



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

**FACULTAD AGROPECUARIA Y DE  
RECURSOS NATURALES RENOVABLES**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

**“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS  
DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN AVES DE  
TRASPATIO DE LA PROVINCIA DE LOJA”**

Tesis de grado previa a la  
obtención del título de Médico  
Veterinario Zootecnista.

**Autor:**

**Nixon Hernan Gaona Castillo**

**Director:**

**Dr. Galo Escudero Sánchez, Mg. Sc.**

**Loja – Ecuador**

**2017**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES**  
**RENOVABLES**  
**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Galo Escudero Sánchez, Mg. Sc.

**DIRECTOR DE TESIS**

**CERTIFICA:**

Haber revisado el trabajo de tesis titulado **“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO DE LA PROVINCIA DE LOJA”**, realizado por el Sr. Egresado **NIXON HERNAN GAONA CASTILLO**, previo a la obtención del título de **MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**; el mismo que se desarrolló dentro del cronograma establecido. Por lo consiguiente se autoriza para que continúe con los trámites correspondientes a la tesis.

Loja, 12 de Diciembre de 2016



Dr. Galo Escudero Sánchez, Mg. Sc.

**DIRECTOR DE TESIS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES  
RENOVABLES  
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Que luego de haber procedido a la calificación de tesis escrita del trabajo de investigación titulado “**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO DE LA PROVINCIA DE LOJA**”, del señor egresado **Nixon Hernan Gaona Castillo**, y al haber constatado que se ha incluido en el documento las observaciones y sugerencias realizadas por los miembros del tribunal, autorizamos al interesado continuar con los trámites como requisito previo a la obtención del título de: **MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA.**

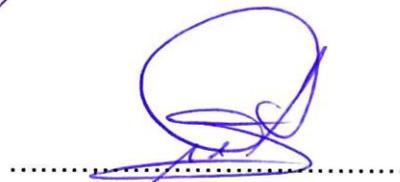
**APROBADA:**

Loja, 28 de marzo del 2017

Dra. Laura Peña Merino, Mg. Sc.  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



Dr. Teddy Manuel Maza Tandazo, Mg. Sc.  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Dr. Wilmer Augusto Vacacela Ajila, Mg. Sc.  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



## AUTORIA

Yo, **Nixon Hernan Gaona Castillo**, declaro ser el autor del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación del presente informe de tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

**Autor:** Nixon Hernan Gaona Castillo

**Firma:**  .....

**Cédula:** 1105238628

**Fecha:** Loja, 21 de abril de 2017.

## **CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO.**

Yo, Nixon Hernan Gaona Castillo, declaro ser autor de la tesis titulada: **“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO DE LA PROVINCIA DE LOJA”**, como requisito para optar al grado de: Médico Veterinario Zootecnista, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional (RDI):

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad. La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 21 días del mes de abril del dos mil diecisiete, firma el autor.

**Firma:**

.....  


**Autor:**

Nixon Hernan Gaona Castillo

**Número de cédula:**

1105238628

**Dirección de domicilio:**

Loja, Parroquia Quinara

**Correo Electrónico:**

nixongaona91@hotmail.com

**Celular:**

0959000663

### **DATOS COMPLEMENTARIOS**

**Director de tesis:**

Dr. Galo escudero Sánchez, Mg Sc.

**Tribunal de Grado:**

Dra. Laura Peña Merino, Mg. Sc.

Dr. Teddy Manuel Maza Tandazo, Mg. Sc.

Dr. Wilmer Augusto Vacacela Ajila, Mg. Sc.

## **AGRADECIMIENTO**

Primeramente a Dios y la Virgen del Cisne, por permitirme terminar mis estudios universitarios, mi sincero agradecimiento a la Universidad Nacional de Loja, que me abrió sus puertas para poder ingresar a la prestigiosa Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables; y en ella a los distinguidos docentes en especial al Dr. Galo Escudero, Mg. Sc., Director de Tesis, quien con sus valiosos conocimientos y paciencia me orientó para la culminación de la presente tesis.

A mis compañeros de aula y amigos que durante toda mi vida universitaria me brindaron su amistad y con quienes compartí muchas experiencias y emociones.

***Nixon Gaona***

## DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a Dios y la Virgen del Cisne, por todas sus bendiciones en mi etapa universitaria, brindándome salud y fortaleza para superar los obstáculos del diario vivir.

A mí querida hija Kimberly la cual ha sido motivación para seguir adelante, vencer los obstáculos que se presentaron en el camino para finalmente cumplir mi meta de ser un profesional.

A mis padres Hernán y Mariana que me supieron inculcar valores y orientarme durante toda mi vida a ser una persona de bien para la sociedad.

Dedico a mis amigos y familiares especialmente a mis hermanas Jenny, Karina, Tania y Luz, por estar siempre acompañándome y brindándome su apoyo incondicional en mi carrera universitaria.

***Nixon Gaona***

# INDÍCE GENERAL

Contenido	Pág.
CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS.....	ii
CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iii
AUTORIA .....	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN .....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
INDÍCE GENERAL .....	viii
INDÍCE DE CUADROS .....	x
INDICE DE FIGURAS .....	xi
RESUMEN .....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE .....	3
2.1.2. Definición.....	4
2.1.3. Antecedentes Históricos .....	4
2.1.4. Etiología.....	4
2.1.7. Epidemiología y Transmisión.....	7
2.1.8. Resistencia del Virus .....	8
2.1.10. Signos Clínicos .....	10
2.1.12. Lesiones Macroscópicas .....	13
2.1.13. Diagnóstico.....	13
2.1.14. Tratamiento .....	16
2.1.15. Prevención y Control .....	16
2.2. INFLUENZA AVIAR.....	18
2.2.1. Definición.....	18
2.2.2. Historia .....	19
2.2.3. Etiología.....	19
2.2.4. Clasificación y Características Morfológicas.....	20
2.2.5. Epidemiología .....	21
2.2.9. Signos Clínicos .....	24

2.2.10.	Lesiones Macroscópicas .....	24
2.2.11.	Diagnóstico Clínico .....	25
2.2.12.	Diagnóstico de Laboratorio .....	25
2.13.	Tratamiento .....	29
2.14.	Prevención y Control .....	30
2.15.	TRABAJOS RELACIONADOS SOBRE EL TEMA .....	31
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	35
3.1.	MATERIALES .....	35
3.1.1.	Materiales de Campo.....	35
3.1.2.	Materiales de Laboratorio .....	35
3.1.3.	Materiales de Oficina .....	36
3.2.	MÉTODOS .....	36
3.2.1.	Delimitación del Área de Estudio .....	36
3.2.2.	Tamaño y Selección de la Muestra.....	37
3.2.3.	VARIABLES.....	38
3.2.4.	RECOPIACIÓN DE LA INFORMACIÓN .....	38
3.2.4.5.	Técnicas de Recolección de las Muestras de Heces.....	41
3.2.4.7.	Análisis de Laboratorio .....	43
3.2.4.8.	Preparación de muestras para aislamiento viral .....	43
3.2.4.9.	Aislamiento viral de huevos embrionados de gallina .....	44
4.	RESULTADOS .....	46
4.1.	PRESENCIA DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN LA PROVINCIA DE LOJA .....	46
4.1.1.	Aislamiento Viral de aves de Traspatio de la Provincia de Loja Zona 1	46
4.1.2.	Aislamiento Viral de aves de Traspatio de la Provincia de Loja Zona 2	47
4.1.3.	Aislamiento Viral de aves de Traspatio de la Provincia de Loja Zona 3	48
5.	DISCUSIÓN.....	51
6.	CONCLUSIONES .....	54
7.	RECOMENDACIONES.....	55
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	56
9.	ANEXOS.....	64

## INDÍCE DE CUADROS

Contenido	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Puntos de muestreo por zona .....	41
<b>Cuadro 2.</b> Resultados pertenecientes a la Zona 1 de la Provincia de Loja .....	46
<b>Cuadro 3.</b> Resultados pertenecientes a la Zona 2 de la Provincia de Loja .....	47
<b>Cuadro 4.</b> Resultados pertenecientes a la Zona 3 de la Provincia de Loja .....	48
<b>Cuadro 5.</b> Prevalencia de la enfermedad de Newcastle e Influenza aviar en la Provincia de Loja .....	49
<b>Cuadro 6.</b> Registro de la recolección de muestras en el campo.....	68

## INDICE DE FIGURAS

Contenido	Pág.
<b>Figura 1.</b> Estructura del Virus de la Enfermedad de Newcastle (Ayllon, 2009).....	6
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del virus de IA. En él se puede observar las dos principales proteínas de superficie, la hemaglutinina (HA) la cual es predominante y en menor proporción la neuraminidasa (NA), también se puede observar dentro de la bicapa lipídica los ocho segmentos de RNA (Hilleman M. 2002).....	21
<b>Figura 3.</b> Provincia de Loja (Villavicencio, 2009).....	37
<b>Figura 4.</b> Mapa de distribución de sitios de muestreo en la Provincia de Loja.....	39
<b>Figura 5.</b> División de la Provincia de Loja por zonas.....	40
<b>Figura 6.</b> Herramienta ArcMap, trabajo con capas.....	64
<b>Figura 7.</b> Recolección de hisopados cloacales en gallinas traspatio.....	64
<b>Figura 8.</b> Recolección de hisopados cloacales en gallinas traspatio.....	65
<b>Figura 9.</b> Recolección de hisopados cloacales en aves de riña.....	65
<b>Figura 10.</b> Recolección de hisopados cloacales en aves de riña.....	66
<b>Figura 11.</b> Recolección de muestras de heces frescas en aves de traspatio.....	66
<b>Figura 12.</b> Recolección de muestras en patos.....	67
<b>Figura 13.</b> Instalaciones del Laboratorio de Patología Aviar de la Universidad Mayor de San Marcos Perú.....	67

**“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE  
NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO  
DE LA PROVINCIA DE LOJA”**

## RESUMEN

La enfermedad de Newcastle e Influenza aviar son enfermedades altamente contagiosas que afecta a muchas especies de aves domésticas ocasionando altas mortalidades. La presente investigación se realizó en la Provincia de Loja, sur del Ecuador, para determinar la presencia del virus de (NC) e Influenza Aviar (IA), se recolectaron 300 muestras de heces frescas e hisopados cloacales, en aves de traspatio y de riña, cerca de humedales y relacionadas con avicultura comercial y de traspatio, para aislamiento viral en laboratorio. Para el muestreo se utilizó un software académico ARCGIS el cual permite ingresar datos de humedales, sitios de producción avícola industrial, vías de acceso, logrando así de esta manera representar el área de interés como de un mapa con su respectiva simbología expresada en puntos de muestreo georeferenciados. Las muestras recolectadas procedieron de aves sanas y aves con signos de la enfermedad o sintomatología respiratoria y digestiva, siendo la mayor cantidad de muestras de aves sanas presuntamente no vacunadas para NC, el aislamiento viral se realizó en huevos embrionados de 9 a 11 días, se utilizó el fluido alantoideo de los huevos inoculados para realizar la prueba de Hemoaglutinación para determinar la presencia del virus. Los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio fueron negativos, en el aislamiento viral y la prueba de Hemoaglutinación no se presentaron virus de la enfermedad de NC e IA (0/300), con una prevalencia de 0(0-1,19) el intervalo de confianza fue de 95 %. Por lo tanto se concluye que las aves muestreadas en la Provincia de Loja no se encontraban infectadas por estos virus de Newcastle e Influenza Aviar.

**Palabras clave:** Enfermedad de Newcastle, Influenza Aviar, aislamiento viral.

## SUMMARY

Avian Influenza and Newcastle disease are highly contagious diseases affecting many species of poultry causing high mortalities. This research study was carried out in Loja Province, South of Ecuador, with the purpose of determining the presence of the Newcastle (NC) and Avian Influenza (AI) virus, so 300 samples were collected of fresh stool and swab sewage of backyard poultry and cockfight birds that can be found near wetlands and commercial poultry for viral isolation in laboratory. These data was loaded to an academic software ARCGIS, updating data of wetland sites of industrial poultry production, access roads, thus achieving in this way represent the area of interest as a map with their respective symbols expressed in geo-referenced sampling points. Besides, the collected samples came from healthy birds and birds with signs of the disease or symptoms of respiratory and digestive illness, being the largest number of samples of healthy birds allegedly not vaccinated for NC, the viral isolation was performed in 9 to 11 days in embryonated eggs. Also, it was used the allantoic fluid of the inoculated eggs to the hemagglutination test to determine the presence of the virus. The results of laboratory tests were negative, in the viral isolation and Haemagglutination test did not show disease of NC or AI virus (0/300), with a prevalence of 0(0-1,19), the confidence interval was 95%. Therefore, it is concluded that the sampled birds in Loja province were not infected by these viruses of Newcastle and Avian Influenza.

**Key words:** Virus, Newcastle, Avian Influenza, viral isolation.

# 1. INTRODUCCIÓN

La producción de gallinas de traspatio es una actividad de gran importancia dentro de las comunidades rurales del Ecuador, al igual que la cría de aves de riña por personas aficionadas a los gallos de pelea, la cual se caracteriza por la baja inversión y la facilidad para llevarla a cabo. Sin embargo, esta producción está seriamente amenazada por la ocurrencia de enfermedades infecciosas, entre las que se encuentra la enfermedad de Newcastle (NC) e Influenza Aviar (IA) ocasionando graves pérdidas económicas a los productores. La avicultura familiar es básica para la seguridad alimentaria en gran parte del mundo FAO (20013)

La enfermedad de Newcastle es causado por un virus de la familia Paramixoviridae y se clasifica en tres cepas una de baja virulencia (lentogénica), de virulencia media (mesogénica), y la cepa de alta virulencia (velogénica) que se divide en viserotrópica y neurotrópica. El periodo de incubación es de 21 días. La principal característica de la enfermedad de NC es la capacidad de aglutinar los glóbulos rojos de ciertas especies animales. Los síntomas no son patognomónicos y para diagnosticar esta enfermedad se lo realiza por medio de un análisis de laboratorio (Viveros M y *et al.*, 2012).

El virus de la Influenza Aviar pertenece a la familia Orthomyxoviridae, al género influenzavirus y este se clasifica en tres tipos: Influenzavirus A, B y C. En las aves, el periodo de incubación medio es de 3 a 5 dpi, con un máximo de 21 dpi. Los síntomas no se consideran patognomónicos y para su diagnóstico se deben realizar pruebas de laboratorio, cuando esta enfermedad es altamente patógena puede afectar rápidamente a las aves de corral sin ninguna señal de infección. Una vez establecida, se puede diseminar rápidamente de parvada en parvada, para prevenir de estas enfermedades es necesario tener una estricta bioseguridad y llevar un calendario de vacunación (Cardona, C. 2003).

El curso de estas enfermedades en las aves puede variar desde forma subclínica hasta moderado a severo con alta mortalidad dependiendo principalmente de la virulencia de la cepa circulante y de la susceptibilidad de la especie infectada.

La enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar son problemas sanitarios a nivel mundial en las explotaciones aviares de distintos tipos, de tal manera que las aves de traspatio, así como las aves de riña probablemente infectadas con enfermedades virales pueden ser de gran riesgo para facilitar la difusión y permanencia del virus en la industria avícola, estos virus son de rápida propagación, ya que al contaminar otras aves, vehículos, jaulas, huevos, cartones y equipo, pueden durar mucho tiempo a temperatura ambiente, uno de los peligros más fuertes para la salud de las aves en una granja avícola son las aves de traspatio, las cuales se encuentran en las casas de las comunidades, en los alrededores de una granja, o bien en las casas de los trabajadores de la misma.

