UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"PRESENCIA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR Y ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN AVES SILVESTRES Y MIGRATORIAS EN HUMEDALES DE LA PROVINCIA DE EL ORO".

TESIS DE GRADO PREVIA A LA ABTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

AUTOR:

JULIO PATRICIO CHAMBA AVILA

DIRECTOR

DR. GALO VINICIO ESCUDERO SÁNCHEZ, Mg. Sc.

LOJA – ECUADOR

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Dr. Galo Vinicio Escudero Sánchez Mg. Sc

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación "PRESENCIA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR Y ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN AVES SILVESTRES y MIGRATORIAS EN HUMEDALES DE LA PROVINCIA DE EL ORO", realizado por el egresado Julio Patricio Chamba Avila, previa obtención del título de MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA, Ha sido revisado minuciosamente durante su desarrollo, la tesis cumple con lo establecido en la norma vigente de la Universidad Nacional de Loja, por lo que autorizo su impresión, presentación y sustentación a los organismos pertinentes.

Loja, 18 de julio de 2017.

Dr. Galo Vinicio 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

"PRESENCIA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR Y ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN AVES SILVESTRES y MIGRATORIAS EN HUMEDALES DE LA PROVINCIA DE EL ORO"

Tesis presentada al tribunal de grado como requisito previo a la obtención del título de: **MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

APROBADA Loja 18 de julio de 2017

Dr. Víctor Rolando Sisalima Jara, Mg. Sc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Rodrigo Medardo Abad Guamán, Ph.D.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Iliana Natacha Ramírez Sanmartín, Mg. Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AUTORÍA

Yo, **Julio Patricio Chamba Avila**, declaro ser 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 del mismo.

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

Autor: Julio Patricio Chamba Avila

Firma: _____

Cédula: 1104952872

Fecha: Loja, 19 de julio 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, **Julio Patricio Chamba Avila**, declaro ser autor de la tesis titulada: **"PRESENCIA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR Y ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN AVES SILVESTRES y MIGRATORIAS EN HUMEDALES DE LA PROVINCIA DE EL ORO"**, como requisito para optar el grado de: **Médico Veterinario Zootecnista**; autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja, para que con fines académicos demuestre 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:

Los usuarios podrán consultar el contenido de este trabajo en el repositorio digital institucional (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 19 días del mes de julio del dos mil diecisiete, firma el autor.

Firma: _____

Autor: Julio Patricio Chamba Avila

Número de cédula: 1104952872

Dirección: Provincia de Galápagos, Santa Cruz, Puerto Ayora

Correo electrónico: patricio1689@hotmail.com

Celular: 0990131195

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de tesis: Dr. Galo Vinicio Escudero Sánchez. Mg. Sc.

Tribunal de grado: Dr. Víctor Rolando Sisalima Jara, Mg. Sc.

Dr. Rodrigo Medardo Abad Guamán, Ph.D.

Dra. Iliana Natacha Ramírez Sanmartín, Mg. Sc.

AGRADECIMIENTO

Me complace de sobre manera a través de este trabajo, exteriorizar mi sincero agradecimiento a la Universidad Nacional de Loja, que me abrió sus puertas para poder ingresar a la noble y querida Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables; y en ella a los distinguidos docentes quienes con su profesionalismo, ética y moral, puesto de manifiesto en las aulas enrumban a cada uno de los que acudimos con sus conocimientos que nos servirán para ser útiles a la sociedad.

De igual manera quiero agradecer al Dr. Galo Vinicio Escudero Sánchez, Mg. Sc Director de Tesis, quien con sus sabios conocimientos y su buena paciencia quien me guio para la realización de este trabajo investigativo.

Julio Patricio Chamba Avila

DEDICATORIA

En primer lugar, doy infinitamente gracias a Dios, por haberme dado fuerzas, valor para culminar esta etapa de estudio, a mis padres por haberme dado la vida y tener una buena educación.

La presente tesis está dedicada a mi querida familia ya que gracias a su incondicionado apoyo pude concluir mi carrera.

A mi Esposa y a mis queridos hijos por darme es apoyo diario y esa confianza mutua cada día para superarme en mi carrera como médico veterinario, ya que con familia no es fácil llegar a la meta final, pero mi querida esposa ahí estuvo ayudándome, motivándome, dándome ese impulso fraternal, y de todo corazón te lo agradezco mi querida esposa Noemí Castillo, te amo mi amor.

A mis padres y hermanas por su apoyo y confianza que tuvieron en mí para culminar con mi principal objetivo planteado como persona y estudiante.

A mi padre por guiarme por un buen camino de ser un buen profesional, brindarme los recursos necesarios para poder salir adelante.

A mi madre por estar ahí cada día presente con sus sabios consejos y enseñanzas y sobre todo con su amor.

A mis hermanas por estar siempre presentes y pendientes de mí siempre impulsándome por el buen camino.

A todo el resto de la familia y amigos que de una u otra manera me han llenado de sabiduría para terminar la tesis.

A todos en general por darme el tiempo para realizarme profesionalmente.

Julio Patricio Chamba Avila

INDICE GENERAL

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS ii

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO iii

AUTORÍA.....iv

CARTA DE AUTORIZACIÓN. v

AGRADECIMIENTO vi

DEDICATORIA vii

INDICE GENERAL viii

TITULO.....xv

RESUMEN.....xvi

ABSTRACT.....xvii

1. INTRODUCCIÓN 1

2. REVISIÓN DE LITERATURA 4

2.1. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE 4

2.1.1. Sinonimias 4

2.1.2. Epidemiología 4

2.1.3. Etiología 5

2.1.3.1. Clasificación Taxonómica 5

2.1.4. Morfología 5

2.1.5. Patogenicidad del Virus de Newcastle 6

2.1.6. Cepas del Virus de NC 8

2.1.7. Ciclo Biológico del Agente 9

2.1.8. Periodo de Incubación 10

2.1.9. Signos Clínicos 10

2.1.10. Lesiones Macroscópicas 11

2.1.11. Histopatología 11

2.1.12. Diagnóstico 12

2.1.13. Diagnostico 17

2.1.13.1. Diagnóstico clínico 17

2.1.13.2. Diagnóstico Diferencial 17

2.1.14. Tratamiento 17
2.1.15. Control y Prevención 17
2.1.16. Vacunas 18
2.1.16.1. Programa de vacunación 18
2.1.17. INFLUENZA AVIAR 19
2.1.18. Sinonimia 19
2.1.19. Epidemiología 19
2.1.20. Etiología 20
2.1.21. Clasificación Taxonómica 20
2.1.22. Morfología 20
2.1.23. Patogenicidad del virus de Influenza Aviar 21
2.1.24. Cepas del Virus de Influenza Aviar 22
2.1.25. Ciclo Biológico del Agente 23
2.1.26. Periodo de Incubación 24
2.1.27. Signos Clínicos 24
2.1.28. Lesiones Macroscópicas 24
2.1.29. Histopatología 25
2.1.30. Diagnóstico 25
2.1.31. Diagnóstico Diferencial 30
2.1.32. Tratamiento 30
2.1.33. Prevención y Control 30
2.1.34. Vacunación 31
2.2. Semejanzas y diferencias del virus de newcastle e influenza aviar 32
2.3. Inoculación en el embrión de pollo 33
2.3.1. Inoculación 33
2.3.2. Lugares y Procedimientos de Inoculación 34
2.4. RT- PCR en tiempo real 35
2.5. Aves migratorias 36
2.5.1. Epidemiologia Mundial 36
2.5.2. Historia de las Aves Migratorias 36
2.5.3. Migración Anual 37
2.5.4. Rutas 38
2.5.5. Nuevos Subtipos y Peligros 38
2.6. HUEVOS SPF 39
2.7. Medio de transporte universal copan (UTM-RT) 39
2.7.1. Principio 40
2.7.2. Resultados 40
2.8. Articulos relacionados 40

3. MATERIALES Y MÉTODOS 42

3.1. Materiales.....42

3.1.1. De Campo 42

3.1.2. De Laboratorio.....42

3.1.3. De Oficina.....43

3.2. MÉTODOS 43

3.2.1. Delimitación del Área de Estudio..... 43

3.2.2. Tamaño y Selección de la Muestra 44

3.2.3. Variables 45

3.3. Recopilación de la información.....46

3.3.1. Establecimiento de Muestreo 46

3.3.2. Ubicación Espacial de los Humedales para Muestreo..... 46

3.3.4. Técnicas de Recolección de Muestra 49

3.3.5. Análisis de Laboratorio 49

3.3.5.1. Preparación de las muestras de campo..... 51

3.3.5.2. Formación de grupos..... 52

3.3.5.3. Aislamiento del virus de EN e IA en embriones de pollo..... 52

3.3.5.4. Pruebas de hemaglutinación (HA)..... 53

3.3.6. Identificación de Aves 54

4. RESULTADOS 58

4.1. Prevalencia de los virus de newcastle e influenza aviar en aves silvestres de humedales de la provincia de EL ORO.....58

4.2. Aislamiento de virus newcastle e influenza aviar en aves silvestres por sectores de la provincia..... 59

4.3. Aislamiento del virus newcastle e influenza aviar en especies de aves silvestres por zonas en la provincia de EL ORO 60

4.4. Prevalencia del virus de newcastle e influenza aviar en especies de aves silvestres y migratorias en la provincia de EL ORO.....65

4.5. Factores de riesgo del virus de la enfermedad de newcastle e influenza viar en la provincia de EL ORO.....67

4.5.1. Susceptibilidad de las Aves Silvestres. 67

4.5.2. Presencia de Humedales 68

4.5.3. Vía Mecánica Mediante Transporte, Personas y otros Fómites Contaminados 68

4.5. Factores de riesgo del virus de la enfermedad de newcastle e influenza viar en la provincia de EL ORO. 68

4.5.1. Susceptibilidad de las Aves Silvestres. 68

4.5.2. Presencia de Humedales 69

4.5.3. Vía Mecánica Mediante Transporte, Personas y otros Fómites Contaminados 69

5. DISCUSIÓN 70

5.1. Presencia del virus de newcastle e influenza aviar 70

5.2. Aislamiento virus de newcastle e influenza aviar. 70

5.3. Factores de riesgo. 71

6. CONCLUSIONES 72

7. RECOMENDACIONES 73

8. BIBLIOGRAFIA 74

9. ANEXOS 79

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Esquema de Plan de vacunación completo.....18

