por el Departamento de Virología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. Se hicieron 4 lotes de 25 embriones cada uno, los cuales fueron inoculados con 0.2 ml de virus por cavidad alantoidea utilizando la técnica descrita -- por Cunningham (8). Posteriormente las cepas velogénicas (Querétaro y Chimalhuacán) y las lentogénicas (B₁ y La Sota) se incubaron a 37°C. A continuación se obtuvo el líquido alantoideo en condiciones estériles, ya que en él se encuentra la mayor concentración de virus. En seguida se procedió a determinar la concentración de virus utilizando la técnica de hemaglutinación (H.A.) descrita por Cunningham (8). Se comprobó la presencia del virus de Newcastle con la prueba de inhibición de la hemaglutinación (8), para esta se utilizó suero de aves vacunadas contra la enfermedad.

Purificación del virus. Debido a que en el líquido alantoideo existen gran cantidad de proteínas no virales, se purificó el virus utilizando la técnica de adsorción sobre eritrocitos y elución de los mismos descrita por Laver (19) y que consistió en centrifugar el líquido alantoideo a 2000 g por 15 minutos. Se enfrió el sobrenadante (0-2°C) en un baño de hielo y se añadieron con agitación suave y constante eritrocitos de pollo

previamente lavados con solución salina fisiológica. La cantidad de eritrocitos adicionada depende de la cantidad de virus presente en el líquido alantoideo. Para fluidos que contienen un título de hemoaglutinación (HA) de 10^{3-3} unidades HA/ml se requieren eritrocitos al 2% (v/v) para adsorber completamente el virus.

Los eritrocitos se agitaron suavemente por 1 hora a 0°C, después de lo cual se centrifugó a 2000 g por 15 minutos a 4°C. Durante el periodo de incubación se tomó un poco de sobrenadante y se ensayó por HA para determinar si se había adsorbido todo el virus. El paquete celular se lavó una vez con un volumen de solución salina fría (0.15M NaCl) equivalente al volumen original de líquido alantoideo y se centrifugó a 2000 g/15 min. Los lavados se descartaron y el paquete celular se resuspendió en solución salina a 37°C (el volumen debe ser 1/10 del volumen original de líquido alantoideo) y se dejó eluir el virus por una hora a 37°C. La cantidad de virus que eluyó se probó obteniendo muestras a diferentes intervalos, -- centrifugando para eliminar las células y ensayando el sobrenadante por HA. Después del periodo de incubación se eliminaron los eritrocitos centrifugando a 2000 g/15 min. rescatando el sobrenadante. Los virus parcialmente purificados se centrifugaron en una centrífuga RC5 refrigerada de alta velocidad a 39,000 g/30 min, con lo cual estos se purificaron y concentraron; el paquete viral obtenido se resuspendió en 2 ml. de solución amortiguadora de fosfatos, determinándose el título del virus por H.A.

Determinación de proteína. La estimación se hizo por el método de -

lowry (7) el cual consistió en poner a 0.1 - 0.3 ml de muestra, 2.5 ml de una solución que consta de Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1 N y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5% en una proporción de 50 partes a 1, se mezcló vigorosamente y se dejó reposar durante 12 - 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se añadieron 0.25 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu⁽¹⁾ y se dejó por 30 minutos para que se desarrollara el color. La curva patrón se hizo colocando cantidades sucesivas de albúmina bovina como estandar, hasta una cantidad de 200 ug por tubo. Los tubos de la curva y muestras se leyeron en el colorímetro a una longitud de onda de 500 nm.

Electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sodio.

Consiguiente a la determinación de la concentración de proteína se efectuó la electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (EGPA-SDS) de las muestras de virus, además de las de líquido alantoideo y hemoglobina de ave para determinar cuales bandas corresponden al virus y cuales otras son originadas por contaminación con líquido alantoideo y hemoglobina. Para correr estas muestras se utilizó el sistema de poliacrilamida-SDS descrito por Lemli (20) que consta de un gel superior que se denomina concentrador y cuya concentración de acrilamida es del 4%, Tris⁽²⁾ 0.125 M, pH 6.8, dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.1%, temed⁽³⁾ - 0.082%, 10 ml persulfato de amonio 0.066% y un gel inferior que se denomina separador y cuya concentración de acrilamida es del 10%, tris -- 0.375M, pH 8.8, dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.2%, temed 0.082%, per--

(1) Sigma Chemical (

(2) Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Merck)

(3) $\text{N}_1\text{N}_1\text{N}'$, N-Tetramethylethylenediamine (Bio-Rad Laboratories)

sulfato de amonio 0.066%. Una vez colocadas las muestras en el gel se aplicó una corriente continua de 40 mA por gel poniendo como indicador de la corrida azul de bromofenol (P.M. 10,000 Daltons) al 0.001%, tris - HCL 0.05 M pH 6.8; SDS 1%, glicerol 10%; la llegada del colorante al frente del gel indicó el final de la corrida. El gel se retiró y se fijó en acético 75%: metanol 5% y se tiñó según la técnica de Coomasie (23) la cual consistió en colocar el gel en azul de Coomasie 0.25% durante 8 horas después de lo cual se destiñó con cambios sucesivos de acético 7.5: metanol 5% (28).