El objetivo principal de la presente investigación fue determinar la presencia del virus de Newcastle e Influenza Aviar en aves de traspatio incluyendo las de riña, criadas cerca de humedales y de granjas avícolas comerciales, los resultados contribuyen a generar información actual sobre la presencia del virus de la enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar en aves de traspatio en la Provincia de Loja, para llevar a cabo dicha investigación se han planteado los siguientes objetivos:

- Aislar el virus de Influenza Aviar en aves de traspatio incluyendo las de riña, criadas cerca de humedades y de granjas avícolas comerciales en la Provincia de Loja.
- Aislar el virus de Newcastle en aves de traspatio incluyendo las de riña, criadas cerca de humedades y de granjas avícolas comerciales en la Provincia de Loja.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE**

#### **2.1.1. Enfermedad de Newcastle y la Crianza de Traspatio**

Venturino (2010), habla sobre la bioseguridad de las granjas avícolas, donde menciona que las aves de traspatio han sido responsabilizadas de ser los núcleos originarios de muchas de las enfermedades que causan posteriormente un alto impacto en las aves comerciales. Estas aves se comportan como portadoras pasivas de muchos agentes patógenos, sobre los que han generado inmunidad y que cuando se confrontan con un lote comercial son capaces de manifestarse provocando severas enfermedades.

Según la FAO (2013), la "avicultura familiar" es decir, la cría doméstica tradicional de gallinas, pavos, patos y gansos, gallinitas de Guinea, aves de riña, pichones, faisanes y codornices, que utiliza pocos gastos en la producción de estas aves; es básica para la seguridad alimentaria en gran parte del mundo. Muchos países dependen de las aves de traspatio o crianza en aldeas para aportar una importante ración de proteína de origen animal, ya sea en la forma de huevos o carne, sobre todo a mujeres y niños. Las pérdidas constantes a causa de la enfermedad de Newcastle afectan severamente la cantidad y calidad de los alimentos de personas con dietas marginales. Cálculos recientes, la avicultura en el patio de casa y al aire libre representa hasta un 70% del total de la producción de huevos y carne de aves en los países de bajos ingresos y con déficit de alimentos.

Los niveles productivos y reproductivos bajo la crianza de traspatio son relativamente bajos debido a deficiencias en el manejo de la alimentación y en el control de las enfermedades. Este tipo de producción está seriamente amenazada por la ocurrencia de enfermedades infecciosas, como la enfermedad de Newcastle en su forma virulenta, la cual ocasiona graves pérdidas económicas en aves de producción y sigue siendo una constante amenaza para las aves de traspatio (FAO, 2013).

### **2.1.2. Definición**

La enfermedad de Newcastle es una enfermedad de tipo viral infecciosa y altamente contagiosa, producida por un Paramixovirus que se reconoció por primera vez en el año 1926 cuando se propagó en la costa norte de Inglaterra alrededor de Newcastle, de allí deriva su nombre (Viveros M y *et al.*, 2012).

### **2.1.3. Antecedentes Históricos**

La enfermedad de Newcastle tomo dicho nombre debido a su propagación a lo largo de la costa norte de Inglaterra alrededor de Newcastle, la epizootia fue descrita por Doyle en 1926. No obstante, antes de 1926 ya existían reportes de brotes de una enfermedad similar en Corea en 1924 y en Europa Central, pero se desconocía el agente causal. Para diferenciar de la peste aviar Doyle realizó pruebas de inmunidad y el virus recibió el nombre de virus de la enfermedad de Newcastle por el lugar donde se aisló (Cuello, S. *et al.*, 2011).

A continuación, esta enfermedad de Newcastle Aviar se transmitió a otros países como Filipinas, China, Japón, Corea, Australia, España y parte de África. En 1935, llega a la costa norte- americana del Pacífico y después de 1940 se difunde al resto de América, Egipto y todos los países de Europa. Desde entonces se informa la presencia de brotes de la enfermedad en todos los continentes excepto Oceanía (Cuello, S. *et al.*, 2011).

Se estima la presencia de cuatro o más panzotias de esta enfermedad, la primera, abarcó desde el brote inicial en 1926 hasta cerca de los años 60, originada en el sudeste asiático con una lenta diseminación hacia Europa. La segunda, tuvo una rápida diseminación a finales de los años 60 hasta el año 1973. La tercera panzootia se inició en medio Oriente a finales de los años 70, la primera ave afectada fue la paloma doméstica, facilitando la rápida diseminación de la enfermedad a Europa y otras partes del mundo. La cuarta panzootia algunos autores indican que se inició desde finales del año 1996 hasta la actualidad. (Cuello, S. *et al.*, 2011).

### **2.1.4. Etiología**

La enfermedad de Newcastle es causada por un miembro de la familia Paramixoviridae del genero Paramixovirus el cual se agrupa en tres

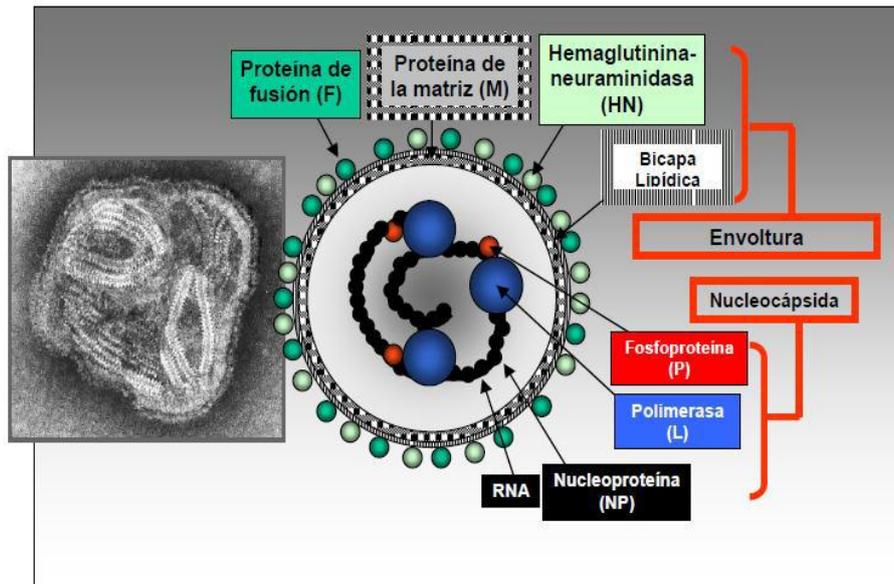
cepas: la cepa lentogénica (casi avirulenta) la cual es usada ampliamente como agente vacunal, la cepa mesogénica de virulencia media y ocasionalmente usada como cepa vacunal y la cepa velogénica o cepa virulenta, considerada como cepa de campo. De esta última se han descrito dos tipos de cepas como son: cepas viscerotrópicas, que producen lesiones patológicas en el aparato digestivo y cepas neurotrópicas, que producen lesiones patológicas en el aparato respiratorio y a nivel neurológico (Viveros M y *et al.*, 2012).

Según lo emitido por Rojas, E. (2008) la principal característica de la enfermedad de NC es la capacidad de aglutinar los glóbulos rojos de ciertas especies animales (hemoaglutinación). No presenta diferencias antigénicas, pero si en el grado de patogenicidad; con base en esto, las cepas se han clasificado, según el tiempo que tardan en matar al embrión de pollo en:

- Lentogénicas, en 96 horas o más.
- Mesogénicas, en 72 a 96 horas.
- Velogénicas, en 24 a 72 horas.

#### **2.1.5. Morfología y estructura**

Los virus de la enfermedad de NC son pleomórficos aunque generalmente adoptan una morfología esférica con un diámetro que oscila entre 100 a 150 nm. Algarib y *et al.*, (2003) menciona que todos los virus de este orden tienen una simetría helicoidal de la nucleocápside con una cadena única en sentido negativo y lineal en su genoma de ácido ribonucleico, el cual codifica para seis proteínas las cuales se pueden ver en el siguiente diagrama del virus:



**Figura 1.** Estructura del Virus de la Enfermedad de Newcastle (Ayllon, 2009)

La proteína M forma un vínculo entre las glicoproteínas en los virus envueltos y la nucleoproteína en la nucleocápside, estabiliza la estructura viral. Otras dos proteínas la HN y la proteína F, las cuales forman proyecciones en la envoltura viral. Calnek B.W. (2000) indica que los Ac formados para la proteína NH son la base para la serología en la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI). Al igual que Botero H. L. A. (2006) señala que la proteína F es la encargada de mediar la fusión virus-célula y célula-célula. Estas glicoproteínas son esenciales en la infectividad viral y son los Ag ideales en la inducción de la inmunidad.

### 2.1.6. Multiplicación Viral

El virus se replica en su totalidad en el citoplasma. Luego de la unión del virus a la célula por medio de los receptores glicolipídicos, se produce la fusión de las membranas virales y celulares a pH fisiológico y la nucleocápsida penetra dentro de la célula, donde permanece intacta con sus tres proteínas asociadas, inmediatamente se activa la ARN polimerasa ARN dependiente para producir varios ARN complementarios de polaridad positiva, que actúan como ARN mensajeros y utilizan los mecanismos celulares para la producción de proteínas virales (Cuello, S. *et al.*, 2011).

Además, se sintetiza un ARN completo de polaridad positiva que sirve como molde para la replicación del genoma viral de polaridad negativa que se asocia con la nucleoproteína y la transcriptasa para formar la nucleocápsida. La maduración del virión involucra en primer lugar la incorporación en la membrana de la célula hospedero de las proteínas virales de la envoltura sintetizadas, seguido de la asociación de la proteína M y otras proteínas no glicosiladas con la membrana celular modificada. A continuación, se ubica la nucleocápsida bajo la proteína M y ocurre la formación y liberación de los viriones maduros por exocitosis (Cuello, S. *et al.*, 2011).

Las cepas del virus de la enfermedad de NC tienen la propiedad de multiplicarse bien en huevos embrionados de gallina y debido a los altos títulos virales que se alcanzan en ellos, son utilizados para el aislamiento y propagación del mismo. Las cepas virulentas se diseminan ligeramente por el embrión y producen mortalidad en corto tiempo, por lo contrario las cepas avirulentas no provocan mortalidad y si la producen, ocurre en un lapso mayor de tiempo después de la inoculación. No obstante, este comportamiento puede variar en función de la vía de inoculación, pues cepas que no producen mortalidad embrionaria al ser inoculadas por la cavidad alantoidea provocan la muerte del embrión al ser inoculadas vía saco vitelino. El tiempo que demora un aislado en producir mortalidad en el embrión de pollo está directamente relacionado con su patogenicidad para el pollo (Cuello, S. *et al.*, 2011).

### **2.1.7. Epidemiología y Transmisión**

La comercialización legal de aves de jaula, aviario, aves de corral y sus productos han jugado un papel clave en la difusión del virus de la enfermedad de Newcastle de países infectados a países no infectados, pero con la aplicación de rigurosos procedimientos de cuarentena y de procedimientos diagnósticos antes de ingresar a diferentes países, dichas introducciones no son frecuentes. Maclachlan Dubovi (2011), menciona que algunas especies de psitácidos pueden llegar a ser permanentemente infectados con el virus virulento de la enfermedad de Newcastle y excretar de forma intermitente el virus durante más de un año sin mostrar signos clínicos.

La frecuente transmisión es de ave a ave mediante aerosoles, al igual las secreciones nasales que caen en el agua de bebederos también resulta ser un medio eficaz para la transmisión dentro del gallinero, así mismo existen otras formas de propagación del virus tales como: entrada de aves nuevas portadoras de la enfermedad, entrada del virus mediante el tránsito de pájaros, perros, personas y vehículos no controlados sanitariamente. Una vez contagiado el animal, el virus se replica en células del tracto respiratorio desde donde alcanza la circulación sanguínea, para luego replicarse nuevamente en las células de los órganos viscerales produciéndose una nueva liberación del virus a la corriente sanguínea, pasando en algunos casos al sistema nervioso central; su periodo de incubación puede variar de 2 a 15 días (Viveros M y *et al.*, 2012).

Las forma de transmisión oral sucede al momento de ingerir alimentos o agua contaminados con estos virus, o cuando se dan picotazos entre ellas y en su entorno. También pueden inhalar virus en gotas de aerosol de secreciones respiratorias, siendo esta una forma de transmisión respiratoria. Los virus de NC e influenza aviar pueden propagarse en fómites y vectores mecánicos vivos, incluidos los humanos (De La Sota, 2004; Anis *et al.*, 2013).

King, D. (2002), señala que el virus vacunal, es decir al momento que se realiza vacunaciones con vacuna viva, este virus se elimina por el huevo hasta 13 días postinoculación y en las heces 14 a 19 días post-inoculación, siendo la eliminación del virus más prolongada en pavos. Ante esta última fuente existe propagación de brotes a través de corrientes de aire, evidenciada hasta 8 kilómetros de distancia, y a cuya vía corresponde especial importancia para la diseminación de las cepas víricas velogénicas neumotrópicas.

#### **2.1.8. Resistencia del Virus**

Según la OIE (2009), el virus es destruido en 30 min. a 55°C, a 37°C conserva su actividad después de 24 horas, pero no en 72 h. Sánchez (1990), indica que todas las cepas tienen el mismo comportamiento antes los cambios de temperatura, con respecto a esto la, refiere que se inactiva a 56°C durante 3 h y a 60°C en 30 min., que se inactiva en un Ph ácido, que además es sensible al

éter, se inactiva con formalina y con fenol. El virus tiene supervivencia, sobreviviendo durante largos periodos a temperatura ambiente, especialmente en las heces.

La exposición de órganos infectados a una hora de insolación directa es afectado y destruido el virus. El virus de la enfermedad de NC permanece viable por lo menos 6 meses en médula ósea y tejido muscular de cadáver de gallinas guardadas en enfriamiento comercial (Peeters *et al.*, 1999).

Helm Juliet D. (2003), menciona que su resistencia en el medio ambiente es limitada y al estar expuesto a los locales contaminados se inactivan por sí solos en un tiempo relativamente breve por Ej.

- La capacidad infectante en las gallinas se pierde entre 14 y 30 días
- Conserva su virulencia 20 días a 20°C y humedad de 100%
- Heces de gallina a la luz muere en 14 días
- El virus es resistentes a bajas temperaturas, pues conserva su poder infectante durante 1 año y más en aves congelados a - 20 °C
- El formol, el Fenol y la propiolactona dañan la ineffectividad sin afectar su inmunogenecidad.
- Se destruye por desinfectantes de uso común como: Formalina al 2%, sosa cáustica y lechada de cal al 3% y derivados del amonio cuaternario al 3%.

En cuanto a la resistencia al calor según esta misma autora Helm Juliet D. (2003), indica que existen cepas que han resistido 36°C durante 270 min. y al cabo de dicho tiempo conserva su poder infectante, sin embargo otras han tolerado solamente de 15- 30 min esa temperatura. En algunos galpones contaminados sin limpiar hasta 7 días en verano, 14 días en la primavera, y 30 días durante el invierno se ha observado la supervivencia del virus.

#### **2.1.9. Periodo de Incubación**

Rojas, E. (2008), indica que el período de incubación comprende desde los dos a quince días, con un promedio de cinco a seis días y depende de:

- El tipo de cepa
- Cantidad de virus
- Edad del animal
- Susceptibilidad de la especie.

A efectos del Código sanitario de los animales terrestre de la OIE, el período de incubación de la enfermedad de Newcastle es de 21 días (OIE. 2014).

#### **2.1.10. Signos Clínicos**

Los signos clínicos y las lesiones patológicas por sí solos apuntan a la presencia de una enfermedad pero no son patognomónicos y requieren del aislamiento o la demostración directa de la presencia del virus y posterior caracterización patogénica como diagnóstico confirmativo, pero las cepas mesogénicas se asocian con baja mortalidad, enfermedad respiratoria aguda, y signos neurológicos en algunas aves siendo más complicado su diagnóstico (Anis *et al.*,2013).

- **Newcastle velogénico viscerotrópico**

La enfermedad de Newcastle velogénico viscerotrópico es ocasionado por cepas virulentas de campo como la Milano, Hertz 33, NY., Parrot 70181 y ESSEX 70, los signos clínicos que presentan son boqueo, tos, depresión, inapetencia, caída total o parcial de la postura, huevos fáfara, con cáscaras frágiles y albúmina líquida, diarrea grisácea líquida, inflamación alrededor de los ojos y cuello (King, D. 2002).