Cuadro 2. Muestras a recolectar en las distintas zonas de la Provincia de El Oro….....49

Cuadro 3. Cuadrantes de la Provincia De El Oro con sus respectivos puntos de muestreo correspondientes a la zona Inferior.....50

Cuadro 4. Identificación de aves observadas.....55

Cuadro 5. Prevalencia de los virus de Newcastle e Influenza Aviar en aves silvestres de humedales de la Provincia De El Oro. 58

Cuadro 6. Aislamiento de virus Newcastle e Influenza Aviar en aves silvestres por sectores en la Provincia De El Oro.....59

Cuadro 7. Aislamiento del virus Newcastle e Influenza Aviar en aves silvestres en la zona superior de la Provincia De El Oro. 60

Cuadro 8. Aislamiento del virus Newcastle e Influenza Aviar en aves silvestres en la zona media de la Provincia De El Oro..... 62

Cuadro 9. Aislamiento de virus Newcastle e Influenza Aviar en aves silvestres en la zona inferior de la Provincia De El Oro.....64

Cuadro 10. Presencia del virus de Newcastle e Influenza aviar en especies de aves silvestres que se identificaron durante la recolección.....65

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura virus de Newcastle. Micrografía electrónica de un virón de la cepa Clone 30.....6

Figura 2. Periodo de incubación y ciclo biológico del Virus de Newcastle. .10

Figura 3. Ciclo biológico del virus de Influenza Aviar 23

Figura 4: Mapa del Cantón Balsas. 44

Figura 5. Presencia de humedales en la provincia De El Oro. 47

Figura 6. Mapa de distribución de sitios de muestreo en la Provincia De El Oro. 48

Figura 7. División del mapa de la provincia de Loja en tres zonas de muestreo Fuente: (CINFA, 2016) 48

INDICE DE NEXOS

Anexo 1. Elaboración del mapa para ubicar sitios de muestreo con el personal del CINFA- UNL. 79

Anexo 2. Recolección de las muestras en los diferentes puntos de muestreo. 80

Anexo 3. Tipos de aves muestreadas y sus respectivos registros. 80

Anexo 4. Muestras totales recolectas en diferentes puntos.....83

Anexo 5. Laboratorio de patología aviar Universidad Nacional Mayor de San Marcos 83

Anexo 6. Registros de muestras de campo. 83

“PRESENCIA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR Y ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN AVES SILVESTRES y MIGRATORIAS EN HUMEDALES DE LA PROVINCIA DE EL ORO”

RESUMEN

En la Provincia De El Oro se colectaron 300 muestras de heces de aves silvestres y migratorias, para determinar la presencia del virus de la enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar. Para el muestreo se elaboró un mapa en base software académico ARGIS con los sitios a muestrear, en base a información de los diferentes cantones y del censo del año 2015 de AGROCALIDAD, donde coexisten humedales, sistemas hídricos, producción avícola comercial y de traspatio. Con un tamaño muestral de 300 en base a la prevalencia Limite con una prevalencia mínima menos del 1% (Gonzales 1986). Se determinó así que las muestras a recolectar por zona fueron las siguientes: zona superior: 34 puntos de muestreo 82 muestras recolectadas, zona media: 52 puntos de muestreo 136 muestras recolectadas, zona inferior: 67 puntos de muestreo 82 muestras recolectadas, las mismas colectadas y transportadas en tubos UTM al laboratorio. Las muestras fueron utilizadas para realizar el aislamiento viral en huevos embrionados de 9 – 11 días, a través de la prueba de la hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación, análisis realizados en la Universidad Mayor de San Marcos de Lima, en el laboratorio de Patología Aviar. Se calcularon intervalos de confianza al 95 % utilizando el programa estadístico “R” aplicando el paquete “epiR” versión 09 – 79 obteniendo los siguientes intervalos de confianza: todas las zonas presentaron prevalencia menor a la unidad con un intervalo de confianza de (0 - 1,19).Todas las muestras de las aves analizadas dieron resultados negativos para anticuerpos contra el VNC e IA, revelando que las aves silvestres migratorias y residentes, no habían sido expuestos al virus y que en el momento del muestreo no se encontraban excretando el virus y que no podían constituir en un reservorio, o que la cantidad de ARN viral tanto de NC como IA fue mínima, que se pudo perder en el transporte y conservación de la muestra o en su defecto no pudo ser detectada por la por el aislamiento y la prueba de HI por lo que se recomienda pruebas moleculares que permitan detectar mínimas cantidades de ARN como lo es la RT-qPCR.

Palabras Claves: Aislamiento, Influenza Aviar, Newcastle, Virus, y riesgo.

ABSTRACT

In the Province of El Oro, 300 samples of wild and migratory bird feces were collected to determine the presence of Newcastle disease virus and Avian Influenza. For the sampling, an ARGIS academic software map was developed with the sites to be sampled, based on information from the different cantons and from the 2015 AGROCALIDAD census, where wetlands, water systems, commercial and backyard poultry production coexist. With a sample size of 300 based on the prevalence limit with a minimum prevalence less than 1% (Gonzales 1986). It was determined that the samples to be collected by area were as follows: upper area: 34 sampling points 82 samples collected, medium area: 52 sampling points 136 samples collected, lower zone: 67 sampling points 82 samples collected, collected And transported in UTM tubes to the laboratory. The samples were used to perform viral isolation in embryonated eggs of 9 - 11 days, through the hemagglutination test and inhibition of hemagglutination, analyzes performed at the University Of San Marcos De Lima, in the laboratory of Avian Pathology. 95% confidence intervals were calculated using the "R" statistical program by applying the "epiR" version 09 - 79 package, obtaining the following confidence intervals: all zones presented a prevalence lower than unity with a confidence interval of (0 - 1.19). All samples from the birds tested gave negative results for antibodies against VNC and AI, revealing that migratory and resident wild birds had not been exposed to the virus and that at the time of sampling they were not excreting the virus. Virus and that they could not constitute in a reservoir, or that the amount of viral RNA both of NC and IA was minimal, that could be lost in the transport and conservation of the sample or in its defect could not be detected by the isolation And the HI test, which is why molecular tests are recommended to detect minimal amounts of RNA such as RT-qPCR.

Key Words: Isolation, Avian Influenza, Newcastle, Viruses, and Risk.

1. INTRODUCCIÓN

La industria avícola en el Ecuador se constituye una de las actividades más dinámicas y modernas del país, siendo su aporte económico de aproximadamente el 23% del valor de la producción agropecuaria nacional, formando parte activa del desarrollo económico del país y siendo un componente básico en la seguridad alimentaria (Sánchez, 2012).

Las enfermedades más importantes que afecta al sector avícola en la provincia de El Oro, específicamente en el cantón Balsas son las de origen viral y entre estas la más importante es el virus de la Enfermedad de Newcastle (ENC) que es uno de los patógenos de mayor importancia social y económica en la industria avícola, debido a su elevada morbilidad y mortalidad, presentando un amplio rango de hospedadores y afectando a más de 240 especies aviares (The Center for Food Security & Public Health, 2011).

La Enfermedad de Newcastle (ENC) es una enfermedad de importancia en pollos y otras especies aviares a nivel mundial, la naturaleza y magnitud de la enfermedad varía entre países (King, 1999); sin embargo, continúa siendo una de las principales entidades patológicas que afecta a la industria avícola mundial y aunque aparenta estar controlada en la mayoría de países, frecuentemente se presentan brotes que causan serias pérdidas económicas (The Center for Food Security & Public Health, 2011).

La enfermedad de Newcastle (EN) es causada por un virus de la familia Paramyxoviridae, aparece en tres formas: lentogénica o leve, mesogénica o moderada, y velogénica o muy virulenta; también llamada enfermedad exótica de Newcastle. Las cepas lentogénicas cursan con signos respiratorios leves y caída de la postura en las aves más sensibles. Las cepas mesogénicas dan lugar a formas clínicas agudas, cursando con sintomatología respiratoria y las alteraciones nerviosas no son frecuentes. En aves ponederas se produce una caída brusca de la puesta que puede persistir durante semanas, con afectación de la calidad de la cáscara (Alexander, 2003).

La influenza aviar (IA), conocida comúnmente como gripe aviar, es una infección viral zoonótica causada por virus de la familia *Ortomixoviridae*, que afecta tanto a aves como a mamíferos, incluido el ser humano. La IA se constituye en una

serie amenaza para la industria avícola a nivel mundial. Las aves migratorias son consideradas como los reservorios primarios del virus de la IA quienes las transportan asintomáticamente y pueden causar enfermedad leve o severa en las aves de corral (OIE, 2012). En Europa, América del Norte, Asia y África existen programas de monitoreo, sin embargo, en Sudamérica, no se ha generado información clara y suficiente. A pesar de que en Ecuador no se ha reportado la presencia de la enfermedad, existe la necesidad de realizar estudios epidemiológicos para monitorear el estatus del virus de la IA en las poblaciones de aves; este estatus puede cambiar si los virus de las cepas que circulan son introducidos por las aves migratorias.

Las aves migratorias y silvestres, son las responsables en primer orden de la distribución y difusión a nivel mundial de la gripe aviar (Garcia, 2015) Cómo se explica qué en forma simultánea se estén presentando brotes de gripe aviar en países tan distantes entre sí como en continentes Europeos, Asiáticos y Americanos; como son los países de China, Canadá, Japón, Alemania, Egipto, Estados Unidos, Reino Unido, Rusia, Corea del Sur, Italia, India, Holanda, Suecia, Taiwán, entre otros.

Analizando las posibles causas, usando la lógica y el sentido común, indudablemente las aves migratorias y silvestres resultan las responsables en primer orden de la distribución y difusión a nivel mundial de esta enfermedad apoyadas por el hombre y la aviación comercial, favorecidas en segundo lugar por los fenómenos naturales derivados del calentamiento global y el cambio climático que las ha obligado a cambiar ciertos trayectos de sus rutas migratorias tradicionales o a prolongar los mismos en busca de alimentos o sitios para descansar y continuar sus viajes, razón por la cual están pasando por países que antes no cruzaban. (OIE, 2012).