RESULTADOS

Los resultados de la electroforesis en gel de poliacrilamida de las cepas B₁, La Sota, Querétaro y Chimalhuacán se muestran en las figuras 1 y 2. La figura 1 corresponde a las cepas sin purificar en tanto que la 2 a las cepas ya purificadas. En el carril "a" de las dos figuras se observan 11 bandas de proteínas correspondientes a eritrocitos de pollo a una concentración de 100 ug de proteína total, mientras que en el carril "b" se ven 9 bandas que corresponden al líquido alantoideo sin virus, siendo la concentración de proteína total de 100 ug. El líquido alantoideo y los eritrocitos de pollo en los carriles "a y b" sirven como controles para determinar cuales proteínas corresponden al virus y cuales a estas dos mezclas proteínicas. En los carriles "c", "d", "e", y "f" de la figura 1 se tienen las cepas B₁, La Sota, Querétaro y Chimalhuacán respectivamente sin purificar. En el carril "c" se observan 11 bandas de proteína, en el carril "d" 7 bandas de proteína, en "e" 8 bandas de proteína y en el carril "f" 11 bandas de proteína.

En la figura 2 se muestran las mismas cepas ya purificadas; B₁, La Sota, Querétaro y Chimalhuacán en los carriles "c", "d", "e". y "f" respectivamente. En el carril "c" se observan las proteínas características de la cepa B₁ según Moore y Burke (22), estas son: VP42 (proteína viral de 42,000 de peso molecular), VP49, VP51, VP53, VGP69 ó F₀, VGP75 ó HN, VP110 y VP180. Además esta también la descrita por Nagai y col., (25) HN₀. Con la cepa La Sota (carril d) se observa un patrón igual al

de la cepa B₁ con la presencia de HN₀, HN y F₀ además de los otros componentes virales. Para la cepa Querétaro el patrón electroforético es -- igual al de las cepas B₁ y La Sota, solo que esta cepa presenta además - de HN₀, HN y F₀ la proteína F ó proteína de fusión con actividad biológica. Con la cepa Chimalhuacán se presenta un patrón similar al de la cepa Querétaro, en la cual tenemos la presencia de las proteínas características de las cepas patógenas: HN₀, HN, F₀ y F.

En resumen podemos decir que: a) En las electroforesis de las cepas purificadas aún se obtienen contaminantes, tanto de líquido alantoideo - como de eritrocitos de pollo y b) en las cepas patógenas se observan 4 - bandas importantes, además de los otros componentes virales, en las cepas patógenas (Querétaro y Chimalhuacán) una se encuentra con un peso de 82,000 D (HN₀) y otra en 74,000 D (HN), además de 69,000 D (F₀) y 56,000 D (F) mientras que en las cepas no patógenas solo se observan proteínas con pesos moleculares de 82,000 (HN₀), 74,000 (HN) y 69,000 (F₀) pero no la - proteína de 56,000, que junto con 74,000 D son las proteínas característi- cas de las cepas patógenas.