- **Newcastle velogénico neurotrópico**

La enfermedad de Newcastle velogénico neurotrópico es producido por la cepa Texas GB la cual ha sido utilizada como cepa de desafío. Se puede presentar como enfermedad respiratoria repentina, seguida por trastornos nerviosos 1 a 2 días después. Se puede observar alas caídas, patas débiles, tortícolis, depresión, inapetencia, parálisis, caída total o parcial de la postura, huevos fáfara y frágiles (King, D. 2002)

- **Newcastle mesogénico**

Puede alcanzar una morbilidad del 100% y una mortalidad del 50% de las aves (en las aves jóvenes puede llegar al 100% de la mortalidad), presenta una alta virulencia, forma aguda y letal, de igual forma puede presentar signos respiratorios, pero en este patotipo predominan los signos nerviosos. En general se observa tos, jadeo, así como caída en la producción de huevo, y problemas en la calidad de la cáscara. Las cepas que ocasionan estos signos son la Roakin, Komarov, Meekteswar y H, la cuales son usadas ocasionalmente como sepas vacunales (Villegas, P. 2015).

- **Newcastle lentogénico**

Se puede presentar en aves de todas las edades, en donde la infección es generalmente inaparente, y es causada por las cepas Hitchner BI, Clone 30, la Sota y F, las mismas que han sido ampliamente usadas como cepas vacunales. A veces se puede observar ligera dificultad respiratoria, disminución a la producción de huevo, así como deterioro rápido de la calidad del cascarón. Además en pollo de engorde es responsable de pérdidas afectando la ganancia de peso, así como la viabilidad de la parvada (Calnek, B. 2000).

- **Newcastle asintomático**

Algunas cepas que tienen predilección por el tracto intestinal sobre el respiratorio, causando una infección entérica subclínica. Se detecta únicamente por medio de pruebas de laboratorio (aislamiento y serología), y está asociada a virus entéricos (Villegas, P. 2015).

### **2.1.11. Patogénesis e Inmunidad**

Cuello, S. *et al.*, (2011), menciona que una vez ingresado el virus al cuerpo del animal primeramente se replica en las mucosas del tracto respiratorio e intestinal. La diseminación de la infección en la tráquea ocurre por la acción de los cilios y por la infección célula a célula. Subsiguientemente la diseminación del virus depende en gran medida de la virulencia de la cepa, mientras que las cepas lentogénicas circulan con bajos títulos, las mesogénicas afectan los

riñones, pulmones, bazo y la bolsa de Fabricio y las velogénicas se encuentran dentro de las 12-24 horas post infección (pi) prácticamente en todos los tejidos, con altos títulos en el timo y más bajos en los músculos y el cerebro.

Luego de la multiplicación inicial en el sitio de entrada, las cepas velogénicas se difunden al bazo, hígado, riñones y pulmones donde se interrumpe la multiplicación por 12-24 horas hasta las 36 horas pos infección y los títulos virales disminuyen. Durante la segunda multiplicación, después de la interrupción, el virus es nuevamente liberado al flujo sanguíneo, lo cual está asociado con la aparición de los signos generales de la enfermedad y la excreción de virus (Cuello, S. *et al.*, 2011).

La secuencia en la cual son infectados los tejidos explica porque los signos nerviosos aparecen después de la presencia de los signos respiratorios, intestinales y generales de la enfermedad; sin embargo, en las cepas velogénicas neurotrópicas el virus puede estar presente al mismo tiempo en el sistema nervioso central, en el tracto intestinal y respiratorio (Cuello, S. *et al.*, 2011).

La respuesta inmune inicial a la infección con el virus de la enfermedad de NC es mediada por células y puede ser detectada tan temprano como 2-3 días pos vacunación con vacuna viva lo que explica la temprana protección al desafío en aves vacunadas antes de que puedan ser detectados anticuerpos y evidencia la importancia de esta inmunidad en la respuesta a la vacunación. (Cuello, S. *et al.*, 2011).

Los anticuerpos en el ave afectada aumentan rápidamente, tanto a nivel local como sistémica, en la respuesta sistémica aparecen en una primera fase los anticuerpos de tipo IgM seguido por la IgG, los cuales son detectados entre los 4 a 6 días pos infección y persisten de 8 a 12 meses. El nivel de los títulos de anticuerpos dependen de la cepa de virus que produce la infección, pero generalmente el nivel máximo de la respuesta se alcanza alrededor de la tercera o cuarta semana pos infección, después de la cual los títulos comienzan a declinar si no se realizan reinmunizaciones, es decir que se debe tener muy en cuenta el calendario de vacunación. Estos anticuerpos son

transmitidos mediante el saco vitelino a la progenie y la protegen de la enfermedad en las primeras 3-4 semanas de vida sin interferir con el desarrollo de la respuesta local de anticuerpos (Cuello, S. *et al.*, 2011).

#### **2.1.12. Lesiones Macroscópicas**

Las lesiones que se presentan en la enfermedad no son patognomónicas y varían de acuerdo a muchos factores como la cepa viral, el huésped afectado, el grado de protección inmunológica y otros factores, estos pueden variar de 100% de mortalidad en aves no vacunadas a solo una baja en la producción de huevos en ponedoras aparentemente sanas y bien vacunadas. Las lesiones que se pueden encontrar son:

- Edema en tejidos intestinales y peritraqueales, especialmente en la entrada torácica
- Congestión, y a veces hemorragia de la mucosa traqueal.
- Petequias y equimosis de la mucosa del proventrículo, especialmente localizado en las glándulas de la mucosa.
- Edema, hemorragias, necrosis o ulceración del tejido linfoide en la mucosa de la pared intestinal.
- Hemorragias o degeneración en ovarios (Miller P.J, 2012).

#### **2.1.13. Diagnóstico**

Las pruebas de laboratorio son las más utilizadas para el diagnóstico de esta enfermedad de NC, sabiendo que desde el punto de vista clínico es difícil llegar a un diagnóstico definitivo, dentro de las pruebas de laboratorio las más utilizadas son: el aislamiento viral en donde se hace cultivo del virus en embrión de pollo, y posteriormente se hace un examen de la actividad de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación; identificación y evaluación de los niveles de anticuerpos se puede efectuar con las pruebas de laboratorio de HI y Elisa; Otras pruebas de diagnóstico que pueden utilizarse son seroneutralización de placas, inmunodifusión, fijación del complemento e inmunofluorescencia (Viveros M y *et al.*, 2012).

### 2.1.13.1. Viroológico

- **Aislamiento e Identificación Viral**

Para el diagnóstico eficaz y confiable se realiza el aislamiento viral que permite la caracterización del aislado viral. Este método tiene el inconveniente de que los procedimientos utilizados generalmente son lentos pues requieren de múltiples pasos, lo cual presenta una desventaja para el control de los brotes debido a la rapidez con que se diseminan las enfermedades virales y el corto tiempo de vida productiva de la mayoría de las aves comerciales (Li y Zhang, 2004, Tiwari y *et al.*, 2004).

Para efectuar el aislamiento viral en casos de enfermedad severa con alta mortalidad se utilizan muestras procedentes de aves muertas o recientemente eutinizadas que incluyen exudado oro-nasal y muestras de órganos como, tráquea, pulmones, intestino, cerebro, bazo, hígado, riñones y corazón. En el caso que se tomen muestras de aves vivas se utilizan exudados traqueales y cloacales (OIE, 2014).

De acuerdo a la OIE (2008), para la caracterización patogénica de los aislados del virus de la enfermedad de NC se realiza, por el Índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) en pollitos SPF de 1 día de edad y por la determinación de la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión del péptido conectante de la proteína F.

- **Molecular**

La OIE (2008), ha facilitado la introducción de las técnicas moleculares como prueba aceptada para el diagnóstico, identificación y caracterización de la enfermedad la cual permite realizar el diagnóstico de una forma rápida, segura, sensible y específica que permita tomar las medidas de control adecuadas para prevenir la posterior diseminación y minimizar las pérdidas ocasionadas por la enfermedad.

Brown y *et al.*, (1999) y Kommers y *et al.*, (2001), utilizaron la hibridación “in situ” para detectar la extensión de la replicación viral en muestras de tejidos de

pollos infectados con cepas velogénicas, mesogénicas y lentogénicas del virus de la enfermedad de NC.

- **Serológico**

El virus de la enfermedad de NC se puede emplear como un antígeno en una gran variedad de pruebas serológicas, lo que permite que se utilicen las técnicas de neutralización o de enzimoimmunoensayo (ELISA) y HI para valorar el nivel de anticuerpos en las aves. Actualmente la prueba HI es la más ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos contra la enfermedad de NC en las aves, aunque muchos productores de aves de corral utilizan kits de ELISA comerciales para valorar los niveles de anticuerpos tras la vacunación (OIE, 2014).

Las pruebas de laboratorio HI y ELISA pueden medir los anticuerpos contra diferentes antígenos; dependiendo del sistema utilizado, la prueba ELISA puede detectar anticuerpos contra más de un antígeno, mientras que el uso de la prueba HI probablemente se limita a los anticuerpos contra la proteína de la enfermedad de Newcastle. Sin embargo, algunos estudios de tipo comparativo han demostrado que los estudios de ELISA son reproducibles y tienen sensibilidad y especificidad altas; se ha demostrado que correlacionan bien con la prueba HI (OIE, 2014).

- **Prueba Serológica: Inhibición de la Hemoaglutinación**

Para demostrar la presencia de anticuerpos se utilizan con mayor frecuencia las pruebas serológicas (Calnek, 2000). Los virus que aglutinan eritrocitos de aves incluyen Enfermedad de Newcastle, Influenza Aviar, Bronquitis infecciosa y Adenovirus. La inhibición de la hemoaglutinación por anticuerpos específicos es la base para la prueba de HI. Los componentes básicos de la prueba HI son, el antígeno hemoaglutinante (HA), el suero en diluciones seriadas y la suspensión de eritrocitos. La prueba se puede hacer en tubos o en placas de micropruebas, los paramixovirus aviares se detectan y cuantifican mediante la prueba HI (Asociación Americana de Patólogos Avícolas (AAAP), 1989).

La actividad HA mostrada en líquidos bacteriológicamente estériles tomados a partir de huevos inoculados es posible que pueda corresponder a la presencia de cualquiera de los 16 subtipos de hemoaglutininas de los virus de la gripe A o de los ocho restantes serotipos de paramixovirus. El virus de la enfermedad de NC puede confirmarse empleando antisuero específico en una prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI). Regularmente se utiliza el antisuero de pollo preparado contra una de las cepas del virus de la enfermedad de NC (OIE, 2014).

Para la caracterización del virus de la enfermedad de NC han sido utilizados los anticuerpos monoclonales, por lo cual nos ha permitido determinar la diversidad antigénica ante los APMV-1. Al utilizar esta diversidad en el diagnóstico y epidemiología de los brotes de la enfermedad de NC depende en gran medida de lo estrechamente relacionada que estén la diversidad antigénica con las propiedades biológicas del virus y el mantenimiento de esta antigenicidad durante una epizootia. Con su empleo se ha logrado realizar una serotipificación altamente específica y diferenciar virus vacunales de aislados de campo, así como, establecer la especificidad de la variante paloma del virus de la enfermedad de NC y su distribución a nivel mundial (Cuello, S. *et al.*, 2011).

#### **2.1.14. Tratamiento**

La enfermedad de Newcastle aún no tiene un tratamiento específico, por lo cual solo se realiza prevención y control de esta enfermedad con vacunación y prácticas de bioseguridad. En la mayoría de los países con producción avícola a escala comercial, se practica la vacunación profiláctica (Cuadros, R. J. A. 2011)

#### **2.1.15. Prevención y Control**

Para que un país se declare libre de Newcastle la enfermedad no se debe presentar en el mismo como mínimo en los 3 últimos años. Los países en que se ha llevado a cabo una política sistemática de saneamiento, con o sin vacunaciones, se estimarán limpios de la enfermedad cuando ha transcurrido 6 meses desde la desaparición del último caso. (Arenas, M. 2003).

Cuando han existido brotes del virus de Newcastle se debe controlar algunos aspectos como el ingreso de nuevas aves mediante cuarentenas y controles de movimiento, despoblación de todas las aves afectadas y expuestas, limpieza profunda y desinfección de los locales. Para una desinfección eficaz se recomienda utilizar los desinfectantes como la clorhexidina, hipoclorito de sodio al 6%, fenólicos y agentes oxidantes. El APMV-1 también puede ser inactivado por calor a 56°C durante 3 horas o 60° durante 30 minutos, ácido pH 3, éter y formol; la eficacia del formol varía con la temperatura (Rovid, A. *et al.*, 2011).

- **Vacunación**

Calnek, B. (2000). Menciona que la vacunación constituye la herramienta profiláctica más efectiva y menos costosa para el control de las enfermedades infecciosas y el uso combinado de vacunas vivas atenuadas e inactivadas induce en las aves una mayor protección frente a los agentes infecciosos.

La inmunización de las reproductoras mediante la vacunación reviste una especial importancia pues estas le confieren a la progenie una inmunidad pasiva que puede protegerla durante las primeras semanas de vida (Cuello, S. *et al.*, 2011).

El esquema recomendado para la vacunación es el siguiente:

Vacuna en ponedoras.- A los 28 días pos vacunación se extrae sangre para prueba de HI (para ver títulos de anticuerpo.)

- 1ra dosis a los 7 días
- 2da dosis-45-50 días
- 3ra dosis a los 110 días

En reproductoras, la 3ra dosis es con una cepa inactivada y la polivalente (NC; BI; Reovirus; AV) a los 110 días. El uso combinado de vacunas vivas y muertas produce una protección mucho más sólida para el control del virus velogénico que el uso separado (Cardoso, 2000).

- **Control**

Cardoso (2000), habla sobre el control de la enfermedad de Newcastle y menciona que con la aplicación de las vacunas no estamos 100% libres de esta enfermedad pues independientemente del programa de vacunación elegido, el programa de control debe ser seguido por todos dentro del área de riesgo. Eso incluye aves de producción industrial, aves de corral y aves de deportes, (gallos de pelea). Por un período que debe ser definido de acuerdo con el comportamiento de las epidemias. En el caso de las zonas endémicas, el tiempo del programa de control debe ser más largo que los brotes.

El objetivo de aplicar un control riguroso es proteger a las aves de la infección del virus de la enfermedad de NC y por otra parte reducir el número de aves susceptibles mediante la aplicación de la vacunación. Para el control, se tiene en cuenta como factor primordial la diseminación de la enfermedad y en consecuencia, se adoptan disposiciones a nivel nacional e internacional que regulan el comercio de los productos avícolas, así como, de aves vivas. No obstante, los factores más importantes en prevenir la introducción de la enfermedad y su diseminación en presencia de un brote, son las condiciones bajo las cuales las aves son criadas y el grado de bioseguridad practicado en las explotaciones avícolas.

## **2.2. INFLUENZA AVIAR**

### **2.2.1. Definición**

La OIE (2009), se refiere a la influenza aviar como una enfermedad infecciosa viral altamente contagiosa causada por algunos de los diversos virus tipo A miembro de la familia *Orthomyxoviridae*. Extensos estudios epidemiológicos han revelado que el virus de influenza A puede infectar a un gran rango de huéspedes, incluyendo diversos tipos de aves, seres humanos, cerdos, caballos, perros, gatos y otros mamíferos (Rimondi, A. 2014).

### **2.2.2. Historia**

La influenza aviar se reportó por primera vez en 1878 por el científico italiano Edoardo Perroncito, fue reportada como plaga de las aves de corral o peste aviar, confundiendo con una forma septicémica aguda de Cólera Aviar Buscaglia (2004). A continuación fue caracterizada patológicamente por Rivolto y Dilprato en 1880, y en 1901 Centani y Savonuzzi determinaron que la causa del problema era un agente filtrable (Swayne y Halvorson, 2003)

Anteriormente, en el año de 1941 Hirst descubrió la capacidad hemaglutinante de los virus de Influenza y en 1943 Lush introdujo la prueba de la Inhibición de la Hemaglutinación para la diferenciación de los virus de la plaga aviar y de la enfermedad de Newcastle aviar. Rojas y Moreira (2002), señalan que en Sudamérica, la primera vez que ingresó una cepa de alta patogenicidad fue en Chile en el año 2002 generado por el subtipo H7N3. En menos de tres meses fueron controlados los dos focos desarrollados, evitándose la difusión de la enfermedad al resto del país. Sólo seis meses después se declaró oficialmente a Chile libre de la enfermedad de influenza aviar.