Esta es la razón el por qué durante todo el año 2014 y seguramente de ahora en adelante se están encontrando aves migratorias de diferentes especies muertas bien por hambre o por debilidad e igualmente se conocen reportes de observación de grupos de aves migratorias que al cruzar el cielo de un momento a otro algunas se desploman y caen a tierra mostrando un estado físico deplorable

La presente investigación se realizó con el fin de conocer el estado epidemiológico de aves silvestres y migratorias de la provincia de El Oro, frente a la enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar por lo que se planteó los siguientes objetivos:

- Determinar de la presencia del virus de la Influenza Aviar y enfermedad de Newcastle en aves silvestres incluidas migratorias en humedales de la provincia de El Oro.
- Evaluar la presencia del virus Influenza Aviar en aves silvestres incluidas las migratorias.
- Determinar los factores de riesgo del virus de la enfermedad de Influenza Aviar y Newcastle en la provincia De El Oro.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

La enfermedad del Newcastle según (Serma, 2011) es considerada como la enfermedad de mayor incidencia en aves en el mundo; ésta es producida por cepas de *Paramixovirus* aviar tipo1, cuya patogenicidad varía desde baja (lentogénica), moderada (mesogénica), hasta alta (velogénica).

2.1.1. Sinonimias

- Neumoencefalitis
- Neumoencefalitis Aviar,
- Pseudopeste aviar
- Peste de diarrea verde.

2.1.2. Epidemiología

La presencia de la enfermedad varía significativamente entre las aves mantenidas como mascotas y las aves de corral. Las gallináceas en especial los pollos son los más susceptibles a la enfermedad, la proporcionalidad de las aves de caza (faisanes, perdices, codornices y gallinas de guinea) varía con la especie, en cuanto a los pavos estos son menos susceptibles a presentar síntomas severos. Se han notificado casos clínicos en patos y descrito brotes en avestruces.

Se puede diseminar el virus mediante las aves mascotas sin estar presentar ningún síntoma evidente por más de un año principalmente por los pericos ya que estos son portadores asintomáticos.

En el año 2009 la enfermedad de Newcastle fue inscrita en el listado del código para los animales terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y desde este año es una enfermedad de declaración obligatoria (Araujo R. , 2011).

2.1.3. Etiología

2.1.3.1. Clasificación Taxonómica

Producida por un Paramoxovirus Aviar 1 (APMV-1). Se ha realizado una reclasificación taxonómica, esto posterior al haber efectuado una secuenciación del genoma del virus de la Enfermedad de Newcastle, desde 1999 y se ha reclasificado como un Avulavirus, sub-familia Paramixovirinae, familia Paramixoviridae, y no como un Rubulavirus como anteriormente se le clasificó.

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 (Angulo, 2014).

La enfermedad de Newcastle es una de las patologías más temida por los productores avícolas, debido a su alta morbilidad y mortalidad, generando en consecuencia, cuantiosas pérdidas económicas y menor disponibilidad de alimento a la población. Esta enfermedad afecta notoriamente a las aves de corral debido a su alta susceptibilidad y a las posibilidades de impacto severo. Hasta ahora se considera endémica en muchos países (Araujo J. R., 2011).

2.1.4. Morfología

Es unvirus que se caracteriza por estar recubierto por espículas, mide de 120-180nm de diámetro; envuelto; capside con una simetría helicoidal (Quintana, 2012).

(Marín, 2012), lo describe como un virus que presenta un ARN encapsulado con cadena simple y sentido negativo que corresponde a la familia Paramixoviridae, género Avulavirus. Hablamos de un virus de genoma no segmentado que codifica para 6 proteínas estructurales: proteína de fusión (F), nucleocápside (NP), matriz (M) y fosfoproteína (P) y polimerasa (L), hemoaglutinina-euraminidasa (HN), la proteína V se genera a partir del gen P mediante edición del ARN y se considera no estructura y está relacionada con la inhibición de la respuesta antiviral I. Las glicoproteínas HN y F contienen los determinantes antigénicos responsables del desarrollo de la inmunidad protectora y son las inmunológicamente más importantes (Angulo, 2014).

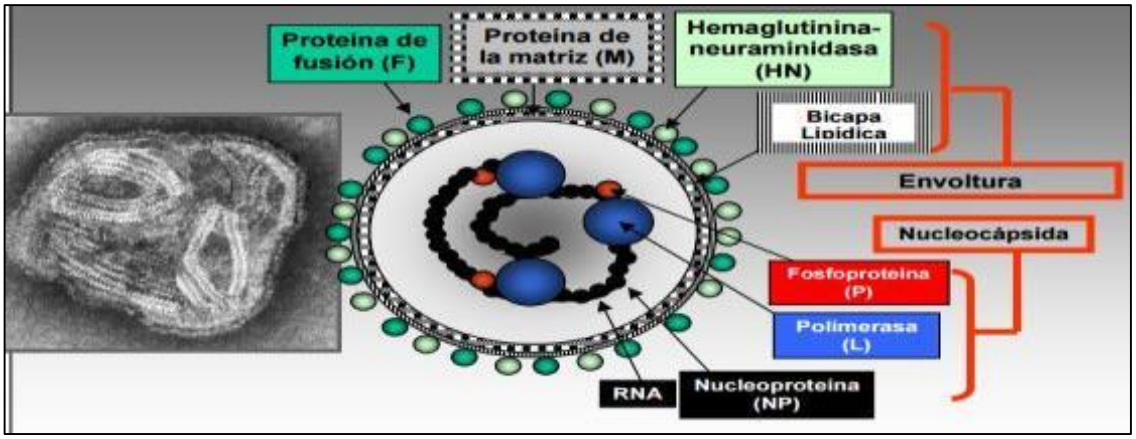


Figura 1: Estructura virus de Newcastle. Micrografía electrónica de un virón de la cepa Clone 30
Fuente: (García-Sastre, 1990)

2.1.5. **Patogenicidad del Virus de Newcastle**

Índice de Patogenicidad

El cambio constante en la virulencia de los diferentes aislamientos víricos de la EN y el uso extensivo de vacunas vivas implica que la identificación de un aislamiento como virus de la EN para aves que muestren signos clínicos no ratifica un diagnóstico de la EN, por lo que siempre se requiere una evaluación de la virulencia del aislado (OIE, Enfermedad de Newcastle, 2004).

Tiempo Medio de Muerte en Huevos

- Se diluye el líquido alantoideo infectivo, estéril y fresco en solución salina estéril para preparar diluciones decimales en serie comprendidas entre 10–6 y 10–9.
- Para cada dilución se inocula 0,1 ml en la cavidad alantoidea de cada uno de cinco huevos embrionarios de aves SPF de 9–10-días de edad y entonces se incuban a 37°C.
- Las diluciones víricas restantes se mantienen a 4°C y se inoculan otros cinco huevos con 0,1 ml de cada dilución 8 horas más tarde y se incuban a 37°C.
- Cada huevo se examina dos veces al día durante 7 días y se registran los tiempos a los que muere cada embrión.

- La dosis letal mínima es la dilución vírica más alta que causa la muerte de todos los embriones inoculados con ella.
- El tiempo medio de muerte (MDT) es el tiempo medio en horas en el que la dosis letal mínima provoca la muerte de todos los embriones inoculados.
- El MDT se ha utilizado para clasificar las cepas del virus de la EN dentro de los grupos siguientes: velogénico (tarda menos de 60 horas en matar); mesogénico (tarda entre 60 y 90 horas en matar) y lentogénico (tarda más de 90 horas en matar) (Moreno, 1994).

Índice de Patogenicidad Intracerebral

- El líquido alantoideo infectivo y fresco con un título HA >24 (>1/16) se diluye 1/10 en solución salina isotónica estéril sin aditivos, tales como antibióticos.
- Se inyectan por vía intracerebral 0,05 ml del virus diluido en diez polluelos procedentes de huevos de un grupo de aves SPF. En el momento de la inoculación, estos polluelos deben tener más de 24 horas y menos de 48 horas.
- Las aves se examinan cada 24 horas durante 8 días.
- En cada observación, las aves se puntúan: 0 si es normal, 1 si está enferma y 2 si está muerta. (Los individuos muertos deben puntuarse como 2 en cada una de las observaciones diarias siguientes a la muerte).
- El índice de patogenicidad intracerebral (ICPI) es la puntuación media por ave y por observación durante el periodo de 8 días. Los virus más virulentos presentarán índices que se aproximan a la puntuación máxima de 2,0, mientras que las cepas lentogénicas presentarán valores próximos a 0,0.

Las cepas lentogénicas y algunas cepas mesogénicas tendrán valores IVPI de 0, mientras que los índices de las cepas virulentas se aproximarán a 3,0. Se han recomendado algunas variaciones en estas pruebas. El muestreo de la cloaca y de la conjuntiva de pollos de 8 semanas con líquido alantoideo no diluido se ha sustituido por la prueba IVPI. La intención es distinguir entre los virus velogénicos viscerotrópicos y los velogénicos neurotrópicos (OIE, Enfermedad de Newcastle, 2004).

Índice de Patogenicidad Intravenosa

- El líquido alantoideo infectivo recogido en fresco (que no debería tener más de 24–48 horas y que debería demostrarse que está exento de contaminación bacteriana) con un título HA de >24 (>1/16) se diluye 1/10 en solución salina isotónica estéril.
- Se inyecta por vía intravenosa 0,1 ml del virus diluido en diez pollos SPF de seis semanas.
- Se examinan las aves a intervalos de 24 horas durante 10 días y se puntúa cada observación: 0 si es normal, 1 si está enferma, 2 si está paralizada o muestra algunos signos nerviosos y 3 si está muerta. (Los individuos muertos deben puntuarse como 3 en cada una de las observaciones diarias siguientes a la muerte).
- El índice de patogenicidad intravenosa (IVPI) es la puntuación media por ave y por observación durante el periodo de 10 días.

Las cepas lentogénicas y algunas cepas mesogénicas tendrán valores IVPI de 0, mientras que los índices de las cepas virulentas se aproximarán a 3,0 (OIE, Enfermedad de Newcastle, 2004).