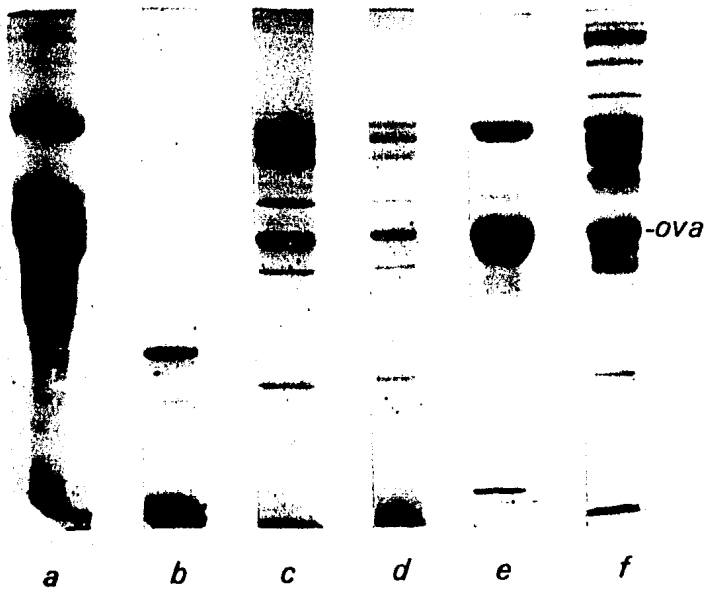


FIGURA No. 1

RESULTADOS DE LAS CEPAS SIN PURIFICAR: B₁, LA SOTA, QUERÉTARO, Y CHIMALHUACÁN

Carril a	Carril b	Carril c	Carril d	Carril e	Carril f
Control de líquido Alan toideo	Control de glóbulos rojos	Control B ₁ sin purificar	Control La Sota sin purificar	Querétaro experimental	Chimalhuacán experimental
Concetración 100 ug	Concetración 100 ug	Concetración 100 ug	Concetración 100 ug	Concetración 100 ug	Concetración 100 ug
9 bandas	11 bandas	11 bandas	7 bandas	8 bandas	11 bandas



FIGURA No. 2

RESULTADOS DE LAS CEPAS PURIFICADAS: B₁, LA SOTA, QUERETARO Y CHIMALHUACAN

Carril a	Carril b	Carril c	Carril d	Carril e	Carril f
Control de líquido Alan toideo	Control de globulos rojos	Control B ₁ purificadas	Control La Sota purificadas	Querétaro experimental purificada	Chimalhuacán experimental purificada
Concentración 100 ug	Concentración 100 ug	Concentración 100 ug	Concentración 100 ug	Concentración 100 ug	Concentración 100 ug
9 bandas	11 bandas	9 bandas que corresponden:	9 bandas que corresponden:	10 bandas que corresponden:	10 bandas que corresponden:
		VP 42	VP 42	VP 42	VP 42
		VP 49	VP 49	VP 49	VP 49
		VP 51	vp 51	VP 51	VP 51
		VP 53	VP 53	VP 53	VP 53
		F	F	F	F
		HN ^o	HN ^o	F _o	F _o
		HN ^o	HN ^o	HN _o	HN _o
		VP 110	VP 110	HN	HN
		VP 180	VP 180	VP 110	VP 110
				VP 180	VP 180

D I S C U S I O N

Los resultados obtenidos con las cepas Querétaro y Chimalhuacán concuerdan con los estudios realizados por Nagai *et al.*, (24,25) en los cuales se demuestran que las diferencias entre cepas de diferente patogenicidad reside en la susceptibilidad de las glucoproteínas HN_0 y F_0 a procesarse enzimáticamente a HN y F respectivamente. En el caso de cepas patógenas HN_0 y F_0 ambas son procesadas a HN y F, mientras que las cepas de mediana patogenicidad como en el caso de B_1 y La Sota solo HN_0 es procesada a HN. Esta diferencia debe de ser de gran importancia para que el virus presente o no actividad biológica completa, así como para que el virus presente actividad infecciosa se requiere que la glucoproteína F_0 sea convertida a F por lo tanto cuando esta no es procesada existe -- actividad biológica reducida. Lo mismo puede decirse de HN_0 , para que esta tenga actividad de hemoaglutinina-neuraminidasa se requiere de su rompimiento a HN. El hecho de que las glucoproteínas no sean procesadas a sus productos finales no es indicativo de falta total de actividad, ya que aunque esto no suceda existe una actividad disminuida de las proteínas del virus y sobre esta base esta el que una cepa como en el caso de B_1 y La Sota tengan patogenicidad reducida, mientras que otras como en el caso de las cepas Querétaro y Chimalhuacán tengan una infectividad alta.

En las cepas no purificadas se encuentran otros componentes que no corresponden a proteínas virales, estas son proteínas de los eritrocitos y líquido alantoideo, la naturaleza de estas es desconocida con excep--

ción de la ovalbúmina con un peso molecular de 45,000 Daltons. También se observan otros componentes de bajo peso molecular que se pueden deber a productos de degradación por el proceso de elución del virus de la superficie de los eritrocitos durante la purificación. A pesar de esto si comparamos las cepas no purificadas y las purificadas se observa que -- gran parte de los contaminantes, en especial ovalbúmina, son eliminados en el proceso de purificación.

CONCLUSION

Las cepas Querétaro y Chimalhuacán aisladas en México presentan un patrón electroforético similar a las cepas patógenas aisladas por otros investigadores, estas presentan la proteína de fusión F que no se observa en las no patógenas.