La OIE (2014) menciona que se han presentado varios casos de Influenza Aviar en el año 2014, en diferentes países del mundo, principalmente China y Vietnam, datos que se van actualizando a medida que la OIE recibe información sobre la existencia de nuevos focos. En América se han reportado brotes de influenza aviar en aves domésticas en México, estos casos han sido resueltos. Mientras que no es así en China y Corea, en donde existen brotes no resueltos, siendo el continente asiático el que más casos de brotes de influenza aviar reporta.

### **2.2.3. Etiología**

La influenza aviar es producida por los virus tipo A de la familia Orthomixoviridae, género Influenzavirus A OIE (2009). Estos virus son también llamados virus de la Gripe A. Según la OIE (2009) en este género de Influenza aviar también están incluidos los virus de Influenza humana, equina, porcina y canina, todos estrechamente relacionados. Los Influenza virus B y C (o tipo B y C respectivamente) se han encontrado en humanos y raras

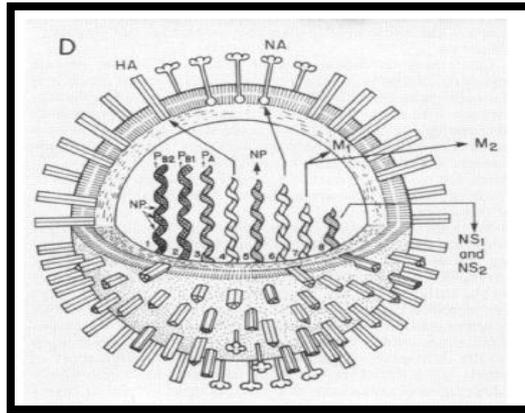
veces en focas y porcinos, pero no han sido reportados en aves (Swayne y Halvorson, 2003).

#### **2.2.4. Clasificación y Características Morfológicas**

La enfermedad de influenza aviar está causada por un virus perteneciente a la familia Orthomyxoviridae, y se clasifica en tres géneros: Influenzavirus A, B y C (OIE, 2008). Los virus de la influenza tipo A son los únicos ortomyxovirus conocidos que afectan a las aves; no obstante, pueden también infectar a otras especies como cerdos, caballos, ballenas, lobos de mar y otros incluyendo los humanos. Mientras que los tipos B y C solo infectan a los humanos (Herrero, 2008).

El virus de IA se presenta estructuralmente como virus esféricos, isométricos y presentan una envoltura lipoproteica. Presentan un tamaño medio de entre 80 y 120 nm de diámetro. La superficie cuenta con glicoproteínas de membrana, denominadas hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N), de las que se conocen 18 H (H1-H18) y 11 N (N1-N11) diferentes Jurado Tarifa, E. (2016). Estas glicoproteínas intervienen en la adherencia e invasión celular en el hospedador, y actúan como los principales antígenos inductores de anticuerpos neutralizantes. Debido a las múltiples combinaciones posibles entre las diferentes H y N, existen múltiples subtipos antigénicos.

El genoma se encuentra en el interior de la cápsida vírica y está compuesto por 8 segmentos de ARN, de cadena sencilla y polaridad negativa. Los virus de IA se caracterizan por su variabilidad genética, producido principalmente por dos mecanismos: una elevada tasa de mutaciones puntuales, y la capacidad de recombinar los segmentos del genoma dando lugar a nuevos subtipos durante las coinfecciones. Las H y N son las glicoproteínas que sufren mayor variación antigénica. Los resultados de nuevas combinaciones genéticas pueden llegar a modificar las características del virus, pudiendo incrementar su virulencia e incluso la capacidad para infectar nuevas especies hospedadoras (Jurado Tarifa, E. 2016).



**Figura 2.** Representación esquemática del virus de IA. En él se puede observar las dos principales proteínas de superficie, la hemaglutinina (HA) la cual es predominante y en menor proporción la neuraminidasa (NA), también se puede observar dentro de la bicapa lipídica los ocho segmentos de RNA (Hilleman M. 2002)

### 2.2.5. Epidemiología

El virus de influenza puede estar presente en muchas aves silvestres sin presentar la enfermedad siendo estas aves reservorios virales asintomáticos. La principal fuente de transmisión es el animal infectado que elimina el virus por las heces tomando en cuenta que 1 gramo de estiércol contaminado puede contener suficiente virus como para infectar a 1 millón de aves. El contagio se puede dar por contacto directo de los animales, o bien se produce de manera inmediata a través de vectores. La transmisión vertical no tiene mucha importancia (Cardona, C. 2003).

Las aves domésticas son las más sensibles a padecer de influenza aviar en especial las gallinas y los pavos, mientras que con menor frecuencia los patos. Cuando esta enfermedad es altamente patógena puede afectar rápidamente a las aves de corral sin ninguna señal de infección. Una vez establecida, se puede diseminar rápidamente de parvada en parvada (Cardona, C. 2003).

Las cepas aviarias en algunas ocasiones han infectado mamíferos, como los brotes producidos en focas, en las aguas del noreste de los Estados Unidos en el invierno de 1979-1980 y en años posteriores, que produjeron una elevada mortalidad. Además existe evidencia de que los pavos se pueden infectar con virus de cerdos (Cardona, C. 2003).

### **2.2.6. Excreción Viral**

Las aves infectadas por este virus de influenza aviar empiezan a secretar el virus antes de la aparición de signos clínicos y puede durar más que la enfermedad aparente Swayne y Halvorson, (2008). Según la OIE (2009), la excreción viral puede comenzar 1 ó 2 días después de la infección. Luego de la infección, los anticuerpos específicos en suero pueden ser detectados a los 5-8 días post infección (dpi), con un pico máximo a los 10-14 días. La eliminación y excreción del virus en el hospedador infectado se realiza a través de saliva, secreciones nasales y heces. En patos, se empieza a excretar los virus después de por vía cloacal después del primer día y por vía oral después del segundo día. La cantidad de partículas víricas eliminadas varía según la especie de ave, por lo tanto los reservorios naturales eliminan una menor cantidad de partículas víricas en comparación con otras especies de aves, como gorriones o gallinas.

Swayne y Halvorson (2008), han realizado estudios experimentales demostrando que el virus de IA se replica y se excreta de pollos individuales hasta un máximo de 36 días y pavos llega hasta 72 días. Sin embargo, el virus IA se puede mantener durante periodos de tiempo mucho más largos, por lo cual, cuando una parvada se ha infectado por el virus IA, se debe considerar como reservorio hasta que las aves sean eliminadas y la granja se limpie y desinfecte, sea nuevamente repoblada y no se hallen valores de IA.

### **2.2.7. Persistencia Viral**

La supervivencia del virus de influenza aviar en el medio ambiente es mínima y se inactivan rápidamente por los rayos ultravioletas. Es poco resistente a altas temperaturas, es por ello que los brotes son más frecuentes en invierno por las bajas temperaturas y humedad Buscaglia (2004), pudiendo inactivarse al aplicarle 56°C/3 horas o 60°C/30 minutos. Los virus de IA pueden sobrevivir en las heces por al menos 35 días a 4°C (Cordero, 2014).

Los virus de influenza aviar son relativamente estables con un pH comprendido entre 6 y 8. Por lo tanto los virus son sensibles a pH ácidos, además son sensibles a los desinfectantes viricidas tales como agentes oxidantes y

disolventes lipídicos, también se inactivan por la acción de la formalina y compuestos de yodo (SENASA-Argentina, 2009).

La Organización Mundial de Salud (OMS), menciona que el virus de IA es sensible al calor (70°C) por lo cual se descarta la transmisión por carne de ave o sus productos si están debidamente cocinados. Por el contrario, el virus es estable a bajas temperaturas llegando a sobrevivir hasta un mes en la carne congelada o refrigerada. Por eso, es necesaria una buena higiene al preparar alimentos con carne de ave provenientes de lugares donde han ocurrido brotes de IAAP, ya que sería fácil que se diera una contaminación cruzada entre órganos afectados con el virus y los no afectados (Cordero, 2014).

Las temperaturas altas eliminan los virus de IA, por tanto los brotes de la enfermedad se producen más en invierno Buscaglia (2004). Algunos datos implican bajas humedades relativas (20 - 35%) producidas por calentamiento interno y temperaturas frías (5°C) como se produce en invierno a favor de la dispersión de los virus (Lowen *et al.*, 2007).

#### **2.2.8. Transmisión**

La transmisión por medio de las aves silvestres, en especial aves acuáticas han sido puntos clave para la transmisión e infección para las aves domésticas por la industria avícola, ya que aunque estén clínicamente normales pueden introducir el virus en las granjas avícolas (Milton y Franson, 1999).

La entrada del virus de IA a las explotaciones avícolas se produce por:

- Traslado de aves, personas, vehículos, equipos, piensos y jaulas contaminados.
- Movimiento de aves acuáticas y marinas.
- Transporte de huevos (el virus puede estar en la superficie).
- Infección de pollitos en la planta de incubación por huevos rotos contaminados.

Dentro de la explotación, la transmisión se produce por:

- Contacto directo entre aves sanas y enfermas (secreciones, especialmente heces).

- Contacto con materiales, piensos, agua, equipo y ropa contaminados.
- Vía aerógena.

La dispersión entre países se produce por el tráfico internacional de aves vivas y por las aves migratorias (su posible papel no está claro).

### **2.2.9. Signos Clínicos**

Los síntomas clínicos que presentan las aves infectadas por el virus de IA varían dependiendo del subtipo implicado, la cepa del virus, la dosis, la especie afectada, la edad y los factores ambientales. En las aves, el periodo de incubación medio es de 3 a 5 dpi, con un máximo de 21 dpi. En las aves inoculadas por vía intravenosa tiene una duración de pocas horas y 24 horas en los pollos inoculados por vía intranasal (Swayne y Halvorson, 2008).

Buscaglia, (2004) y Martin et al., (2007) mencionan que los síntomas en aves domésticas principalmente en pollos y pavos, los virus de IA con alta, mediana y baja patogenicidad puede presentar los siguientes signos clínicos:

- Morbilidad y mortalidad del 0 al 100% (dentro de las 24 a 48 horas ó hasta una semana) sobretodo en los cuadros altamente patógenos.
- Disminución en la producción de huevos (perdida de la pigmentación, huevos deformes ó fragilidad de la cáscara).
- Problemas respiratorios (sinusitis, tos, estornudos, estertores y lagrimeo).
- Edema peri orbital, de la cara, cresta, y barbillas cianóticas (sobre todo en pavos).
- Depresión (hacinamiento, inactividad).
- Anorexia y emaciación.
- Desordenes nerviosos.
- Diarreas (verdosas ó blancas en algunas aves).
- Equimosis en zancas y patas.

### **2.2.10. Lesiones Macroscópicas**

Las lesiones macroscópicas se presentan dependiendo el grado de patogenicidad del virus. En pavos se presenta especialmente enteritis catarral

fibrinosa a nivel de ciego, intestino o ambos sitios Calnek, B. (2000). La patogenicidad de los virus determina su ubicación en el organismo (Buscaglia, 2004).

Cuando la afección se presenta en su forma altamente patógena, las lesiones macroscópicas son:

- Deshidratación.
- Severa congestión de la musculatura.
- Hinchazón de la cabeza y cresta.
- Hemorragias en tarsos patas y cabeza.
- Necrosis de cresta y barbas.
- Petequias en órganos viscerales.

Cuando la enfermedad es producida por cepas de baja patogenicidad se puede observar:

- Inflamación catarral, fibrinosa, serofibrinosa, mucopurulenta o caseosa a nivel senos.
- Engrosamiento y exudado fibrinoso o caseoso en sacos aéreos.
- Peritonitis catarral fibrinosa y peritonitis por ruptura de yema.
- Exudado en oviductos de aves ponedoras

#### **2.2.11. Diagnóstico Clínico**

Para realizar un diagnóstico clínico se puede realizar tomando en cuenta los signos clínicos, lesiones macroscópicas pero no es un diagnóstico preciso. Dado que la sintomatología producida por los virus de IA puede variar dependiendo de los factores anteriormente mencionados, los signos clínicos no pueden considerarse patognomónicos. Por este motivo, la sospecha de un brote de IA debe ser confirmada mediante el análisis de laboratorio (OIE 2015).

#### **2.2.12. Diagnóstico de Laboratorio**

Para realizar el análisis en laboratorio es muy importante tener en cuenta el transporte de las muestras, para mantener las muestras en buen estado se utiliza los UTM Medio de Transporte Universal.

El Medio de Transporte Universal (UTM), está diseñado para la recolección, transporte, mantenimiento y almacenamiento en congelación (-70°C) de virus como el de la gripe H1N1, Chlamydia, Mycoplasmas y Ureaplasmas. Además es eficiente para pruebas rápidas de antígeno, DFA, y ensayos moleculares. Es un medio estable a temperatura ambiente. Garantiza una rápida liberación y dispersión de la muestra (partículas virales) durante la agitación debido a la presencia de tres perlas de vidrio en cada tubo.

#### **2.2.12.1. Aislamiento del virus de la influenza aviar**

El aislamiento consiste en inocular extractos de órganos (pulmón, tráquea, intestino, cerebro) y heces de aves muertas o hisopos de cloaca y/o tráquea de animales vivos en huevos embrionados de pollo de 9 a 11 días, o bien en células fibroblásticas de cultivo primario derivadas de embrión de pollo. Estos embriones se deben obtener de gallinas SPF (libres de patógenos específicos). Las muestras de aves vivas deben incluir hisopos orofaríngeos y cloacales (OIE, 2015).

Primeramente se deben revisar los huevos embrionados en cámara oscura con el ovoscopio, para certificar la edad, la viabilidad y la localización del embrión, esto se debe hacer antes de inocular los embriones. Tras delimitar la cámara de aire se define el punto de inoculación, que debe estar localizado a una distancia aproximada de 3 mm por encima de la cámara de aire y en el extremo opuesto a donde se encuentra el embrión. Los embriones SPF, no menos de cuatro por muestra, se inoculan en la cavidad alantoidea y se incuban a 35-37° C durante seis días. Los embriones que mueran en las primeras 24 horas no se tomarán en consideración siempre y cuando se demuestre que el líquido alantoideo no presenta actividad hemaglutinante. Generalmente el virus de la IA mata a los embriones entre los dos y cuatro días postinoculación, aunque la cepa H5N1 altamente patógena puede matar al embrión en menos de 20 horas.

Se recoge el líquido alantoideo de todos los embriones muertos y de los que queden hasta el término del periodo de incubación, para la realización de la prueba de hemaglutinación (HA). Si no se detecta HA se debe repetir el

procedimiento anterior utilizando fluido alantoideo sin diluir como inóculo. El fluido amnio-alantoideo de los embriones infectados por el virus de IA tiene una concentración suficiente de hemaglutininas para producir la aglutinación de eritrocitos de pollo. Esta propiedad del virus permite en forma fácil, rápida y sencilla identificarlo mediante la hemaglutinación en placa. En todos los casos donde se demuestre la presencia de hemaglutininas en embriones inoculados, se debe descartar la presencia de otros agentes hemaglutinantes como los paramyxovirus aviares.

Al encontrar resultados positivos en una prueba HA del fluido alantoideo, existen varias técnicas que permiten confirmar la presencia de un virus Influenza A, inmunodifusión en gel de agar (AGID), ELISA o técnicas moleculares (Comisión de las Comunidades Europeas, 2006, Con sello de la Unión Europea, 2005, Oficina Internacional de Epizootias, 2005).

### **2.2.12.2. Diagnostico serológico**

#### **a. Pruebas de hemaglutinación y de inhibición de la hemaglutinación**

Existen diferentes protocolos para realizar las pruebas HA y HI. Capua *et al.*, (2003) recomiendan el siguiente protocolo utilizando ejemplos que se basan en el uso de placas de micropocillos de plástico con el fondo en V, y en las que el volumen final para ambas pruebas es de 0,075 ml. Los reactivos necesarios para realizar estas pruebas son PBS isotónico 0,01 M, pH 7,0–7,2, y eritrocitos obtenidos a partir de un mínimo de tres pollos SPF o SAN y combinados en un volumen igual de solución de Alsever. Las células deben lavarse tres veces en PBS antes de emplearse como una suspensión al 1% (concentrado de células v/v). Deben utilizarse en cada prueba antígenos y antisueros control positivos y negativos, según corresponda.