Interpretación de los Índices de Patogenicidad

No resulta sencilla la interpretación de los índices de patogenicidad, el objetivo es controlar las cepas que son significativamente más virulentas que las cepas lentogénicas, tales como la Hitchner-B1 o La Sota. Como los virus capaces de producir una enfermedad bastante severa pueden tener valores IVPI de 0, se utiliza la prueba ICPI con más frecuencia para tales valoraciones. Sin embargo, como en esta prueba cepas diferentes muestran un rango de valores desde 0,00 hasta 2,00, está claro que cualquier valor utilizado para definirlas debe regirse por el sentido práctico (OIE, Enfermedad de Newcastle, 2004).

2.1.6. Cepas del Virus de NC

- **Velogénica Viscerotrópica:** Cepa muy virulenta de la enfermedad, caracterizada principalmente por presentarse hemorragias en el tracto digestivo.

- **Velogénica neurotrópica:** Después de una clara evidencia de signos respiratorios y nerviosos se produce una alta mortalidad.
- **Mesogénica:** Se caracteriza por una disminución en la producción de huevos con presencia de signos respiratorios y raramente nerviosos con una baja mortalidad.
- **Lentogénica Respiratoria:** Se caracteriza por su mortalidad en pollitos con una infección respiratoria inaparente a leve.
- **Asintomática Entérica:** Se caracteriza por ser una infección inaparente de preferencia entérica. (Briseño, 2012).

2.1.7. Ciclo Biológico del Agente

Las aves son el principal reservorio del virus. El virus se disemina de ave a ave por contacto directo e indirecto, por descargas nasales mediante aerosoles o por vía digestiva, pero en menor frecuencia por sus heces o por contaminación del agua o alimentos. La enfermedad puede ingresar a la granja por el ingreso de personas ajenas a la misma ya que estas personas pueden introducir el virus en su vestimenta, vehículos y equipos que posean (Araujo R. , 2011).

Nos manifiesta la que la transmisión del virus se da durante el tiempo de incubación y por un corto tiempo durante la convalecencia. Las palomas son capaces de transmitir el virus de manera continua durante un año o más. Algunas aves silvestres como es el caso de los cormoranes por ejemplo son una clara muestra que pueden transmitir brotes en las aves domésticas. El virus se puede encontrar post morten en todas las partes del cuerpo del ave infectada (OIE, Organización Mundial de Saninad Animal, 2013).

La propagación e implantación del virus por las vías respiratorias le sigue la replicación del virus por las células del epitelio mucoso del tracto respiratorio es aquí donde alcanza la respiración sanguínea para luego realizar una segunda replicación en órganos viscerales y dar origen a una nueva liberación del virus mediante vía sanguínea, lo que produce que en algunos caso se localice en el sistema nervioso central (Araujo R. , 2011).

La presencia del virus en el medio ambiente y sus síntomas clínicos en esta enfermedad se relacionan a la segunda liberación de este en la sangre, El

transcurso de la enfermedad clínicamente estará determinada por el modo de defensa que pueda desarrollar el hospedador en esta fase (Quintero, 2012).

2.1.8. Periodo de Incubación

El periodo de incubación luego de una exposición natural varia de 2 a 15 días con un rango de 5 a 6 días (Cuello et al., 2011).

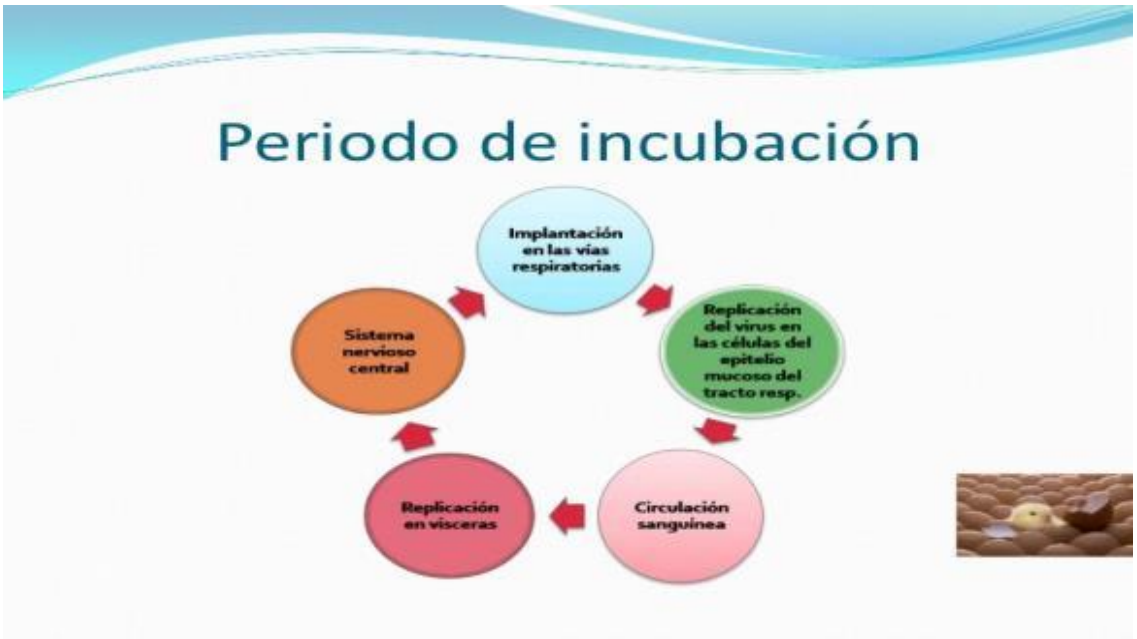


Figura 2. Periodo de incubación y ciclo biológico del Virus de Newcastle.

2.1.9. Signos Clínicos

Según la presentación de los signos clínicos se diferencian por factores como: cepa del virus, especie de ave infectada, edad del hospedador (por lo general las aves jóvenes son más propensas), estatus inmunes, estrés ambiental, y si hay una infección simultánea con otros organismos (OIE, Organización Mundial de Saninad Animal, 2013).

Las infecciones con sepas sumamente virulentas es capaz de producir una gran mortalidad, aunque no se evidencien síntomas clínicos.

La enfermedad surge de una forma rápida y sus síntomas se manifiestan entre dos a doce días post exposición y se difunde rápidamente a toda la parvada. Algunas cepas se caracterizan por afectar al sistema nervioso sistema respiratorio o digestivo.

Los signos clínicos incluyen:

- **Signos Respiratorios:** jadeo, tos, estornudos y ruidos al respirar.
- **Signos Nerviosos:** tembladera, parálisis de las alas y las patas, cuello torcido, desplazamiento en círculos, espasmos y parálisis.
- **Signos Digestivos:** diarrea.
- **Una interrupción que puede se completa o parcial en la producción de huevos.** La presencia de anomalías como el color, forma y superficie con una albumina acuosa son comunes que se manifiesten.
- **La mortalidad es variable** alcanzando hasta el 100% (OIE, Organización Mundial de Saninad Animal, 2013).

2.1.10. Lesiones Macroscópicas

Ausencia en la presencia de lesiones patognomónicas relacionadas a la enfermedad. Su severidad y la presencia de la enfermedad están muy relacionadas con los diversos factores de patogenicidad ya descritos, en la afección del sistema respiratorio se observa lesiones hemorrágicas y congestión de la tráquea, acompañada de aerosaculitis con presencia de exudado catarral.

Los óvulos flácidos y degenerados se dan principalmente en las aves de postura observándose también hemorragias y palidez de otros órganos reproductivos como también se observan yemas de huevos en la cavidad abdominal.

La observación de lesiones hemorrágicas en el tracto gastrointestinal, se ha utilizado para realizar una diferenciación de las cepas velogenicas vicerotropicas de las cepas neurotrópicas y esta se caracteriza por presentar lesiones en el proventrículo, ciego, cloaca, tonsilas cecales, tracto intestinal y necrosis en la pared intestina (Noguera, 2003).

2.1.11. Histopatología

Entre las lesiones histopatológicas más referenciales en los órganos y tejidos afectados tenemos:

- **Bazo e Hígado:** podemos observar Hiperemia, hemorragias y cambios vasculares como una degeneración hidrópica de la media, helenización de los capilares y arteriolas, con trombosis en capilares y también necrosis de

las células endoteliales. Además, en algunas ocasiones puede encontrarse necrosis focal en el hígado.

- **Tejidos del Aparato Respiratorio:** La congestión, edema e infiltración de las células linfoides se da por los cambios microscópicos en el epitelio mucoso traqueal. La presencia de exudado mucoso en el lumen traqueal contiene abundantes fagocitos. Los cambios que se presentan en el pulmón a nivel histológico son de carácter proliferativos y exudativo con engrosamiento de las membranas de los sacos aéreos con opacidad por proliferación del tejido conectivo a consecuencia de la infección por el VN.
- **Sistema Nervioso Central:** Se presenta degeneración neuronal, infiltración linfocitaria peri vascular e hipertrofia de las células endoteliales. Estas lesiones parecen encontrarse bien distribuidas sobre toda la médula, cerebro medio, y el cerebro. Por otra parte, hay q considerar que las lesiones de Newcastle deben diferenciarse de las lesiones que también se producen en la encefalomalacia y en la encefalomielitis aviar.
- **Aparato Digestivo:** La presencia de lesiones hemorrágicas y necróticas en toda la mucosa intestinal y proventrículo, son hemorragias que pueden asociarse a procesos ulcerativos (Quintero, 2012).

2.1.12. Diagnóstico

- **Necropsia**

(Alexander, 2003), citado por (Romero, 2003), mencionan que la presencia de lesiones macroscópicas y los órganos afectados en aves infectadas con el VEN están muy relacionadas con la cepa y patotipo del virus infectante, a más de otros factores como como hospedador que pueden afectar la severidad de la enfermedad. No hay lesiones patognomónicas asociadas con ninguna de las formas de la enfermedad.

Puede haber ausencia de lesiones macroscópicas. Las lesiones presentes en intestinos de pollos infectados han sido usadas para diferenciar las formas velogenicas vicerotropicas de los velogenicas neurotrópicas son prominentes en el proventrículo, ciego, e intestino delgado. Hay ausencia de lesiones

macroscópicas en el SNC de las aves infectadas. No siempre hay cambios macroscópicos en tracto respiratorio, pero en caso en haberlo son lesiones de tipo hemorrágico con marcada congestión a nivel de la tráquea. Pueden observarse engrosamiento de sacos aéreos, aerosaculitis y exudado catarral caseoso.