L I T E R A T U R A C I T A D A

1. Alexander, D.J. and Reeve, P.: The proteins of Newcastle disease virus. Structural proteins. *Microbiology* 5: 199-212 (1972).
2. Averg, R.J. and Niven, J.: Use of antibodies to purified Newcastle disease virus glycoproteins for strain comparison and characterizations. *Inf. Immun.* 26: 795-80, (1979).
3. Biester, H.F. and Schwarte, L.H.: Enfermedad de las aves. 4a. ed. Hispano-Americana Barcelona, España, 1964.
4. Bruner, D.W. and Gillespie, J.H.: Hagan, enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 3a. ed. La Prensa Médica Mexicana, México, 1977.
5. Chambers, P. and Samson, C.R.: A new structural protein for Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 50: 155-166 (1980).
6. Charles, M.D., Scheid, A. and Choppin, P.W.: Importance of antibodies to the fusion glycoprotein of paramixoviruses in the prevention of spread of infection. *J. Exp. Med.*, 151, 275-288 (1980).
7. Chase, M.W. and Williams, C.A.: Immunology and Immunochemistry. 2nd. ed. Academic Press, Inc. New York, 1968.
8. Cunningham, C.H.: Virología Práctica. ed. Acribia Zaragoza, España, 1971.
9. Cunspsans, R.W. and Choppin, P.W.: Orthomyxoviruses and Paramyxoviruses. Ultrastructure of Animal Viruses and Bacteriophages. An Atlas. Edited by: Dalton, A.J. and Hagenav, F., 213-237, Academic Press, Inc. New York, 1973.

10. Evans, M.H. and Kingsbury, D.W.: Separation of Newcastle disease virus by polyacrilamide gel electrophoresis. *Virology* 37: 559-604 (1969).
11. Conrat, H.F. and Ruechert, R.R.: Analysis of protein constituents of viruses. *Methods in Virology*. Edited by: Maramorosch, K. and Koprowski, H., 1-24, Academic Press, Inc. New York, 1967.
12. Dieter, K.H. and Rott, R.: Cotranslational and posttranslational processing of viral glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 68: 19-48 (1980).
13. Garten, W., Kohama, T. and Klenk, H.D.: Proteolytic activation of the haemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus loss of a glycopeptide. *J. Gen. Virol.* 51: 207-211 (1980).
14. Garten, W., Berk, W., Nagai, Y., Rott, R. and Klenk, H.D.: Mutational changes of the protease susceptibility of glycoprotein F of Newcastle disease virus: Effects on pathogenicity. *J. Gen. Virol.* 50: 135-147 (1980).
15. Hanson, R.P.: Newcastle disease, isolation and identification of avian pathogens. Edited by: Hitchner, S.P., Domermuth, C.H., Graham, H.P. and Williams, S.E. 160-170, American Association of Avian Pathologists In. Texas A and M University, 1975.
16. Haslam, E.A., Cheyne, L.M. and White, D.O.: The structural proteins of Newcastle disease virus. *Virology* 39: 118-129 (1969).
17. Inuma, M.: The structural proteins of Newcastle disease virus. II. Proteolytic digestion of the M-protein. *Microbiol. Immunol.* 24: 185-186 (1980).

18. Kida, H. and Yanagawa, R.: Classification of avian paramyxoviruses by immunodiffusion on the basis of antigenic specificity of their M protein antigens. *J. Gen. Virol.*, 52: 103-116, 1981.
19. Laver, W.G.: Purification of Influenza virus, *Fundamental Techniques in Virology*. Edited by: Habel, K.L. and Salzman, N.P., 82-86, Academic Press, Inc. New York, 1969.
20. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685 (1970).
21. Maizel, J.V.: Acrylamide gel electrophoresis of protein and nucleic acids, *Fundamental Techniques in Virology*. Edited by: Habel, K.L. and Salzman, N.P., 334-362, Academic Press, Inc. New York, 1969.
22. Moore, N.F., and Burke, D.C.: Characterization of the structural proteins of different strains of Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.*, 25: 275-289 (1974).
23. Morrison, T.G. and Simpson, D.: Synthesis, stability, and cleavage of Newcastle disease virus glycoproteins in the absence of glycosylation. *J. Virol.* 36: 171-180 (1980).
24. Nagai, Y., Klenk, H.D. and Rott, R.: Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 72: 494-508 (1976).
25. Nagai, Y., Hamaguchi, N., Maeho, K., Inuma, M. and Matsumoto, T.: Proteins of Newcastle disease virus. A comparison by partial protease digestion among the strains of different pathogenicity. *Virology* 102: 463-467 (1960).
26. Nagai, Y., Ogura, H. and Dieter, K.H.: Studies on the assembly of the envelope of Newcastle Disease virus. *Virology* 69: 523-538 (1976).

27. Portner, A.: The HN glycoprotein of Sendai virus; Analysis of site(s) involved in hemmagglutinating and neuraminidase activities. Virology 115: 375-384 (1981).
28. Pharmacia fine chemicals: Polyacrylamide gel electrophoresis, Laboratory Techniques.
29. Rott, R.: Molecular basis of infectivity and pathogenicity of mixovirus. Arch. Virol., 59: 285-298 (1979).