- **Prueba de la Hemaglutinación**

- i. Se depositan 0,025 ml de PBS en cada pocillo de una placa de microtitulación de plástico con fondo en V.
- ii. Se depositan 0,025 ml de la suspensión vírica (es decir, líquido alantoideo infectivo) en el primer pocillo. Para una determinación precisa del contenido de HA, esta prueba debe realizarse a partir de un intervalo

estrecho de una serie inicial de diluciones, es decir, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, etc.

- iii. Se preparan y depositan en toda la placa diluciones a la mitad de volúmenes de 0,025 ml de la suspensión vírica.
- iv. Se depositan 0,025 ml más de PBS en cada pocillo.
- v. Se depositan 0,025 ml de eritrocitos de pollo al 1% (v/v) en cada pocillo.
- vi. Se mezcla cuidadosamente sellando la placa con cinta y se dejan sedimentar los eritrocitos durante 40 minutos a temperatura ambiente, es decir, a unos 20°C, o durante 60 minutos a 4°C si la temperatura ambiente es elevada; en este tiempo los eritrocitos control deben haber formado un botón nítido.
- vii. La HA se determina inclinando la placa y observando la presencia o ausencia de arrastre de los eritrocitos con forma de gota. La titulación debe leerse a la dilución más alta que da lugar a una HA completa (ausencia de arrastre); esto representa 1 unidad HA (UHA) y puede calcularse de manera precisa a partir del intervalo inicial de diluciones.

### **2.2.12.3. Prueba de inhibición de la hemaglutinación**

- i. Se depositan 0,025 ml de PBS en cada pocillo de una placa de microtitulación de plástico con fondo en V.
- ii. Se depositan 0,025 ml de suero en el primer pocillo de la placa.
- iii. Se preparan diluciones a la mitad de volúmenes de 0,025 ml del suero en toda la placa.
- iv. Se añaden 4 UHA de virus/antígeno en volúmenes de 0,025 ml a cada pocillo y se dejan durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente (es decir, a unos 20°C) o 60 minutos a 4°C.
- v. Se añaden 0,025 ml de eritrocitos de pollo al 1% (v/v) en cada pocillo y se mezcla cuidadosamente, se dejan sedimentar los eritrocitos durante unos 40 minutos a temperatura ambiente, es decir, a unos 20°C, o durante 60 minutos a 4°C si la temperatura ambiente es elevada; en este tiempo los eritrocitos control deben haber formado un botón nítido.
- vi. El título de HI es la dilución más alta de suero que ocasiona la inhibición completa de 4 UHA de antígeno. La aglutinación se valora inclinando las

placas. Solamente debe considerarse que presentan inhibición aquellos pocillos en los que los eritrocitos se arrastran en la misma proporción que los pocillos control (que contienen solo 0,025 ml de eritrocitos y 0,05 ml de PBS).

- vii. La validez de los resultados debe evaluarse frente a un suero control negativo, el cual no debe producir un título  $>1/4$  ( $>2^2$  o  $>\log_2 2$  expresado como el inverso), y un suero control positivo en el que el título debe encontrarse dentro de una dilución del título conocido.

Esta prueba es utilizada especialmente para comprobar si los anticuerpos que indican infecciones por virus de influenza A son de subtipo H5 o H7. Los títulos resultados de las pruebas HI pueden considerarse positivos si existe inhibición a una dilución del suero de  $1/16$  ( $2^4$  o  $\log_2 24$  expresado como el inverso) o más alta frente a 4UHA de antígeno. En cada lote de pruebas de HI debe incluirse un control del virus y del antígeno, suero control positivo y eritrocitos control.

#### **b. Enzimoimmunoanálisis (ELISA)**

Este método de diagnóstico nos sirve para detectar anticuerpos contra las proteínas virales de la nucleocápside (NP y M). Existen varios kits comerciales de ELISA dispuestos a la detección de anticuerpos específicos contra el virus de IA en suero, plasma y yema de huevo de pollos. En caso de obtener resultados positivos se recomienda realizar pruebas de Inmunodifusión en Agar Gel, para una mayor seguridad. Una de las ventajas de este tipo de pruebas es que se puede analizar una gran cantidad de muestras en poco tiempo, mientras que sus desventajas es su baja sensibilidad y que no se consigue el subtipo del virus (OIE, 2009).

#### **2.13. Tratamiento**

No existe un tratamiento específico para esta enfermedad de IA. Cuando se confirma un foco de la enfermedad, se sacrifican y destruyen todas las aves infectadas y expuestas, al igual la desinfección debe realizar muy minuciosamente.

## 2.14. Prevención y Control

La bioseguridad es fundamental para prevenir todo tipo de enfermedades. También es importante poner en práctica sistemas de detección y alertas precoces y medidas de prevención como una estrategia eficaz frente a la influenza aviar.

En diferentes países han adoptado programas de vigilancia y lucha y sistemas de detección y alerta precoces durante los últimos años, dentro de estas tenemos para prevenir la introducción en las explotaciones:

- Evitar el contacto entre aves de corral y aves salvajes.
- Controlar el acceso del personal y los equipos.
- Limpieza y desinfección de locales y equipos.
- No introducir aves de estatus sanitario desconocido.
- Declarar los casos de enfermedad y muerte de las aves.
- Eliminar adecuadamente el estiércol y las aves de corral muertas.

Ante un foco:

- Sacrificio y destrucción de todos los animales infectados y expuestos (y sus productos).
- Vigilancia de aves potencialmente infectadas o expuestas (y sus desplazamientos).
- Estricta cuarentena.
- Control de vehículos.
- Descontaminación de establecimientos infectados.
- Esperar al menos 21 días antes de repoblar.

Otra medida de prevención es la vacunación que puede ser eficaz como medida de emergencia ante un foco o como medida de rutina en una zona endémica, para reducir la incidencia o la gravedad de la enfermedad.

Existen las llamadas “zonas de riesgo” que se establecen basadas en la abundancia de aves silvestres o de pasos migratorios, densidad de explotaciones de aves domésticas, dificultades para lograr el correcto aislamiento entre ambas, etc., donde las medidas preventivas se realizan con mayor rigor, y zonas de especial vigilancia, sometidas a medidas muy similares aunque de menor intensidad (Programa Vigilancia IA, 2016).

## 2.15. TRABAJOS RELACIONADOS SOBRE EL TEMA

**Thomazelli, et al., (2012)** realizó la Vigilancia Molecular del Virus de la Enfermedad de Newcastle en Aves Domésticas y Silvestres de la Costa Nororiental y Bioma Amazónico De Brasil en la que indica: Brasil es uno de los países más grandes del mundo con una rica diversidad de vida silvestre, incluyendo aves silvestres residentes y migratorias, que pueden ser reservorios naturales del virus de la enfermedad de Newcastle (NC). Debido a que Brasil es un importante exportador mundial de carne de pollo, la aparición de tal enfermedad puede tener un enorme impacto negativo no sólo en la economía debido a restricciones comerciales y embargos, sino también a la calidad de vida de la población. Se tomaron muestras de 1.022 aves domésticas y silvestres asintomáticas de la costa brasileña y de la región amazónica utilizando hisopos traqueales/cloacales y analizados por RT-qPCR. Los resultados mostraron que 7 (0,7%) aves fueron positivas para el virus de NC. A continuación, las muestras positivas se aislaron en huevos de pollo embrionados y sus genes de proteína de matriz se secuenciaron parcialmente, revelando un virus de NC con baja patogenicidad. Este estudio confirma el mantenimiento del estado libre de virus de Newcastle velogénico de Brasil.

**Valladares Gago, J. G. (2015).** “Detección del virus de influenza aviar en patos domésticos de crianza familiar en las Provincias de Huaral y Huaura” nos menciona que: Influenza Aviar impacta en la salud pública debido a que representa un potencial riesgo zoonótico. Además, es una amenaza para la industria avícola debido a que puede causar una elevada morbilidad y mortalidad en las aves afectando la economía y el comercio. El virus de Influenza Aviar ha sido aislado de una amplia variedad de especies aviares como por ejemplo los patos domésticos que pueden ser posibles portadores silenciosos del virus. El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia del virus de Influenza Aviar en patos domésticos de crianza familiar en las provincias de Huaral y Huaura. Se colectaron 600 muestras de hisopado cloacal de patos domésticos de traspatio sin distinción de sexo o edad, las cuales fueron analizadas mediante aislamiento viral en huevos embrionados de pollo SPF. La presencia del virus de la Influenza Aviar fue determinada por la

actividad hemaglutinante del fluido alantoideo, y confirmada mediante un kit de diagnóstico rápido, que utiliza anticuerpos monoclonales. El 100% (600/600) de las muestras analizadas fueron negativas al virus de Influenza Aviar en este estudio con una prevalencia determinística de 0%. Se concluyó que las aves incluidas en el muestreo no se encuentran infectadas con el virus de Influenza Aviar.

**Buendía Endara, R. A. (2015).** Realizó un trabajo de investigación en la que consistía en la Detección del virus de la enfermedad de Newcastle en patos criollos (*Cairina moschata*) de traspatio. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia del virus de la Enfermedad de Newcastle (PMAV-1) en patos de traspatio en dos provincias del departamento de Lima (Huaral y Huaura), en el departamento de Lima. Seiscientas muestras de hisopado cloacal de patos de traspatio fueron colectadas desde febrero hasta julio del 2012. Dichas muestras se analizaron mediante aislamiento viral en huevos embrionados SPF. La presencia del virus de Newcastle fue determinada por la actividad hemaglutinante del fluido alantoideo, y confirmada mediante la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación utilizando anticuerpos específicos. El total de las muestras analizadas en este estudio fueron negativas a la presencia del virus de la Enfermedad de Newcastle. La técnica de evaluación de riesgo mediante simulación de Monte Carlo (programa @Risk) indico que la probabilidad de encontrar el virus de la enfermedad de NC en patos de traspatio fue de 0.1% con un intervalo de confianza de 0.004 a 0.6%. La prevalencia encontrada fue muy baja para considerar a estas aves como posible fuente de infección hacia las aves domésticas.

**Armijos (2014) y Guaya (2015).** Realizaron trabajos sobre el aislamiento del virus de la enfermedad de Newcastle en gallinas domesticas en el Cantón Zapotillo Provincia de Loja. En los cuales se tomaron muestras de hisopados cloacales distribuidos estas muestras procedieron de aves que presentaron signos clínicos de la enfermedad, pero la mayor cantidad de muestras se obtuvieron de aves sanas, las cuales fueron utilizadas para realizar aislamiento viral en huevos embrionados de 9 a 11 días, se utilizó el fluido alantoideo para comprobar la presencia del virus de los huevos inoculados a través de la prueba de Hemoaglutinación y confirmada mediante la técnica de RT-PCR la

cuál además de determinar la presencia del virus, puede identificar su patogenicidad, utilizando primers específicos que reconocen el sitio de corte de la proteína F. Los resultados obtenidos fueron positivos a la Enfermedad de Newcastle

**Buscaglia, C. (2004).** En su artículo publicado sobre Influenza Aviar menciona que: La influenza aviar (IA) de alta patogenicidad (IA AP) es extremadamente contagiosa, multisistémica, conduce a elevada mortandad y es causada por algunos H5 y H7 subtipos del tipo A del virus de influenza. Es una enfermedad de la lista A de la OIE (Office International des Epizoties) y no se conoce un reservorio del virus en aves silvestres como en los virus de baja patogenicidad. La prueba de inmunodifusión en agar gel se convirtió el standard internacional para el diagnóstico serológico y vigilancia. En 1972, se demostró que el principal reservorio y el huésped natural para virus de Influenza aviar moderadamente patógena o baja patogenicidad (IA MP) eran aves acuáticas silvestres del orden Anseriformes. En 1979, el clivaje de la hemaglutinina se identificó como el mayor determinante de la virulencia de virus de IAAP. La primera vez que se comprobó que la IA, produjo muertes humanas, fue en 1997 en Hong Kong lo que la convierte no solo en una amenaza para la economía y bienestar animal sino más importante aún, para la salud pública. En nuestro país la IA es considerada una enfermedad exótica. La manera que se manejan las explotaciones en Argentina alejadas de lagunas con aves silvestres y/o migratorias y de criaderos de pavos y la escasa presencia de mercados de aves vivas, hace casi imposible un brote de IA por lo que es imprescindible continuar con excelentes medidas de bioseguridad y el control por parte de las autoridades.

**Guevara Oquendo, V. H., & Salazar Medina, E. F. (2013).** El trabajo realizado fue sobre "Determinación de anticuerpos séricos contra Newcastle en aves de pelea de veinte criaderos ubicados en la Ciudad de Riobamba" en el cual se evalúan los resultados de la prueba ELISA para la enfermedad de Newcastle, resultados correspondientes a muestras de suero sanguíneo de 98 aves de pelea adultas, en veinte criaderos de la ciudad de Riobamba. Se identificaron títulos de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle y se realizó una

caracterización de los predios. Para realizar el estudio de investigación se utilizó un muestreo aleatorio estratificado de una población en estudio de 130 aves de pelea adultas, siendo el tamaño de la muestra correspondiente a 98 casos. Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena braquial del ala. Se utilizaron técnicas de procesamiento estadísticas descriptivas mediante cuadros y tablas. Se realizó una comparación de títulos de anticuerpos por género y por características de los criaderos en cuanto a ubicación, manejo e infraestructura, de lo cual se observa que todas las aves muestreadas presentan anticuerpos frente a la enfermedad de Newcastle, un criadero implementa vacunación y que las diferentes características de los criaderos influyen en la mayor o menor presentación de anticuerpos.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. MATERIALES**

#### **3.1.1. Materiales de Campo**

- Mapa ArcGIS con los puntos de muestreo
- 300 muestras de heces aves traspatio incluidas las de riña
- Tubos UTM (medio de transporte universal)
- Hisopos
- Jeringas
- Guantes de látex descartables
- Cooler de transporte de muestras
- Libreta de campo

#### **3.1.2. Materiales de Laboratorio**

- Cajas Petri
- Gradillas
- Tubos de ensayo
- Mechero
- Cabina de bioseguridad
- Placa de 96 wells fondo en U limpias
- Pipetas pasteur plástica
- Reactivos
- Solución de antibióticos (Penicilina y estreptomina)
- Muestras fecales
- Huevos embrionados SPF
- Cámara de flujo laminar tipo II
- Congeladora menos 80 °C
- Material descartable (guantes y mascarillas)
- Mandil
- Tips amarillos (hasta 200 µl)
- Tips azules (hasta 1000 µl)
- Agujas hipodérmicas

- Jeringas de 5ml
- Láminas portaobjetos
- Cubetas descartables
- Centrifuga
- Ovoscopio
- Microscopio
- Incubadora
- Micropipeta hasta 200µl (tolerancia máxima admitida: 5ul)
- Micropipeta hasta 40µl (tolerancia máxima admitida: 0.4ul)
- Micropipeta hasta 1000 µl (tolerancia máxima admitida: 10ul)
- Registro de laboratorio

### **3.1.3. Materiales de Oficina**

- Computadora
- Internet
- Flash memory
- Impresora
- Esferográfico
- Lápiz
- Hojas Inen A4
- Marcadores
- Carpetas
- Cámara fotográfica
- Calculadora
- Cuaderno
- Tijeras

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Delimitación del Área de Estudio**

La presente investigación fue en la Provincia de Loja, ubicada entre las latitudes Sur: 03°19'49" y 04°45'00", constituye la provincia más austral del

Ecuador. Tiene una superficie aproximada de 10.790 km<sup>2</sup> equivalente al 4% de la superficie del país, una altitud media de 2060 msnm y temperatura media de 18 °C.

La provincia de Loja limita con las provincias de El Oro al oeste; con la provincia de Zamora Chinchipe al este; con la provincia del Azuay al norte; y al sur con la República del Perú (Wikipedia, 2016).