- **Aislamiento Viral**

  En la actualidad este es el método inequívoco para el diagnóstico del VEN, con la cual se puede realizar la caracterización de la cepa infectante. Logrando aislar el virus de hisopados cloacales o descargas del tracto respiratorio. Para realizar la clasificación completa del virus se necesita el aislamiento completo del virus.

  Su capacidad de adaptarse a varios sistemas del hospedar puede hacer difícil demostrar el virus directamente (Gerlach, 1994) citado por (Romero, 2003).

  Para el aislamiento viral, se utilizan muestras procedentes de aves muertas o vivas como exudados traqueales y cloacales que incluyen heces (OIE, 2008). Se necesitan huevos embrionados de 9 a 11 días edad, donde se inoculan las muestras en la cavidad alantoidea, se incuban a 35-37ºC por 4 a 7 días y se examinan diariamente para luego realizar una prueba de hemaglutinación. La acción HA en líquidos estériles puede ocurrir por presencia de subtipos de hemaglutininas de los virus de IA o de los serotipos de Paramixovirus. El líquido no estéril podría contener actividad HA bacteriana. Se debe repetir en caso de ser negativo con fluido alantoideo no diluido como inóculo (OIE, 2008).

  Para la identificación se aplica técnicas serológicas como HI (la más utilizada), VN, inmunodifusión doble o agar gel difusión y ELISA (Alexander, 1998).

  Utilizando antisuero específico en HI, se puede confirmar PMAV-1. Por lo general con el antisuero de pollo preparado se puede usar contra una de las cepas del vENC, utilizando anticuerpos monoclonales que identifican cepas del PMAV-1.

  Cuando el PMAV-3 es aislado de aves en cautiverio o exóticas se dan reacciones entre el PMAV-1 y el PMAV-3, al igual que el PMAV-7 aislado de avestruces, pavos y palomas (OIE, 2004). Los problemas que causen las

reacciones cruzadas entre el vENC y otros PMAVs (Paramixovirus aviares), principalmente con los virus de los serotipos APMV-3 y APMV-7, se pueden solucionar utilizando controles adecuados de antígeno y antisuero (OIE, 2009).

Con el estudio de Inhibición de la Hemaglutinación se puede confirmar la presencia del virus, pero esto no indica si sería un virus patogénico o una cepa virulenta (Alexander et al., 2004). Gracias a su simpleza y economía la aplicación de esta técnica en aislamientos de virus pertenece a un solo serotipo, (Alexander, 1997; Alexander, 1998; OIE, 2008).

La presencia de signos clínicos en aves no confirma un diagnóstico de ENC, ya sea por la utilización de vacunas vivas, así como los cambios en la virulencia de los aislamientos víricos de la ENC. El aislamiento y la identificación viral constituyen el diagnóstico definitivo (Alexander, 1997) del mismo modo utilizando métodos moleculares que detecten el virus, y la determinación de su potencial de virulencia (Barbezange y Jestin, 2002; Creelan et al., 2002; Li y Zhang, 2004).

Para los aislados del vENC la caracterización patogénica se realiza, de acuerdo por lo dispuesto por la OIE (2008), por el ICPI en pollitos SPF que estén con 1 día de edad y por la determinación de la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión del péptido conectante de la proteína F. Se debe aclarar que no se confirma la ausencia del virus con la falta de detección de virus o la detección de vENC sin muchos aminoácidos básicos en el punto de escisión de F0 utilizando técnicas moleculares (Sánchez y Vizcaíno, 2009) (Endara, 2014).

- **Caracterización Molecular**

Los estudios moleculares son especialmente útiles para:

- La detección de agentes causales, bacterianos, víricos o parasitarios, generalmente de aislamiento costoso.
- Genotipado de estos agentes. Las técnicas moleculares permiten en muchos casos no solamente detectar la presencia de un agente, sino también caracterizar mejor estos agentes, diferenciando distintos tipos de cepas o entre cepas campo y cepas vacúnales.

- Cuantificación de agentes causales. Algunas técnicas permiten determinar exactamente el número de copias de genoma presentes en una muestra. Aunque actualmente estas técnicas son utilizadas mayoritariamente a nivel experimental, en un futuro puede ser que resulten útiles en el diagnóstico de determinadas patologías (Natalia Majo, 2011).

- **Prueba de la Hemaglutinación**

Esta prueba fue descrito por Hirst en 1941, el observo mediante un embrión de pollo la aglutinación de los glóbulos rojos en un vaso sanguíneo quien observo en un embrión de pollo la aglutinación de glóbulos rojo roto, mientras realizaba pases de virus de influenza en el líquido alantoideo. Hirst reconoció la importancia de este hallazgo y describió la hemoaglutinación como un método para ensayo de virus. Se define aglutinación a la interacción in vitro de un antígeno particulado (por lo general células) con su anticuerpo específico (ICA, 2009).

La Hemoaglutinación es la característica que tienen ciertos virus para unir y aglutinar eritrocitos de mamíferos y aves, debido a las proteínas que poseen en su capa externa Esta hemoaglutinación inducida por virus puede usarse para facilitar la identificación de un virus desconocido (ICA, 2009).

.

Las pruebas diagnósticas simples, rápidas y poco costosas para la demostración de antígenos han reemplazado las técnicas tradicionales, largas y dispendiosas y esto ha producido una mayor agilidad en la definición del diagnóstico. Una capa delgada difusa de glóbulos rojos en el fondo del receptáculo (capa de microtítulo) o del tubo, indica hemaglutinación positiva, mientras que una compacta corresponde a hemaglutinación negativa. La dilución más alta de virus que causa hemaglutinación completa contiene una unidad HA (ICA, 2009).

Usos de la Hemaglutinación

- El diagnóstico para la identificación de un virus aislado.
- Se utiliza para titular partículas virales activas o inactivas en una suspensión.
- Se puede purificar y concentrar virus.

- En investigación es de gran importancia biológica en la unión de los virus a células hospedadoras, su liberación y posibles mecanismos de infección.
- La prueba en placa permite determinar la presencia de virus hemaglutinantes en el líquido infectado.

La característica principal de la técnica de hemoaglutinación viral es la rapidez, además del bajo costo de los reactivos y la simplicidad de su realización, por lo que determina su fácil adaptación al laboratorio de escasa infraestructura (Bug, 2014).

- **Prueba de la Inhibición de la Hemaglutinación**

La Inhibición de la hemoaglutinación es una prueba que revela tanto IgG e IgM, es decir podemos realizar una detección temprana de respuesta inmune, se necesita para su ejecución de glóbulos rojos de aves como del antígeno inactivado. El Paramixovirus se especializa por poseer proteínas de membrana o Hemaglutininas, las cuales interactúan con los glóbulos rojos del pollo hemaglutinándolos (Armijos, 2014).

Esta característica es usada en la prueba como un método indicador de las reacciones Antígeno- Anticuerpo. Es una técnica que se lleva a cabo en tres pasos:

- Primer paso consiste en la titulación del Antígeno de Newcastle;
- Segundo es el control de unidades hemaglutinante (la OIE recomienda 4 UHA u 8UHA; cuando se utilizan 8UHA la prueba se hace más sensible y específica)
- Tercer paso es la realización de la Inhibición de la Hemaglutinación con los sueros remitidos para el diagnóstico (Armijos, 2014).

2.1.13. Diagnóstico

2.1.13.1. Diagnóstico clínico

Desde el punto de vista clínico es difícil llegar a un diagnóstico definitivo, casi siempre es necesario de pruebas de laboratorio que permitan confirmar esta enfermedad (Viveros M., 2012).

2.1.13.2. Diagnóstico Diferencial

La enfermedad de Newcastle debe diferenciarse de:

- Cólera aviar
- Influenza Aviar
- Laringotraqueitis
- Psitacosis (Clamidiasis en aves psitácidas)
- Micoplasmosis
- Bronquitis infecciosa
- Malos manejos, tales como ausencia de agua, alimento y ventilación (HIPRA, 2013).

2.1.14. Tratamiento

No existe ningún tratamiento contra la enfermedad de Newcastle y una vez que se ha presentado un brote es difícil y costosa la erradicación del virus que la causa. La protección de las parvadas contra los efectos devastadores de la enfermedad de Newcastle se logra mediante vacunación y bioseguridad (Malo, 2011).

2.1.15. Control y Prevención

De acuerdo con las normas de la OIE un país se considera libre de Newcastle cuando la enfermedad no se ha presentado en el mismo como mínimo en los 3 últimos años.

Una zona de un país en la que se ha presentado la afección se vuelve a estimar libre de esta enfermedad si desde la conclusión de las medidas saneamiento y desinfección pasaron como mínimo 21 días – o bien, cuando no se han adoptado

medidas de saneamiento, 6 meses desde la curación clínica o la muerte del último animal afectado (OIE, 2012).

2.1.16. Vacunas

Constantemente se han manejado vacunas vivas atenuadas o una mezcla de vacunas vivas atenuadas e inactivadas (vivas y muertas) del virus de la enfermedad de Newcastle. El régimen exacto varía dependiendo de las necesidades de la parvada y está relacionado con el nivel local de desafío. Para pollos de engorde, un ejemplo podría ser una vacuna de virus vivo administrada mediante aspersión con gota gruesa al día de edad, seguida de una vacunación en el campo (Malo, 2011).

2.1.16.1. Programa de vacunación

A continuación, se presenta un esquema de vacunación completo, en donde se incluye la enfermedad de la presente investigación:

Cuadro 1. Esquema de Plan de vacunación completo.

Edad	Tipo de vacuna	Aplicación
1 día	Influenza aviar/Viruela	Cuello
7 días	*Newcastle/Bronquitis/Gumboro*	Ocular
15 días	*Gumboro*	Ocular
21 días	*Newcastle/Bronquitis/Gumboro* *Newcastle/Bronquitis oleosa*	Ocular Cuello
8 semanas	*Newcastle/Bronquitis* *Viruela/Encefalomielitis*	Ocular/Agua/Aspersión Ala
11 semanas	*Newcastle/Influenza* *Cólera aviar* *Coriza ABC* *Newcastle/Bronquitis* *Viruela/Encefalomielitis*	Pechuga Cuello Pechuga Ocular/Aerosol Ala
16 semanas	*Newcastle* *Newcastle/Bronquitis/Coriza* *Cólera Aviar viva* *Influenza Aviar*	Ocular Pechuga Ala Cuello

Fuente: http://www.webveterinaria.com/virbac/news16/aves.pdf
(OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal, 2013)

2.1.17. INFLUENZA AVIAR

Según la influenza aviar, es producida por el virus tipo “A”, la misma afecta a distintas especies avícolas que son utilizadas para el consumo humano, tales como, (pollos, pavos, codornices, gallina de guinea, etc.), del mismo modo afecta a aves de compañía y aves silvestres. Algunas cepas pueden ocasionar altos índices de mortalidad. Se ha aislado el virus en algunas especies de mamíferos, en los que están incluidos los humanos, ratas y ratones, así como comadrejas y hurones, cerdos, gatos, tigres y perros (Jong-wook, 2005).

La influenza aviar se refiere a la infección de aves con virus de influenza aviar tipo A. Este virus se encuentra de forma natural entre las aves acuáticas de todo el mundo y puede infectar a las aves de corral domésticas y a otras aves y otras especies animales. Las aves acuáticas salvajes pueden infectarse con los virus de la influenza aviar A en los intestinos y el tracto respiratorio, pero en general no se enferman. Sin embargo, los virus de la influenza aviar A son contagiosos entre las aves y algunos de estos virus pueden enfermar y hasta matar a ciertas especies de aves domésticas, incluidos los pollos, los patos y los pavos (Jong-wook, 2005).

2.1.18. Sinonimia

La forma altamente patógena (HP AI) es conocida también como:

- *Gripe Aviar*
- *Fowl Pest*
- *Fowl Gripe*
- *Peste aviare*
- *Geflugelpest” etc.*

2.1.19. Epidemiología

Se han aislado los virus de influenza aviar A de más de 100 especies diferentes de aves silvestres, la mayoría de estos virus han sido virus LPAI. Estas aves silvestres son consideradas comúnmente reservorios (huéspedes) de los virus de influenza aviar A. Aves silvestres como gaviotas, golondrinas y aves costeras

o acuáticas, como patos, gansos, y cisnes son algunas de las aves silvestres de donde se han encontrado estos virus (CDC, 2015).

2.1.20. Etiología

Virus de la familia Orthomyxoviridae, género Influenzavirus A, B. Hasta la fecha todos los microorganismos altamente patógenos aislados han sido virus A de influenza de los subtipos H5 y H7 (Swayne, Halvors, & A., 2003).

Resistencia a la acción física y química.

Temperatura: Inactivación 56°C/3 horas; 60°C/30 min pH: Inactivado a pH ácido. Productos químicos: Inactivado por agentes oxidantes, dodecil sulfato de sodio, disolventes de lípidos, ß-propiolactona Desinfectantes: Inactivado por formalina y compuestos de yodo (Swayne, Halvors, & A., 2003).

2.1.21. Clasificación Taxonómica

El agente etiológico de la influenza aviar es un virus que ha sido clasificado dentro de la Familia Orthomyxoviridae, del género Influenzavirus, este se caracteriza por ser un virus ARN, de simetría helicoidal y con envoltura lipoproteíca, en donde se asientan las glucoproteínas o antígenos de superficie: Hemoaglutinina (H), Neuroaminidasa (N) y la proteína M2 (Aguado, 2014).

Se clasifica con base a sus diferencias antigénicas en la nucleoproteína (NP) y en la proteína matriz (M1) en los tipos: A, B y C (García, 2009).

2.1.22. Morfología

Las partículas del virus están formadas por una bicapa lipídica la misma que se deriva de la célula huésped, en donde se encuentran embebidas las glicoproteínas HA (en mayor proporción), NA y la proteína M2, la proteína Matriz forma una capa interna. Dentro del tipo A se encuentran clasificados todos los virus de influenza aviar A, el genoma está constituido por 8 fragmentos únicos de RNA de cadena sencilla con polaridad negativa, los mismos que codifican para una proteína cada uno, mientras que los fragmentos séptimos y octavo para dos (García, 2009).

2.1.23. Patogenicidad del virus de Influenza Aviar

- **Índice de Patogenicidad**

El IAAP indica la patogenicidad en los pollos y la presencia de cepas de virus altamente patógenas. La denominación peste aviar se ha olvidado para dar lugar a la denominación más exacta de IAAP. Dado que los virus naturales de la IAAP descritos hasta hoy han sido los subtipos H5 y H7 y debido a que diversos estudios genómicos han descrito que los virus de la IAAP derivan de la mutación de los virus de la IALP H5/H7, todos los virus de la IALP H5/H7 son reconocidos como potencialmente patógenos.

Los cambios de patogenicidad están asociados a cambios en el punto de corte proteolítico de la hemaglutinina como los siguientes:

- Sustitución de aminoácidos no básicos por aminoácidos básicos (arginina, lisina)
- Inserción de múltiples aminoácidos básicos de codones duplicados del punto de escisión de la hemaglutinina.
- Insertos pequeños de aminoácidos básicos y no básicos de procedencia desconocida.
- Una recombinación con insertos de otros segmentos genéticos que alargan el punto de escisión proteolítica.
- Perdida del área de glucosilacion protectora en el residuo 13 en combinación con varios aminoácidos básicos en el punto de escisión

La secuenciación de los aminoácidos en los puntos de escisión de las cepas de influenza subtipos H5 y H7 ligeramente patógenos nos admitirá identificar los virus que tienen la capacidad de cambiar en muy patógenos luego de sufrir una mutación puntual. La OIE ha adoptado los siguientes criterios para determinar la patogenicidad de virus de la influenza tipo A:

Se utiliza uno de los dos métodos siguientes para comprobar la patogenicidad en los pollos. Un virus influenza tipo A de alta patogenicidad es:

- Cualquier virus influenza tipo A que sea letal para seis, siete u ocho pollos susceptibles de 4–8 semanas de edad dentro de los 10 días posteriores a la

inoculación intravenosa de 0,2 ml de una dilución a 1/10 de líquido alantoideo infectivo libre de bacterias.

- Cualquier virus que tenga un índice de patogenicidad intravenosa (IPIV) de 1,2 o superior.

El procedimiento de cálculo del IPIV es el siguiente:

- Se diluye a 1/10 en solución salina estéril isotónica el líquido alantoideo infectivo fresco con un título de HA >1/16
- Se inyectan por vía intravenosa 0,1 ml del virus diluido a diez pollos susceptibles de 6 semanas de edad; siempre que sea posible deben utilizarse pollos SPF. Las aves se examinan en intervalos de 24 horas durante 10 días.
- Durante cada observación, cada ave se puntúa como 0 si se encuentra normal, 1 si está enferma, 2 si está muy enferma, y 3 si se ha muerto.

La observación sobre las aves enfermas o muy enfermas es una valoración clínica subjetiva. Normalmente, las aves “enfermas” deberían manifestar uno de los siguientes signos, y las “muy enfermas” más de uno: afectación respiratoria, depresión, diarrea, cianosis en la piel expuesta o en las barbas, edema en la cara y/o en la cabeza, signos nerviosos. Las aves muertas deben puntuarse como 3 en cada uno de los días siguientes de observación después de la muerte

El IPIV es la puntuación media por ave por observación calculada según las puntuaciones anotadas a lo largo de un periodo de 10 días. Un índice de 3,00 significa que todas las aves murieron en 24 horas, y un índice de 0,00 significa que ningún ave mostró signo clínico alguno durante los 10 días del periodo de observación.

Para todos los virus H5 y H7 levemente patógenos en pollos, debe determinarse la secuencia de aminoácidos del péptido de conexión de la hemaglutinina. Si la secuencia es similar a la observada para otras cepas de la IAAP, la cepa analizada se considerará IAAP (OIE, Influenza Aviar, 2015).

2.1.24. Cepas del Virus de Influenza Aviar

- **Influenza aviar poco patógena:** Produce pocos o ningún signo clínico en las aves.

- **Influenza aviar altamente patógena**: Produce signos clínicos graves y/o alta mortalidad entre las aves (CDC, 2015).

2.1.25. Ciclo Biológico del Agente

La vía respiratoria y la oral constituyen las puertas de entrada del virus. El virus primeramente se multiplica en las mucosas conjuntival, respiratoria e intestinal, para luego distribuirse en la sangre (viremia). Se realiza una multiplicación secundaria en los órganos, sobre todo en el tracto respiratorio y digestivo. Las cepas altamente patógenas se distribuyen por todo el organismo.

Figura 3. Ciclo biológico del virus de Influenza Aviar
Fuente: (Sevilla, 2014)**.**

Las aves que se encuentran enfermas eliminan el virus por las secreciones de las mucosas nasales, boca, ojos, y por las heces. Los virus que son elevadamente patógenos por lo general se han encontrado en gallinas y pavos y pueden permanecer activos durante periodos largos en heces que se encuentran infectadas, así como tejidos y agua (CReSA, 2013).

Existen aves que pueden constituirse reservorios del virus como las aves silvestres, que pueden llevar el virus principalmente en el tracto respiratorio o intestinal, pero no suelen adquirir la infección

Trascendentalmente son conocidas como reservorios de virus de la influenza aviar, en su mayoría de baja patogenicidad. Por este motivo, se han tomado

distintas medidas para vigilar la presencia y características de la influenza aviar en las aves silvestres (OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal, 2013).

2.1.26. Periodo de Incubación

El periodo de incubación es de 3 a 5 días (CReSA, 2013).

2.1.27. Signos Clínicos

En su forma leve: Entre los principales signos que se manifiestan en la enfermedad se encuentran plumaje erizado, reducción de la producción de huevos o efectos leves en el sistema respiratorio

En su forma grave: Además de que el virus afecta al tracto respiratorio, también ataca varios órganos y tejidos y puede ocasionar hemorragia interna masiva.

Las aves que se encuentren infectadas con influenza aviar altamente patógena (incluida la cepa H5N1) pueden presentar todos o algunos de los siguientes signos clínicos:

- Postración y depresión extrema.
- Caída repentina de la producción de huevos, varios huevos con cáscara blanda o sin cáscara.
- Edema y congestión de carúnculas y crestas.
- Edema de la piel debajo de los ojos.
- Tos, estornudos y signos nerviosos.
- Diarrea.
- Hemorragias en el jarrete.
- Se pueden producir algunas muertes durante varios días, seguidas de una difusión rápida y una tasa de mortalidad cercana al 100% dentro de las 48 horas (OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal, 2013).