Figura 3. Provincia de Loja (Villavicencio, 2009)

### 3.2.2. Tamaño y Selección de la Muestra

Las muestras fueron tomadas en la Provincia de Loja, de preferencia en las zonas donde existe avicultura comercial y cerca de humedales, se utilizó como guía el Censo Nacional Agropecuario realizado en el año 2012.

➤ **Tamaño de la muestra:**

El tamaño de la muestra para una unidad de inferencia se determinó al aplicar la fórmula de prevalencia límite (González, 1986). La prevalencia límite implica que la probabilidad de encontrar al menos un positivo es igual a  $\alpha$  si es que la prevalencia de la unidad muestral es igual o mayor que la prevalencia límite. Para el caso, se decidió emplear 1% para influenza aviar, toda vez que la

prevalencia de NC en la zona es igual a 9,85 % Villacís et al. (2015). Se determinó un tamaño muestral mínimo para una unidad muestral de al menos 298 muestras (n = 298). La fórmula usada fue:

$$n = \frac{\text{Log } \alpha}{\text{Log } (1-p)}$$

Dónde:

n = número de muestras

p=prevalencia límite (1%)

q=1-p (1-1%=0.99)

$\alpha$ = confianza (0.05)

$$n = \frac{\log \alpha}{\log (1 - p)}$$

$$n = \frac{\log 0,05}{\log (0.99)} = 298 (300)$$

### 3.2.3. VARIABLES

- Presencia del virus de la enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar a través del aislamiento viral.
- Determinar la patogenicidad del virus
- Caracterizar los patotipos

### 3.2.4. RECOPIACIÓN DE LA INFORMACIÓN

Para la ejecución de la presente investigación se realizó un trabajo de campo apoyado de un mapa georreferenciado de la Provincia de Loja, y un trabajo de laboratorio para realizar los análisis de las muestras.

#### 3.2.4.1. Trabajo de Campo

#### 3.2.4.2. Procedimiento para generar los puntos de muestreo

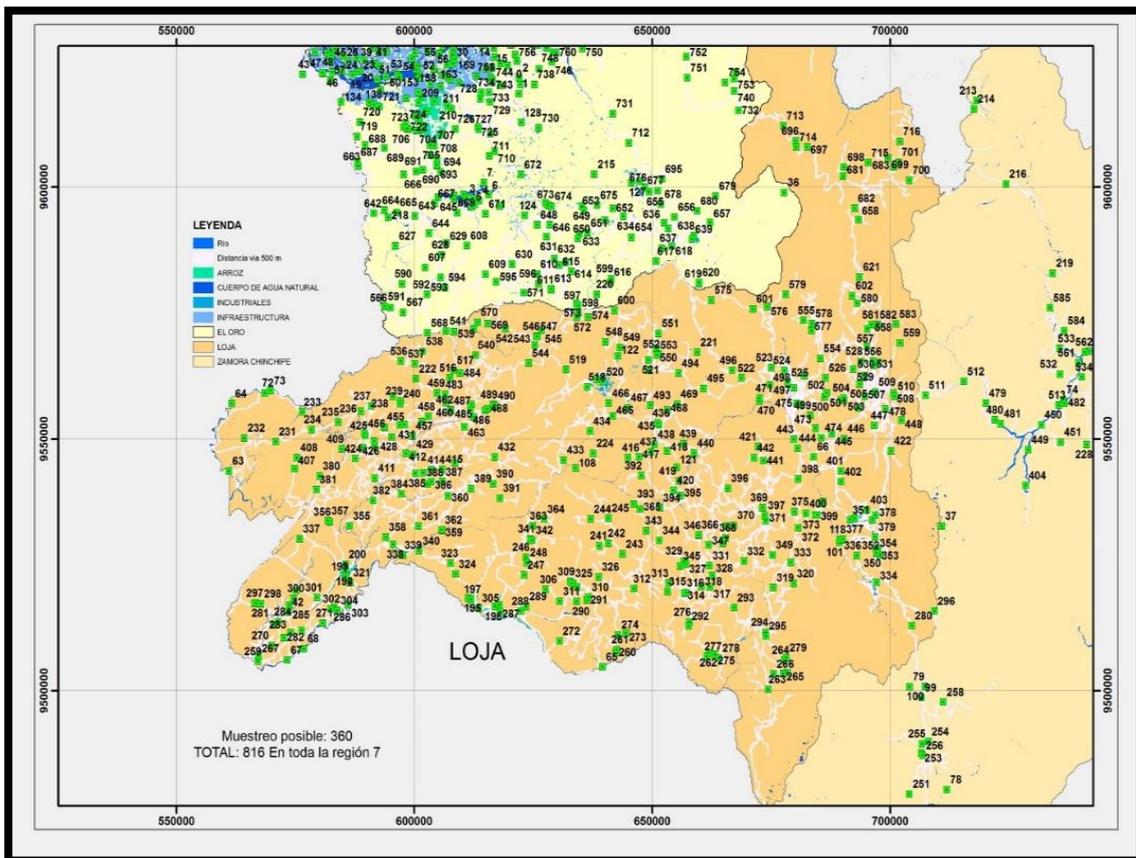
Para la obtención de los puntos de muestreo se utilizó un software académico ArcGIS el cual es un Sistema de Información Geográfica, que permitió ingresar

datos georreferenciados logrando representar el área de interés en forma de un mapa con su respectiva simbología. Cabe recalcar que en este sistema podemos integrar la parte gráfica con su base de datos (atributos) y de esta forma podremos realizar consultas, y generar información nueva a partir de estas consultas. ArcGIS cuenta con varias herramientas pero para nuestro estudio se utilizó la herramienta ArcMap.

### 3.2.4.3. Resultados del Sistema de Información Geográfica ArcGIS

Una vez aplicado el sistema ArcGIS y utilizando sus respectivas herramientas se obtuvo un total de 6150 sitios de muestreo en toda la zona 7 que consta de Loja, El Oro, y Zamora Chinchipe. Realizando la operación de spatial join herramienta de ArcMap quedaron alrededor de 816 puntos posibles que cumplen las condiciones ingresadas en el programa como son las vías de acceso, ubicación de humedales y ubicación de granjas avícolas en la Región 7. En la provincia de Loja se obtuvieron 318 puntos de muestreo.

Figura 4. Mapa de distribución de sitios de muestreo en la Provincia de Loja



Fuente: El Autor (2017)



En el siguiente cuadro nos indica el total de puntos que se debe muestrear por zona, llegando a un total de muestras que son 300.

**Cuadro 1.** Puntos de muestreo por zona

<b>ZONA</b>	<b>Número de puntos por zona</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Total puntos de muestreo</b>	<b>Muestras a recolectar por punto</b>	<b>Total de muestras</b>
<b>Zona 1</b>	89	27.98 %	24,92	2,79	70
<b>Zona 2</b>	118	37.10%	43,78	2,79	122
<b>Zona 3</b>	111	34.90	38,74	2,79	108
<b>TOTAL</b>	318	100%	107,44		300

Fuente: Investigación directa  
Elaboración: El Autor (2017)

#### **3.2.4.5. Técnicas de Recolección de las Muestras de Heces**

Se realizaron visitas a las viviendas donde se encontraban las aves de traspatio a partir de las 8 am hasta las 5 pm, con el fin de poder muestrear la mayor cantidad de viviendas. Una vez que se nos permitía el ingreso al predio, se procedía a la captura al azar del ave o se capturaban aves con síntomas de enfermedad e inmediatamente se tomaba la muestra.

Para la recolección, transporte, mantenimiento y almacenamiento de las muestras se adquirió un medio de transporte universal UTM, el cual cuenta con una formulación adicionada con antibióticos para impedir el crecimiento de bacterias y flora fúngica en las muestras tomadas y solamente mantener viables las células que contiene el virus. En este UTM viene incorporado un hisopo de recogida de muestras estériles.

La formulación de Copan (UTM) es la siguiente:

- Sales balanceadas de Hank
- Albúmina de suero bovino
- L-cisteína
- Gelatina

- Sacarosa
- Ácido L-glutámico
- Tampón HEPES
- Vancomicina
- Anfotericina B
- Colistin
- Phenol Red

La toma de muestras se la realizó directamente de la cloaca de las aves para evitar que se contaminen con elementos extraños que puedan impedir su interpretación. De no lograr extraerlas directamente del recto, se tomaron las materias fecales logradas al momento de la deposición o en caso extremo las materias frescas encontradas en el piso, libres de cuerpos extraños, de tierra o de heces de otros animales.

Para la toma de muestras se realizaron los siguientes pasos:

1. Se tomó las aves de traspatio utilizando el equipo de protección personal, esto se realizó con la ayuda de propietarios de las aves.
2. Para realizar el hisopado cloacal se sostuvo el mango del hisopo para introducirlo en la cloaca teniendo cuidado de no topar la punta del hisopo con las manos ni en otro objeto que pueda alterar la muestra.
3. Para introducir el hisopo al UTM se rompió justo donde se encuentra el eje del punto ruptura.
4. Inmediatamente después, el hisopo fue insertado hasta el fondo del tubo con el medio de transporte UTM, y se realizó un movimiento circular para homogenizar la muestra.
5. Seguidamente se cerró la tapa del UTM y se rotulo el envase

Para el estudio se utilizaron 300 muestras de heces frescas e hisopados cloacales, las cuales fueron recolectadas en un tiempo de 43 días.

#### **3.2.4.6. Transporte, almacenamiento, y envío de las muestras.**

Inmediatamente después de la recogida de las muestras, se colocaron en un cooler para mantenerlos a una temperatura de 2-8 °C, temperatura

recomendada por Copan UTM para evitar el deterioro de las muestras durante el transporte al laboratorio donde se almacenaran.

Una vez recolectadas las 300 muestras fueron almacenadas en refrigeración manteniendo la temperatura de 2-8 °C, en las instalaciones del Departamento Diagnostico Veterinario de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNL, para luego de haber terminado con la recolección de las muestras realizar él envió de las mismas.

Para él envió de las muestras primeramente se puso en contacto con el Laboratorio de Patología Aviar de la Universidad Mayor de San Marcos Perú, lugar donde se realizaron los análisis de las muestras recolectadas. Él envió se lo realizó por medio de un cooler para mantener la temperatura, y con los UTM en posición vertical evitando que tengan movimientos bruscos.

#### **3.2.4.7. Análisis de Laboratorio**

Para realizar el análisis de laboratorio, las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Patología Aviar de la Universidad Mayor de San Marcos Perú debido a que este laboratorio es especializado en el diagnóstico aviar. Los protocolos tomados para el análisis son descritos a continuación.

#### **3.2.4.8. Preparación de muestras para aislamiento viral**

Las muestras como heces, secreciones respiratorias y tejidos están contaminadas con flora normal y pueden contener detritus celulares que pueden interferir en la multiplicación viral, por lo que deben tratarse con antimicrobianos y clarificarse por centrifugación antes de la inoculación en huevos embrionados.

- **Procedimiento**

1. Primeramente se homogenizaron las muestras individualmente por 15 segundos.
2. Se colecta 500 ul de cada muestra para formar grupos de 10 muestras, haciendo un volumen total de 5 ml aproximadamente por grupo, se marca cada uno con el código correspondiente se centrifugó las muestras a 1000 rpm por 10 minutos

3. Posteriormente retiramos los tubos de la centrifuga cuidadosamente y se colecta el sobrenadante en otro correctamente rotulado
4. Luego de haber colectado el sobrenadante aplicamos una solución de antibiótico en un volumen de 0.05 ml de penicilina - estreptomina al 20% por ml de muestra se incubaron las muestras de 2 a 3 horas a 4 °C.
5. Se procedió a recolectar las muestras en jeringas individuales estériles para posteriormente ser filtradas
6. Para filtrar utilizamos filtros millipore de 0.22 um, aperturándolos cuidadosamente para evitar su contaminación. Este procedimiento se realiza para cada grupo formado individualmente, finalmente se colectó el líquido filtrado en un vial estéril con un volumen mínimo de 2 ml.

#### **3.2.4.9. Aislamiento viral de huevos embrionados de gallina**

Cabe recordar que el aislamiento en cultivos celulares o huevos embrionados SPF y la subsecuente identificación mediante técnicas inmunológicas o genéticas son los métodos mas sensibles para el diagnostico de infecciones virales cuando se dispone de muestras de buena calidad. Una de las mayores ventajas es que se dispone del virus a nivel del laboratorio para futuras investigaciones sobre la composición antigénica y caracterización genética, preparación de vacunas y estudios de resistencia antiviral.

- **Procedimiento**

1. Para realizar el aislamiento se utilizaron huevos embrionados de 9-11 días
2. Se Observó en el ovoscopio si el huevo es fértil o infértil.
3. Seguidamente se determinó la edad del embrión.
4. Se localiza la cámara de aire y se la marca.
5. Luego Marcamos 0.2 mm sobre la línea a lado contrario del embrión.
6. Se desinfecta los huevos con alcohol al 70% y se abrió un pequeño orificio perforando la cáscara a nivel de la cámara de aire.
7. Se Inoculo 0,8ml del sobrenadante de la muestra.
8. Tapamos el agujero con parafina (o cera de vela).
9. Se incubó los huevos inoculados a 33-34°C por 2-3 días.
10. Se controló y se observó dos veces al día, para percatarse si están vivos o muertos.

#### **3.2.4.10. Cosecha de los líquidos amniótico y alantoideo**

- Para realizar la cosecha de los líquidos se ubico los huevos inoculados a 4°C durante toda la noche.
- Luego se marcó un tubo de 15 ml por cada huevo con el número de la muestra inoculada.
- Se desinfectó los huevos con alcohol al 70%
- Seguidamente se rompió y removió la cáscara del huevo en la cámara de aire, esto se lo realizo usando pinzas estériles.
- Remover la membrana alantoidea.
- Se aspiró el líquido alantoideo usando una pipeta de 10 ml y se transfirió al tubo de 15 ml previamente rotulado.
- Aspiramos el líquido amniótico usando una jeringa y aguja para transferirlo a un tubo previamente rotulado.
- Luego se centrifugó los líquidos cosechados a 3.000 rpm por 5 minutos para remover exceso de sangre o tejido
- Finalmente se evaluó el crecimiento viral usando la técnica de hemoaglutinación (HA).

#### **3.2.4.11. Prueba de HA para determinar el título del antígeno**

1. Se distribuyeron 25 ul de PBS en todos los pocillos de una placa de microtitulación de plástico y fondo en U.
2. A la primera fila de los pocillos se añadieron 25 µl de la suspensión vírica (es decir, líquido alantoideo infectivo o inactivado).
3. A lo largo de toda la placa se practicaron diluciones (96 pocillos)
4. Luego en cada pocillo se dispensan 25 µl de solución de glóbulos rojos.
5. La solución se mezcló golpeando suavemente la placa. Se dejaron reposar los eritrocitos durante unos 40 minutos a temperatura ambiente.
6. La HA se determinó inclinando la placa en un ángulo de 40° y observando la presencia o ausencia de botones claramente diferenciados. Tomando en cuenta que debe leerse la titulación a la dilución más alta a la que se dé una HA completa, esto representa 1 unidad HA (HAU) y puede calcularse de forma precisa a partir del rango inicial de diluciones.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. PRESENCIA DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN LA PROVINCIA DE LOJA

#### 4.1.1. Aislamiento Viral de aves de Traspatio de la Provincia de Loja Zona 1

**Cuadro 2.** Resultados pertenecientes a la Zona 1 de la Provincia de Loja

<b>RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE HEMOAGLUTINACIÓN HA ZONA 1 AVES DE TRASPATIO EN LA PROVINCIA DE LOJA</b>				
<b>Cantón</b>	<b>Sector/sitio</b>	<b>Muestras Analizadas</b>	<b>Positivos ENC/IA</b>	<b>Tipo de Aves</b>
<b>Catamayo</b>	Ing. Monterrey, H. Monterey	6	0/0	Gallinas
<b>Catamayo</b>	San pedro	12	0/0	Gallinas
<b>Catamayo</b>	Chinchas	3	0/0	Gallinas
<b>Catamayo</b>	Arenal	3	0/0	Gallinas
<b>Catamayo</b>	Culanga	3	0/0	Gallinas
<b>Catamayo</b>	Patacorral	3	0/0	Gallinas
<b>Catamayo</b>	San agustin	3	0/0	Gallinas
<b>Catamayo</b>	Santa rita	3	0/0	Patos
<b>Espíndola</b>	El sango, El Tambo, El Laurel	12	0/0	Gallinas
<b>Espíndola</b>	El faical	3	0/0	Gallinas
<b>Espíndola</b>	San carlos	3	0/0	Gallos de Pelea
<b>Gonzanama</b>	Sunamanga	3	0/0	Gallinas
<b>Gonzanama</b>	B. Trinidad	3	0/0	Gallinas
<b>Loja</b>	El Carmelo	3	0/0	Patos
<b>Loja</b>	Chillipacocha	3	0/0	Gallinas
<b>Loja</b>	Celen	4	0/0	Gallinas
<b>TOTAL</b>		<b>70</b>	<b>0/0</b>	

**Fuente:** Investigación directa

**Elaboración:** El Autor (2017)

Como se muestra en el Cuadro 2 de la Zona 1 se tomaron 70 muestras de heces frescas e hisopados cloacales, de las cuales todas fueron negativas, no dieron resultados positivos en la prueba de hemoaglutinación contra el virus de Newcastle e Influenza Aviar.