2.1.28. Lesiones Macroscópicas

Las lesiones macroscópicas dependen de la especie afectada y de la patogenicidad del virus infectante por lo que es muy variable. En cepas de patogenicidad media se puede observar principalmente inflamación catarral ser

fibrinosa y fibrinosa en senos; edema en tráquea con secreción serosa y ruptura de óvulos en la cavidad ocasionando peritonitis, enteritis catarral o fibrinosa.

Las cepas de alta patogenicidad pueden producir congestión y hemorragia transudativa, con cambios necróticos en órganos como tráquea, proventrículo, intestinos, cloaca, óvulos, focos necróticos en hígado, bazo y riñón congestión y hemorragia subcutánea en muslos y patas. En aves con muerte súbita no se observan lesiones aparentes en órganos (Brett & Saume, 2006).

2.1.29. Histopatología

Se pueden observar edema, hiperemia, hemorragia y acumulo linfoide perivascular con degeneración y necrosis parénquimal en miocardio, cerebro, bazo y riñón. Acumulo linfoide perivascular, proliferación vascular, necrosis focal y cambios neuronales en cerebro. Algunas cepas pueden producir pancreatitis severa. Las lesiones varían de acuerdo con la especie y la cepa infectante (Brett & Saume, 2006).

2.1.30. Diagnóstico

- **Necropsia**

Los senos nasales pueden o no estar inflamados, y la cresta y barbilla con frecuencia se observan edematosas, hemorrágicas, congestivas o cianóticas. Además, puede haber edema subcutáneo en la cabeza y el cuello, edema y hemorragias subcutáneas difusas en las patas, líquidos (que pueden contener sangre) en los orificios nasales y en la cavidad bucal y congestión, inflamación y hemorragias en la conjuntiva. Puede observarse traqueítis hemorrágica en algunas aves; en otras las lesiones traqueales pueden limitarse a un exceso de exudado mucoide. Los pulmones pueden enrojecerse con hemorragias y congestión, y pueden exudar un líquido al cortarse (Health, 2010).

Pueden observarse petequias en toda la grasa abdominal, en las superficies serosas y en el peritoneo, y a veces pueden encontrarse en los músculos.

También puede haber la presencia de hemorragias en la mucosa y en las glándulas del proventrículo, debajo del recubrimiento de la molleja y en la mucosa intestinal. Los riñones pueden congestionarse gravemente y a veces están obstruidos por depósitos de urato. Los ovarios pueden ser hemorrágicos o degenerativos con áreas de necrosis. La cavidad peritoneal frecuentemente contiene yemas de un huevo roto, lo que puede causar aerosaculitis y peritonitis graves (Health, 2010).

- **Aislamiento viral**

La influenza aviar se puede diagnosticar mediante diversas técnicas, incluido el aislamiento del virus. El virus puede recuperarse a través de exudados orofaríngeos, traqueales o cloacales en aves vivas.Las heces, como muestras pueden sustituirse en las aves pequeñas, si las muestras cloacales no resultan prácticas (por ej., no pueden recolectarse sin dañar al ave).En las aves muertas se analizan los exudados orofaríngeos, traqueales y cloacales (o contenido intestinal) y las muestras de órganos (tráquea, pulmones, sacos aéreos, intestino, bazo, riñón, cerebro, hígado y corazón).En los huevos embrionados se puede realizar el aislamiento del virus; la actividad de hemaglutinación indica la presencia del virus de la influenza (Health, 2010).

De heces de aves vivas se inoculan suspensiones en una solución de antibióticos utilizando huevos de 9 a 11 días de edad, los mismos que tienen que estar inoculados por 2 a 7 días a 37°C. Durante la incubación se analiza si hay acción hemaglutinante en el líquido alantoideo que contiene los embriones. Mediante una prueba de inmunodifusión entre el virus concentrado y un antisuero frente a los antígenos de la nucleocápsida y/o de la matriz, se puede confirmar la presencia de VIA tipo A o bien mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) con líquido alantoideo (OIE, Influenza Aviar, 2015).

El aislamiento en embriones se ha sustituido actualmente, en algunos casos, por la detección directa en muestras de uno o muchos más segmentos del genoma de influenza tipo A mediante RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) o más técnicas moleculares validadas. Para realizar la su tipificación serológica del

virus, en un laboratorio se debe llevar a cabo pruebas de inhibición de la hemoaglutinación y la neuraminasa contra una bacteria de antisueros policlonales o mono específicos para cada uno de los subtipos del virus de la influenza tipo A, determinados por 16 hemoaglutininas (H1-H16) y 9 neuroaminidasas (N1-9) o identificar el genoma para subtipos H y N utilizando detección de ARN con cebadores y sondas específicos de subtipo, análisis filogénico o secuenciación (OIE, Influenza Aviar, 2015).

- **Caracterización Molecular**

En la actualidad, existen 16 subtipos de HA y 9 de NA de los virus influenza A circulando en las aves, y dos de HA y NA en los humanos: H1N1 y H3N2.

Recientemente se descubrió el subtipo H17N10 en murciélagos. De forma general, los subtipos de HA se clasifican dentro de dos grupos o linajes según sus propiedades antigénicas y sus características estructurales principales.

En el Grupo 1, que comprende los subgrupos H1a, H1b y H9, se encuentran el subtipo H1 que conforma las cepas pandémicas de los años 1918 y 2009 y las cepas estacionales de H1, además contiene al subtipo H5 que incluye las cepas aviares de influenza A(H5N1) altamente patogénica (H5N1-IAAP).

El Grupo 2 comprende los subgrupos H3 y H7, y en ellos se concentran las cepas humanas de H3N2 y las cepas aviares de H7N7 altamente patogénicas (H7N7-IAAP) respectivamente.

No existen estudios detallados dentro de los tipos o subtipos, excepto para los subtipos H5 y N1. La mayoría de los subtipos de las HA y las NA han evolucionado produciendo variantes genéticas que definen linajes y sublinajes diferentes, sin embargo, se desconoce cuántos existen. En el caso de los virus influenza B, desde inicios de la década de 1980 se dividieron en dos linajes genética y antigénicamente diferentes: B/Victoria/87 y B/Yamagata/88.

El primero predominó durante la década de los años 80, y el segundo predominó con una distribución geográfica amplia durante la década de los años 90. Desde el año 2000, ambos linajes co-circulan en todo el mundo en proporciones

variadas y en países, regiones y momentos diferentes. Como resultado de la co-circulación, se produjo la emergencia y diseminación mundial de una variante reordenante, con la HA del linaje B/Victoria/87 y la NA del linaje B/Yamagata/88. Todo este panorama dificulta la predicción de su prevalencia futura y las recomendaciones para la composición de una vacuna. Aunque aún no existe un acuerdo en este tema, los autores realizan con una frecuencia mayor los análisis de filogenia de los virus influenza estableciendo las cepas incluidas en las vacunas estacionales como linajes o cepas de referencia. Actualmente este tipo de estudio es muy difundido y se emplea para detectar analogías y divergencias entre los virus circulantes y los que componen las vacunas estacionales (Alexander Piñon et al., 2013).

- **Prueba de Hemaglutinación**

Esta prueba fue descrito por Hirst en 1941, el observo mediante un embrión de pollo la aglutinación de los glóbulos rojos en un vaso sanguíneo quien observo en un embrión de pollo la aglutinación de glóbulos rojo roto, mientras realizaba pases de virus de influenza en el líquido alantoideo. Hirst reconoció la importancia de este hallazgo y describió la hemoaglutinación como un método para ensayo de virus. Se define aglutinación a la interacción in vitro de un antígeno particulado (por lo general células) con su anticuerpo específico.

La Hemoaglutinación es la característica que tienen ciertos virus para unir y aglutinar eritrocitos de mamíferos y aves, debido a las proteínas que poseen en su capa externa Esta hemoaglutinación inducida por virus puede usarse para facilitar la identificación de un virus desconocido.

.

Las pruebas diagnósticas simples, rápidas y poco costosas para la demostración de antígenos han reemplazado las técnicas tradicionales, largas y dispendiosas y esto ha producido una mayor agilidad en la definición del diagnóstico.

Una capa delgada difusa de glóbulos rojos en el fondo del receptáculo (capa de microtítulo) o del tubo, indica hemaglutinación positiva, mientras que una compacta corresponde a hemaglutinación negativa. La dilución más alta de virus que causa hemaglutinación completa contiene una unidad HA.

Usos de la Hemaglutinación

- El diagnóstico para la identificación de un virus aislado.
- Se utiliza para titular partículas virales activas o inactivas en una suspensión.
- Se puede purificar y concentrar virus.
- En investigación es de gran importancia biológica en la unión de los virus a células hospedadoras, su liberación y posibles mecanismos de infección.
- La prueba en placa permite determinar la presencia de virus hemaglutinantes en el líquido infectado.

La característica principal de la técnica de hemoaglutinación viral es la rapidez, además del bajo costo de los reactivos y la simplicidad de su realización, por lo que determina su fácil adaptación al laboratorio de escasa infraestructura (Bug, 2014).

- **Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación**

La Inhibición de la hemoaglutinación es una prueba que revela tanto IgG e IgM, es decir podemos realizar una detección temprana de respuesta inmune, se necesita para su ejecución de glóbulos rojos de aves como del antígeno inactivado. El Orthomyxovirus se caracteriza por poseer proteínas de membrana o Hemaglutininas, las cuales interactúan con los glóbulos rojos del pollo hemaglutinándolos.
Esta característica es usada en la prueba como un método indicador de las reacciones Antígeno Anticuerpo. Es una técnica que se lleva a cabo en tres pasos:

- Primer paso consiste en la titulación del Antígeno de Newcastle;
- Segundo es el control de unidades hemaglutinante (la OIE recomienda 4 UHA u 8UHA; cuando se utilizan 8UHA la prueba se hace más sensible y específica)
- Tercer paso es la realización de la Inhibición de la Hemaglutinación con los sueros remitidos para el diagnóstico (Armijos, 2014).

2.1.31. Diagnóstico Diferencial

- Enfermedades respiratorias, especialmente cólera aviar agudo.
- Enfermedad de Newcastle, patógena.
- Laringotraqueítis infecciosa aguda (SENASA, 2009).