#### 4.1.2. Aislamiento Viral de aves de Traspatio de la Provincia de Loja Zona 2

**Cuadro 3.** Resultados pertenecientes a la Zona 2 de la Provincia de Loja

<b>RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE HEMOAGLUTINACIÓN HA ZONA 2 AVES DE TRASPATIO EN LA PROVINCIA DE LOJA</b>				
<b>Cantón</b>	<b>Sector/sitio</b>	<b>Muestras Analizadas</b>	<b>Positivos ENC/IA</b>	<b>Tipo de Aves</b>
<b>Olmedo</b>	Las Peñas	3	0/0	Gallinas
<b>Chaguarpamba</b>	Chaguarpamba, Huanga	6	0/0	Gallinas
<b>Paltas</b>	Veracruz	3	0/0	Gallinas
<b>Paltas</b>	Santa Lucía	3	0/0	Gallinas
<b>Paltas</b>	Santa Cecilia	3	0/0	Gallinas
<b>Paltas</b>	San Pablo	3	0/0	Patos
<b>Paltas</b>	Sacaplanga, Jatumpamba	6	0/0	Gallinas
<b>Paltas</b>	La Merced	3	0/0	Gallinas
<b>Paltas</b>	Playas	3	0/0	Gallinas
<b>Paltas</b>	Languicha	3	0/0	Gallinas
<b>Celica</b>	La Sangui	3	0/0	Gallinas
<b>Celica</b>	Suhgsho, Paltahuayco	6	0/0	Gallinas
<b>Celica</b>	Celica	3	0/0	Gallinas
<b>Celica</b>	San Jose, Cango Nuevo, Alahumbo, Guahinche	12	0/0	Gallinas
<b>Macara</b>	Tangula	3	0/0	Gallinas
<b>Macara</b>	Naranjito, Numbiaranga	6	0/0	Gallos de pelea
<b>Macara</b>	Matadero, Guallanama, Cerro De La Mina	9	0/0	Gallinas
<b>Macara</b>	Macara	6	0/0	Gallinas
<b>Macara</b>	Achima, Bellavista	6	0/0	Gallinas
<b>Macara</b>	La Comendera	3	0/0	Patos
<b>Gonzanama</b>	Chiriguala	3	0/0	Gallinas
<b>Cariamanga</b>	Agua Dulce, San Antonio	6	0/0	Gallinas
<b>Cariamanga</b>	Ardanza	3	0/0	Gallinas
<b>Cariamanga</b>	San Pedro Martir, San Juan	6	0/0	Gallos de pelea
<b>Gonzanama</b>	Cusure, Yaruca	6	0/0	Gallos de Pelea
<b>Sozoranga</b>	Los Pozos, Sozoranga	6	0/0	Gallinas
<b>TOTAL</b>		<b>122</b>	<b>0/0</b>	

**Fuente:** Investigación directa

**Elaboración:** El Autor (2017)

En el Cuadro 3 se representa la Zona 2 donde se tomaron 122 muestras de heces frescas e hisopados cloacales, de las cuales todas fueron negativas no dieron resultados positivos en la prueba de hemoaglutinación contra el virus de Newcastle e Influenza Aviar.

### 4.1.3. Aislamiento Viral de aves de Traspatio de la Provincia de Loja Zona 3

**Cuadro 4.** Resultados pertenecientes a la Zona 3 de la Provincia de Loja

<b>RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE HEMOAGLUTINACIÓN HA ZONA 3 AVES DE TRASPATIO EN LA PROVINCIA DE LOJA</b>				
<b>Cantón</b>	<b>Sector/sitio</b>	<b>Muestras Analizadas</b>	<b>Positivos ENC/IA</b>	<b>Tipo de Aves</b>
Loja	Hda. Cachaco	3	0/0	Gallinas
Loja	Masanamaca	3	0/0	Gallos de pelea
Loja	Vilcabamba	3	0/0	Gallos de pelea
Loja	Taxiche	3	0/0	Gallinas
Loja	Cajanuma	3	0/0	Gallinas
Loja	El Capuli	3	0/0	Gallinas
Loja	Chontacruz	3	0/0	Patos
Loja	Carigan, Yanacoche	3	0/0	Gallinas
Loja	Motupe, Salapa Bajo, Shucos	9	0/0	Gallinas
Loja	Salapa Alto	3	0/0	Gallos de pelea
Loja	Solamar	2	0/0	Gallinas
Quilanga	La Elvira	3	0/0	Gallinas
Quilanga	El Guabo, Consahuana	6	0/0	Gallinas
Puyango	La Soledad, San Jose	6	0/0	Gallinas
Puyango	El Derrumbo, Valle Nuevo	6	0/0	Gallinas
Puyango	Puyango Nuevo	3	0/0	Gallinas
Puyango	Puyango	3	0/0	Gallinas
Celica	San Agustin	3	0/0	Gallinas
Celica	Balzones	3	0/0	Gallinas
Celica	Curiachi	3	0/0	Gallinas
Celica	Celica	3	0/0	Gallinas
Celica	Roblones	3	0/0	Gallinas
Celica	Quillusara	3	0/0	Gallinas
Pindal	Higuerillas	3	0/0	Gallinas
Pindal	Las Cochis	3	0/0	Gallinas
Pindal	El Huasimo	3	0/0	Gallinas
Zapotillo	Bolsa Real	3	0/0	Gallinas
Zapotillo	Portachuelo	3	0/0	Gallinas
Zapotillo	Linderos	3	0/0	Gallinas
Zapotillo	Garza Real	3	0/0	Gallinas
Zapotillo	Zapotillo	3	0/0	Gallinas
Zapotillo	Pampa Blanca	3	0/0	Gallinas
Zapotillo	Hulsimo	3	0/0	Gallinas
<b>TOTAL</b>		<b>108</b>	<b>0/0</b>	

**Fuente:** Investigación directa

**Elaboración:** El Autor (2017)

Como se observa en el Cuadro 4 que representa la Zona 3 donde se tomaron 108 muestras de heces frescas e hisopados cloacales, de las cuales todas fueron negativas no dieron resultados positivos en la prueba de hemoaglutinación contra el virus de Newcastle e Influenza Aviar.

#### 4.2. DETERMINACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DEL VIRUS

No fue posible realizarlo debido a los resultados negativos obtenidos por la prueba HA

#### 4.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS PATOTIPOS.

No fue posible realizar esta variable debido a los resultados negativos obtenidos por la prueba HA.

#### 4.4. PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR TOTAL Y POR ZONAS

En el siguiente cuadro podemos observar la prevalencia de la enfermedad de Newcastle e Influenza aviar en la Provincia de Loja, la cual se la dividida en tres zonas con una confianza del 95%.

**Cuadro 5.** Prevalencia de la enfermedad de Newcastle e Influenza aviar en la Provincia de Loja

ZONA	TOTAL MUESTRAS	MUESTRAS POSITIVAS	PREVALENCIA
ZONA 1	70	0	0(0-5,10)
ZONA 2	122	0	0(0-2,92)
ZONA 3	108	0	0(0-3,30)
TOTAL	<b>300</b>	<b>0</b>	<b>0(0-1,19)</b>

**Fuente:** Investigación directa

**Elaboración:** El Autor (2017)

La prevalencia por Zonas con un 95% de confianza fue cero siendo en la Zona 1 la prevalencia 0 y con un intervalo entre 0 y 5,10 con un tamaño muestral de 70; Zona 2 prevalencia 0 y con un intervalo entre 0 y 2,92 con un tamaño muestral de 122; y la Zona 3 prevalencia 0 y con un intervalo entre 0 y 3,30 con un tamaño muestral de 1108; siendo el total del tamaño muestral prevalencia 0 y se encuentra con un intervalo entre 0 y 1,19 con un tamaño muestral total de 300. Cabe recalcar que todas estas aves que fueron tomadas para realizar la presente investigación, nunca fueron vacunadas contra la enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar.

## 5. DISCUSIÓN

Los resultados del análisis de las muestras fueron negativos en su totalidad, lo cual indica que durante el periodo de estudio realmente el virus no estuvo presente, resultados similares al trabajo realizado por Valladares Gago, J. G. (2015) el cual consistió en la detección del virus de Influenza Aviar en patos domésticos en Lima, donde menciona que los resultados negativos obtenidos en su estudio concluyen que el virus no estuvo presente en patos de traspatio en las provincias evaluadas, sin embargo, existe la posibilidad de que no coincidiera el tiempo de eliminación viral con el periodo en el que se tomaron las muestras o que no se haya logrado aislar el virus debido a una baja carga de eliminación viral.

La ausencia del virus de Newcastle es causada por algunos factores como menciona (Alexander, 1997), la infectividad del virus puede ser eliminada por tratamientos físicos y químicos tales como el calor, radiaciones, procesos de oxidación, efectos de pH, solventes lipídicos y varios compuestos químicos. La velocidad a la cual es destruida la misma depende de la cepa de virus, el tiempo de exposición, concentración viral, la naturaleza del medio de suspensión y las interacciones entre los tratamientos.

Se debe tomar en cuenta que las aves de traspatio incluidas las de riña tienen una alta rusticidad por lo cual el sistema inmune de este tipo de aves es otro de los factores muy importantes para que exista una erradicación de esta enfermedad, investigaciones realizadas por (Alexander, 1997) en las que menciona que la producción de anticuerpos es rápida, tanto a nivel local como sistémica.

De igual manera investigaciones realizadas por Guevara (2013) en criaderos ubicados en la ciudad de Riobamba menciona que el 100 % de la población muestreada presentó anticuerpos séricos frente a la enfermedad de Newcastle. Briceño *et al.*, (2012) también determina una seroprevalencia para la enfermedad de Newcastle en gallos de pelea del municipio de Saboyá (Boyacá) utilizando la prueba de Inhibición de Hemaglutinación del 96.4 %. lo que indica actividad viral, inmunización u otro tipo de exposición al virus. Lo

cual no concuerda con los resultados negativos obtenidos en este estudio. Sin embargo, aún con la negatividad de las muestras analizadas, no es conveniente descartar definitivamente a estas aves como reservorios de estas dos enfermedades en la región, esto se apoya con estudios como el de Vickers y Hanson en 1982, los cuales sugieren que la posible seroprevalencia reportada puede no ser indicativa de la verdadera prevalencia de las infecciones.

Las investigaciones realizadas por Armijos (2014); Guaya (2015) determinan la presencia de Newcastle en la provincia de Loja, demostrándose posteriormente que se trataba de virus de baja patogenicidad o vacúnales Muñoz *et al.*, (2016), lo que determina que en la presente investigación no se encontró la presencia del virus ni de campo ni vacunal. En todos los casos la prueba de hemaglutinación no produjo resultados positivos. Otros autores como Sakai *et al.*, (2006) ya han descrito la dificultad de aislar el virus de Newcatle en especímenes clínicos de aves adultas sanas, especialmente las de baja virulencia. Según Kubista *et al.* (2006), la concentración viral es tan baja que sólo la qPCR es capaz de detectarla.

En el Ecuador existen trabajos realizados sobre la prevalencia y el aislamiento del virus de Newcastle en aves de traspatio presentando resultados positivos en sus trabajos los mismos que al ser serológicos no confirman ser de campo o vacunales solo indican circulación viral, pero existen estudios virológicos en aves silvestres realizados en otros países en la que no se logró aislar el virus de NC. Mendoza (2012), evaluó el virus de Newcastle en aves silvestres de la laguna “Albufera” ubicada en Perú mediante aislamiento viral obteniendo resultados negativos. Así mismo, el Servicio Agrícola Ganadero de Chile, analizo 346 muestras de aves migratorias y silvestres para la enfermedad de NC obteniendo resultados negativos al aislamiento viral en su totalidad. En otros estudios de tipo serológico realizados en el Perú, Chang (1998), no encontró niveles de anticuerpos compatibles con la enfermedad de NC en aves silvestres paseriformes y columbiformes, similar a lo encontrado por Carrión *et al.*, (2014), en aves columbiformes en Perú provincia de Huaral.

La recolección de las muestras de heces se las realizó en temporada de verano siendo otra limitante para la presencia de estas enfermedades, Buscaglia (2004), señala que los virus de Influenza Aviar no resisten altas temperaturas, por tanto los brotes de la enfermedad se producen más en invierno. Helm Juliet D. (2003) indica que su resistencia en el medio ambiente es condicionada a que en los locales contaminados se inactivan por sí solos en un tiempo relativamente breve y en las gallinas pierde su capacidad de infectante entre 14 y 30 días.

## 6. CONCLUSIONES

- En el presente estudio se analizaron 300 muestras de hisopado cloacal y heces frescas procedentes de aves de traspatio de la Provincia de Loja, no se logró aislar el virus de las enfermedades de Newcastle e Influenza Aviar mediante la técnica de aislamiento viral, la prevalencia estimada fue de 0% con una confianza del 95% pero con un intervalo de 0 a 1.19%.
- Las aves muestreadas no se encontraban infectadas con este virus, pero aun así no es prudente descartar a las aves de traspatio y gallos de pelea como posibles reservorios y acarreadores de estas dos enfermedades en la Provincia, ya que existe la posibilidad mínima que sea, pues el grado de confiabilidad alcanzado fue de 95%, teniendo un margen de error de 5%.
- Los factores ambientales son muy importantes para que no exista la presencia de estos virus, al momento de la recolecta de las muestras la Provincia de Loja cruzaba por la temporada de verano siendo estos días los más calurosos del año, por lo cual estos virus son eliminados.

## 7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar investigaciones subsecuentes al presente, que puedan abarcar la temporada de verano e invierno y descartar con más firmeza la existencia de la enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar
- Para obtener resultados precisos en el diagnóstico de laboratorio, las muestras deben ser recolectadas de forma minuciosa evitando su contaminación, para el transporte, almacenamiento y envío de las muestras se lo debe realizar evitando las variaciones de temperatura y todas las medidas de seguridad posible.
- Para mantener un mayor control de estas enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar se deben monitorear con más frecuencia todas las especies de aves incluidas aves silvestres, aves traspatio, aves de riña y las granjas avícolas comerciales, en especiales cuando estas aves presentas síntomas de enfermedad.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, D. J. (1997). Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infections. In: Diseases of Poultry, Tenth Edition, Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R. & Saif Y.M., eds. Iowa State University Press, Iowa, USA, 541–570.
- AL-GARIB S.O., GIELKENS A.L.J., GRUYS E. AND KOCH G. (2003) Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination. World's poultry science journal 59:185-200.
- American Association of Avian Pathologists (AAAP) 1989. A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Third Edition. Kendall/Hunt. USA.
- Anis, Z., Morita, T., Azuma, K., Ito, H., Ito, T., Shimada, A. 2013. Comparative study on the pathogenesis of the generated 9a5b newcastle disease virus mutant isolate between chickens and waterfowl. Vet. Pathol. Onli. 50:638-647
- Arenas, M. (2003). Determinación de anticuerpos séricos contra las enfermedades de Newcastle e Influenza aviar en aves de traspatio circundantes a una granja avícola tecnificada en Cuilapa. Santa Rosa, y la relación de ambas.
- Armijos Montaña, J. E. (2014). *Determinación de la presencia del virus de newcastle en gallinas criollas del cantón Zapotillo, provincia de Loja* (Bachelor's thesis, Loja: Universidad Nacional de Loja).
- Botero H. L. A. (2006) Experiencias de Campo en el Manejo y Control de Cepas Altamente Patógenas de la Enfermedad de Newcastle. XI Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar
- Briceño J, Rodríguez J, Rodríguez S. (2012). Seroprevalencia de la enfermedad de Newcastle en gallos de pelea (*Gallus gallus*) del municipio de Saboyá, Boyacá. Recuperado el 25 de noviembre de 2016

de: <http://www.revistasjdc.com/main/index.php/conexagro/article/view/182>

- Brown, C.; King, D.J. y Seal, B.S. (1999). Pathogenesis of Newcastle Disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. *Vet. Pathol*, 36:125-132. Cavanagh, D. (2001). Innovation and discovery: the application of nucleic acid-based technology to avian virus detection and characterization. Technical Review. *Avian Pathol.*, 30:581-598.
- Buendia Endara, R. A. (2015). Detección del virus de la enfermedad de Newcastle en patos criollos (*Cairina moschata*) de traspatio.
- Buscaglia, C. 2004. Situación de la Influenza Aviar. Una puesta al día sobre las características de la enfermedad. Seminario por un campo sano: ¿Cómo estamos en sanidad agropecuaria? Bolsa de Cereales. Buenos Aires, Argentina, pp. 28-29.
- Calnek B.W. (2000). Enfermedades de las aves. Segunda Edición. Pag.
- CAPUA I., TERREGINO C., CATTOLI G., MUTINELLI F. & RODRIGUEZ J.F. (2003). Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol.*, 32, 47–55.
- Cardona, C. 2003. Avian Influenza: Veterinary Medicine Extensión. University of California, Davis, CA (en línea).
- Cardozo, Beatriz.2000. Epidemiología y control de la enfermedad de Newcastle. Lehmann Animal Health International. Documento Resumen.
- Carrión, A., Icochea, E., & Falcón, N. (2014). Seroprevalencia del virus de la enfermedad de newcastle en aves silvestres del orden columbiforme en baños de boza, distrito de aucallama, provincia de huaral. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 11(1), 88-91.

- Chang E. 1998. Detección de la prevalencia de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle en aves silvestres paseriformes y columbiformes en la provincia de Chancay. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor San Marcos. 14 p.
- COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2006): Commission Decision of approving a Diagnostic Manual establishing diagnostic procedures, sampling methods and criteria for evaluation of the laboratory tests for the confirmation of Avian Influenza.
- CONSEJO DE LA UNION EUROPEA (2005): Directiva 2005/94/CE del Consejo, de 20 de diciembre de 2005, relativa a medidas comunitarias de lucha contra la influenza aviar y por la que se deroga la Directiva 92/40/CEE. Diario Oficial de la Unión Europea, L10, 16-65.
- Cordero M. 2014. Influenza Aviar en las Américas. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).
- CUADROS, (2011). Romel José Araujo. Enfoque Zoonótico de la Enfermedad de Newcastle. *Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Lara*, vol. 1, no 1, p. 1.
- Cuadros, R. J. A. (2011). Enfoque Zoonótico de la Enfermedad de Newcastle. *Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Lara*, 1(1), 1.
- Cuello, S., Armando, V., & Julia, N. (2011). Actualización sobre la enfermedad de Newcastle. REDVET. *Revista electrónica de Veterinaria*, 1695, 7504.
- De La Sota, M.D., Espinoza C., 2004. Manual de procedimientos enfermedad de Newcastle. Dirección Nacional de Sanidad Animal-Buenos Aires, Argentina. P.10-15.
- FAO. 2013. Red Internacional para el Desarrollo de la Avicultura Familiar. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Roma. [Internet], [23 Marzo 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/infpd/home.html>

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2013). A technology review: Newcastle disease with special emphasis on its effects on village chickens. FAO, 2013.
- Guaya, G., & Paulina, J. (2015). *Aislamiento del virus de la enfermedad de Newcastle en gallinas domésticas del cantón Zapotillo de la provincia de Loja* (Bachelor's thesis, Loja: Universidad Nacional de Loja).
- Guevara Oquendo, V. H., & Salazar Medina, E. F. (2013). Determinación de anticuerpos séricos contra Newcastle en aves de pelea de veinte criaderos ubicados en la Ciudad de Riobamba.
- Helm Juliet D. 2003. Newcastle. Información para criadores de aves.(Disponible en: <http://www.Clemson.edu/ep/Exotic.Newcastle4.htm>.
- Hilleman M. R., 2002, Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 20:3068 – 3087.
- Herrero L. 2008. El virus influenza y la gripe aviar (Influenza virus and avianflu). *Acta Médica Costarricense. Acta Méd Costarricense* 50(1): 13-19.
- Jurado Tarifa, E. (2016). Estudio epidemiológico de patógenos zoonóticos (influenza aviar, flavivirus, *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp.) en cimbeles y rapaces de Andalucía.
- Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG .1989. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J. Virol*, 63 (11):4603–4608.
- King, D. 2002. Newcastle Disease: Worldwide Situation and Control. In *Décimo Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar* (2002, Athens, GA). Seminario de actualización de patología y producción aviar. UGA. 1 disco compacto, 8 mm.
- Kommers, G.D.; King, D.J.; Seal, B.S. y Brown, C.C. (2001). Virulence of pigeon origin Newcastle disease virus isolates for domestic chickens. *Avian Dis.*, 45:906-921.

- Kubista M, (2006). Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K. et al. Review: the real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006; 27:95–125.
- LEÓN LARA, Lemuel, *et al.* Programa de prácticas de virología (2004). 2013.
- Li, Y.P. y Zhang, M.F. (2004). Rapid pathotyping of Newcastle disease virus from allantoic fluid and organs of experimentally infected chickens using two novel probes. *Arch. Virol.* 149:1231-1243.
- Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese P. (2007). Influenza Virus Transmission Is Dependent on Relative Humidity and Temperature. *PLoS Pathog* 3(10): e151.
- Maclachlan, J. & Dubovi, E. (2011). *Fenner's Veterinary Virology*. (4th Ed.). Londres: Editorial Elsevier.
- Martin V, Forman A, Lubroth J. (2007). Preparándose para la Influenza aviar altamente patógena. *Dir. de Producción y Sanidad Animal. Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. Roma Italia. 2007.*
- Mendoza L. 2012. Evaluación constante del virus de la enfermedad de Newcastle en aves silvestres de la Laguna Albufera de Medio Mundo. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor San Marcos. 26 p.
- Miller P.J and Koch G., 2012. Newcastle Disease, Other Avian Paramixoviruses, and Metapneumovirus Infections. Newcastle disease. In: *Diseases of Poultry*, 13th Edition. Ed. By Swayne, D.E., Glisson, J.R., Mc Dougald, L.R., Nolan, L.K., and D. L. Suarez. Edit. Willey-Blackwell Publishing. Iowa, USA p. 89-107.
- Milton F., Franson J.C. 1999. *Field Manual of Wildlife Diseases, General Field Procedures and Diseases of Birds*. USGS. USA.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (2005): Avian influenza. In:

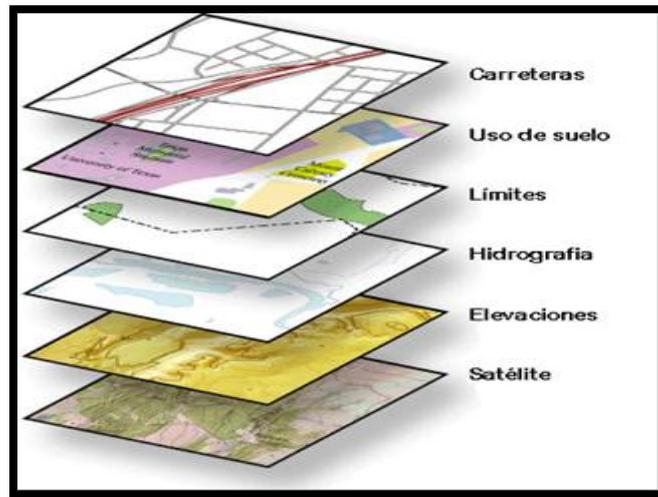
Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, ed. OIE Standards Commission, 5th ed., Chapter 2.7.12, pp. 1064-1071. Office International des Epizooties, Paris, France.

- OIE (2015) Actualización sobre influenza aviar altamente patógena (tipo H5 y H7) en animales. Organización Mundial de Sanidad Animal. Disponible en: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/>. Fecha de consulta: marzo 13 de 2017.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2009). Terrestrial Manual. Avian Influenza. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2014). Enfermedad de Newcastle. OIE. *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2013*. 7ª edición p. 630 – 649. Paris, Francia. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL.
- Peeters, B. P.H; O.S. de Leeuw; G. Koch and A. L. J. Gielkens. 1999. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: Evidence that cleavability of the fusión protein is a major determinant for virulence. *Arch. Virol.* 73:5001-5009.
- Procedimientos Influenza Aviar. Argentina: SENASA. p 9-13.
- Rimondi, A. (2014). Estudio de la patogenia del Virus de Influenza Aviar de baja patogenicidad en aves de corral inmunosuprimidas por la afección con el virus de la Anemia Infecciosa Aviar (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).
- Rojas, E. (2008). *Encefalitis de las aves*. Mexico: Editorial trilla.
- Rojas, O. H., & Moreira, Z. R. (2002). Influenza Aviar en Chile. 2002: Una Sinopsis. Ministerio de Agricultura. División de Protección Pecuaria. Salud Animal e Inocuidad de los Alimentos. Gobierno de Chile.

- Rovid, A., Roth, J., Galyon, J., Lofstedt, J., Lenardon, M. (2011). Enfermedades Emergentes y Exóticas de los Animales.
- Sakai K. (2006) Yada K, Sakabe G, Tani O, Miyaji K, Nakamura M. et al. Serological and virological studies of newcastle disease and avian influenza in Slaughter-Age Ostriches (*Struthio camelus*) in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*; 68(5):491-494.
- Sánchez 1990 Enfermedad de Newcastle. Enfermedades de las aves. Ediciones ENPES. La Habana. Cuba.
- Swayne DE, Halvorson DA. 2003. Influenza. En: Calnek BW. *Diseases of Poultry*. 11a ed. Iowa State Press, USA. p135- 160.
- Thomazelli, L. M., de Araujo, J., Ferreira, C. D. S., Hurtado, R., Oliveira, D. B., Ometto, T.,... & Durigon, E. L. (2012). Molecular surveillance of the Newcastle disease virus in domestic and wild birds on the North Eastern Coast and Amazon biome of Brazil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 14(1), 01-07.
- Tiwari, A.K.; Kataria, R.S.; Nanthakumar, T.; Dash, B.B. y Desai, G. (2004). Differential detection of Newcastle disease virus strains by degenerate primers based RT-PCR. *Comp. Immunol. Microb. And Infectious Diseases*, 27(3):155- 223. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. *Veterinarias. Univ. Nac. De la Plata. Bs As. Argentina. In Vet 2004. 6 (1): 71-84*
- Valladares Gago, J. G. (2015). Detección del virus de influenza aviar en patos domésticos de crianza familiar en las provincias de Huaral y Huaura.
- Venturino, J., & Biofarma, S. A. (2010). Bioseguridad en granjas avícolas. [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar).
- Villacís R. G., Escudero S. G., Cueva C. F., Luzuriaga N. A. (2015). La prevalencia del virus de Newcastle en pollos nativos de las comunidades rurales en el sur de Ecuador. CEDAMAZ

- Villegas P. Newcastle Epidemiología y Estrategias de Control. aviNews. 2015 Nov; 66–82.
- Viveros, M., Camacaro, L., Fernández, D., & Barrios, M. (2012). CONTROL Y PREVENCIÓN DEL VIRUS NEWCASTLE EN AVES DE UNIDADES DE PRODUCCION FAMILIAR EN COMUNIDADES DE LAS COLONIAS AGRÍCOLAS DE YUMARE, ESTADO YARACUY. Mundo Pecuario, 8(2), 139-144.

## 9. ANEXOS



**Figura 6.** Herramienta ArcMap, trabajo con capas

**Fuente:** El Autor (2017)



**Figura 7.** Recolección de hisopados cloacales en gallinas traspatio



**Figura 8.** Recolección de hisopados cloacales en gallinas traspatio



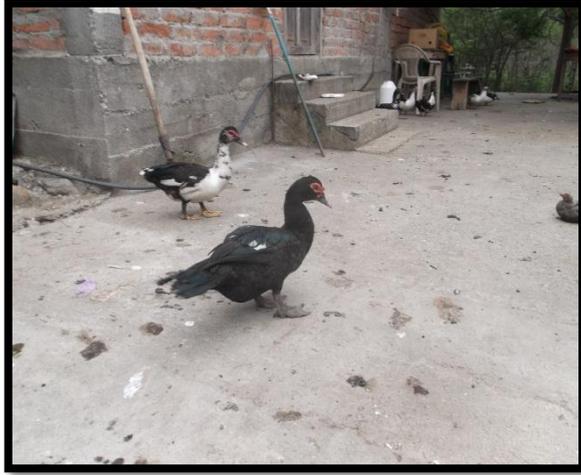
**Figura 9.** Recolección de hisopados cloacales en aves de riña



**Figura 10.** Recolección de hisopados cloacales en aves de riña



**Figura 11.** Recolección de muestras de heces frescas en aves de traspatio



**Figura 12.** Recolección de muestras en patos.



**Figura 13.** Instalaciones del Laboratorio de Patología Aviar de la Universidad Mayor de San Marcos Perú.

**Cuadro 6.** Registro de la recolección de muestras en el campo.

<b>DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO EN LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE</b>											
<b>RESPONSABLE:</b>		NIXON HERNAN GAONA CASTILLO									
<b>PROVINCIA EN ESTUDIO:</b>		LOJA									
<b>TIPO DE MUESTRA:</b>		HECES									
<b>PARTE DE LOJA ZONA # 1</b>											
N° de muestra	Fecha de colecta	Provincia	Cantón	Sector/sitio	Punto de muestreo	Cuadrante	Propietario	Coordenadas GPS		Numero de fotografía	Vacunación
								X	Y		
1	17/01/2016	LOJA	Catamayo	Ing. Monterrey	492	620	Angel Torres	649408,11	9563588,34	574	NO
2	17/01/2016	LOJA	Catamayo	Ing. Monterrey	492	620	Angel Torres	649408,11	9563588,34	575	NO
3	17/01/2016	LOJA	Catamayo	Ing. Monterrey	492	620	Angel Torres	649408,11	9563588,34	576	NO
4	17/01/2016	LOJA	Catamayo	H.monterrey	525	620	Carmen Calva	678490,03	9561209,52	577	NO
5	17/01/2016	LOJA	Catamayo	H.monterrey	525	620	Carmen Calva	678490,03	9561209,52	578	NO
6	17/01/2016	LOJA	Catamayo	H.monterrey	525	620	Carmen Calva	678490,03	9561209,52	579	NO
7	17/01/2016	LOJA	Catamayo	San pedro	523	659	Germania Celi	674999,53	9564148,06	580	NO
8	17/01/2016	LOJA	Catamayo	San pedro	523	659	Germania Celi	674999,53	9564148,06	581	NO
9	17/01/2016	LOJA	Catamayo	San pedro	523	659	Germania Celi	674999,53	9564148,06	582	NO
10	17/01/2016	LOJA	Catamayo	Chinchas	522	658	Julio Tinoco	668726,49	9562087,06	583	NO
11	17/01/2016	LOJA	Catamayo	Chinchas	522	658	Julio Tinoco	668726,49	9562087,06	584	NO
12	17/01/2016	LOJA	Catamayo	Chinchas	522	658	Julio Tinoco	668726,49	9562087,06	585	NO
13	17/01/2016	LOJA	Catamayo	Arenal	433	533	Manuel Córdova	631354,02	9545810,91	586	NO
14	17/01/2016	LOJA	Catamayo	Arenal	433	533	Manuel Córdova	631354,02	9545810,91	587	NO