2.1.32. Tratamiento

Actualmente en la mayoría de los países, incluidos EE.UU. y Canadá, no se trata la influenza aviar de alta patogenicidad debido a que no existen medicamentos para tratar la enfermedad en las aves; los brotes de la infección se controlan mediante erradicación (Health, 2010).

2.1.33. Prevención y Control

Las medidas de prevención se ven ligadas principalmente a las prácticas de manejo y las medidas de bioseguridad que se apliquen a un determinado lote intentando evitar la introducción de la enfermedad y su diseminación. Las aves silvestres constituyen una causa potencial de posibles infecciones para las aves domésticas (SENASA, 2009).

Según la FAO (2007e) y OIE (2008) las estrategias de prevención comprometen 2 aspectos:

Una vigilancia y control externo (cuarentena externa) que involucra realizar:

- Reportes de la ocurrencia de brotes en el mundo.
- Requisitos zoosanitarios.
- Diagnóstico de laboratorio.
- Cierre de fronteras.
- Análisis de riesgo.

Una vigilancia y control interno, que involucra realizar;

- Notificación de casos sospechosos.
- Inspección de granjas.
- Muestreo periódico.
- Diagnóstico de laboratorio.
- Control de tránsito.

- Bioseguridad.

Se debe considerar:

- El manejo de la parvada todo adentro/todo afuera, previniendo cualquier contacto con aves silvestres o sus fuentes de agua.
- Evitar la devolución de las aves de granja a los mercados de aves vivas u otros mataderos.
- Evitar la introducción en las explotaciones de aves cuya situación sanitaria se desconoce.
- Implementar estricta higiene y bioseguridad para prevenir la trasmisión del virus en fómites.
- Rápida despoblación de las parvadas infectadas y expuestas.
- Eliminación adecuada de las carcasas y materiales contaminados.
- Aplicar estrictas medidas de bioseguridad.
- Aplicar cuarentenas en granjas.
- Establecer controles de movimiento.
- Realizar la vigilancia epidemiológica.
- Implementar la vacunación.
- Observación de las aves silvestres desde cierta distancia, realizando monitoreos de vigilancia.
- Reportar las aves silvestres muertas o enfermas a los organismos de recursos naturales estatales, tribales o federales.
- Adopción de medidas higiénicas pertinentes por parte de los cazadores que tengan contacto con las aves (Espinoza, 2011).

2.1.34. Vacunación

La vacunación se debe considerar como una medida adicional donde su finalidad primordialmente es disminuir la replicación y la excreción viral. Las reservas de vacunas con las que cuentan algunos países que se encuentran en riesgo de contraer la infección contribuirán a que pueda darse una respuesta rápida, recurriendo a todas las medidas de erradicación disponibles, en los que también se incluye la vacunación si fuese necesaria.

La estrategia de vacunación desde el punto de vista científico, se utiliza para inducir una inmunidad protectora en una población requerida.

Si se realizara un buen programa de vacunación esto aumentaría el nivel de inmunidad protectora dentro de las parvadas y por ende la resistencia a la infección. Gracias a esto las aves que hayan sido vacunadas y que estén expuestas al virus de la IA no resultarían infectadas o, en caso de contraer la infección, el cuadro clínico sería menos grave y la excreción viral sería inferior en términos de cantidad y duración. Todo esto debe ir acompañado de la aplicación de medidas de bioseguridad que resulten eficaces, la aplicación de la vacunación evita la introducción del virus de la IA o, en su defecto, puede reducir su propagación, disminuyendo así los efectos negativos sobre la producción avícola y reduciendo las pérdidas económicas que se obtendrían si se diera un brote de la infección (OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal, 2013).

2.2. SEMEJANZAS Y DIFERENCIAS DEL VIRUS DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR

- **Semejanzas**

Tanto la IA como la enfermedad de Newcastle son enfermedades de declaración obligatoria para la OIE. Ambas enfermedades son contagiadas por aves silvestres y migratorias, portadoras del virus, así como aves acuáticas por medio de las heces y pueden sobrevivir en condiciones húmedas y cálidas durante muchos días, además son susceptibles a los desinfectantes viricidas (OIE, Influenza Aviar, 2015)

- **Diferencias**

los virus de la influenza aviar pertenecen al género Influenzavirus de la familia Orthomyxoviridae A y se considera una enfermedad de baja o de alta incidencia patógena, mientras que la enfermedad de Newcastle es producida por cepas de Paramixovirus aviar tipo 1 y cuya patogenicidad varía desde baja (lentogénica), moderada (mesogénica), hasta alta (velogénica). (Ramos, 2003)

Los signos dependen de la patogenicidad en el caso de Influenza Aviar los signos van desde un comienzo brusco de alta mortalidad que llega hasta 100 % o aves que presentan jadeo, exagerado lagrimeo, sinusitis, edema tanto en la cabeza como en la cara, diarrea y hemorragia subcutánea con cianosis de la piel, también se pueden producir disminucion en la producción de huevo anorexia, depresión; mientras que en la enfermedad de Newcastle el signo más característico es el cuello torcido en S, temblor o dificultad para caminar.

2.3. INOCULACIÓN EN EL EMBRIÓN DE POLLO

Debido a la necesidad de replicar ciertos virus en particular, se han desarrollado varias técnicas de inoculación en el embrión de pollo de cinco a once días de edad, las mismas que son útiles para el diagnóstico, aislamiento, difusión, identificación y caracterización de los virus, como para la producción de vacunas virales. Esto se logra gracias a las características propias que posee el embrión y de sus tejidos que proveen un medio favorable para el cultivo de varios virus (Leon, 2013).

2.3.1. Inoculación

- Observar en el ovoscopio si el huevo es fértil o infértil
- Determinar la edad del embrión
- Localizar la cámara de aire y marcarla
- Marcar donde se encuentra el embrión
- Colocar los huevos fértiles en una porta huevos
- Limpiar la cascara (con una torunda de alcohol yodado, todo, sobre todo, la parte donde se va a inocular y luego limpiar con alcohol)
- Agujerear el cascaron con un taladro dependiendo del sitio donde se vaya a inocular
- Inoculamos el virus
- Tapamos el agujero con parafina
- Luego llevamos a estufa (controlar temperatura y humedad adecuada)
- Controlar y observar dos veces al día, para percatarse si están vivos o muertos (Albino, 2007).

2.3.2. Lugares y Procedimientos de Inoculación

Para poder obtener óptimos resultados en el aislamiento y propagación de los virus, se deben considerar las diferentes vías de inoculación entre las cuales tenemos:

Cavidad alantoidea

Considerada la ruta más importante y frecuentemente usada debido a su facilidad en la inoculación del virus. Se utilizan embriones de 9-11 días de edad y comúnmente se inocula 0.1 ml de suspensión viral (Leon, 2013).

- Primeramente, se realiza la observación del embrión en cuarto oscuro y se marca la cámara de aire y el sitio de inoculación, se perfora el cascarón en el sitio marcado y se inocula mediante una jeringa de 1.0 ml graduada en décimas y con aguja calibre 25G x 16 mm, ésta se introduce de forma recta y aproximadamente las primeras dos terceras partes de la longitud de la aguja con el fin de depositar el virus en la cavidad.
- El orificio se sella con parafina y se incuba el embrión a 37 °C.

Saco Vitelino

Se realizan los procedimientos básicos de ovoscopía e identificación de estructuras, para esta vía se emplean embriones de cinco a siete días de edad, generalmente se inocula 0.1 ml del virus bajo estudio por cada embrión con un jeringa de 1.0 ml graduada en décimas, con aguja calibre 25Gx 16 mm (Leon, 2013).

- Se realiza una perforación en la parte superior de la cámara de aire y con una jeringa de tuberculina graduada en décimas y con aguja del número 25G x 16 mm, se introduce en toda su longitud para depositar el inóculo.
- Inoculado el huevo, se sella y se incuba a 37 °C.

Membrana Corioalantoidea

Se emplean embriones de 9 a 11 días de edad y se inoculan con 0.1 ml de la dilución del virus. Es una vía apropiada para el aislamiento de virus de la viruela,

virus de la Laringotraqueítis aviar, virus de la enfermedad de Aujezsky, entre otros que producen pústulas visibles (Leon, 2013).

- En cuarto oscuro, con ayuda del ovoscopio y el perforador de huevo, se realiza un orificio fino en la cámara de aire, así mismo de forma cuidadosa en la cara lateral del huevo, pero sin lesionar la membrana Corioalantoidea. Con ayuda de una cánula y la boca, ejercer presión negativa en el orifico localizado en la cámara de aire, lo suficiente para realizar una falsa cámara en la parte lateral del huevo o hasta que aparezca esta. Una vez realizada la cámara falsa a todos los embriones, estos se colocan de manera horizontal en relación a su eje longitudinal y sobre la charola de plástico o de cartón que los acompaña.
- Se Inocula con 0.1 ml de virus bajo estudio por embrión.
- Sellar el orifico con parafina y se los coloca en la incubadora a 37 °C.

2.4. RT- PCR EN TIEMPO REAL

Una de las estrategias que se siguen para no tener que realizar el procesamiento post-amplificación consiste en la utilización de las técnicas de la RT-PCR (rRT-PCR) en tiempo real. La ventaja de estas pruebas es que la rRTPCR basada en el uso de sondas de hidrólisis fluorogénica o de tinciones fluorescentes hace innecesaria la fase de procesamiento post-amplificación y se pueden obtener los resultados en menos de 3 horas.

La aplicación más eficaz de las pruebas de la rRT-PCR se realizó en EE.UU. cuando ocurrieron los brotes de la Enfermedad de Newcastle en el 2002–2003, se aplicó la prueba descrita por Wise et al, que mostró una sensibilidad del 95% en comparación con el aislamiento del virus para más de 1.400 muestras (OIE, 2008).

La prueba se realiza con tres conjuntos de cebadores y sondas que se utilizan en reacciones independientes: un conjunto de cebadores/sondas para la matriz que está diseñado para detectar la mayoría de las cepas del NDV, un conjunto de cebadores/sondas de fusión con los que se puede identificar cepas virulentas del NDV (incluyendo muchos virus PPMV1) y un conjunto de cebadores/sondas diseñados para detectar cepas de virus de baja virulencia (OIE, 2008).

Primero se examinan las muestras con los cebadores/sondas, luego se ensayan las muestras positivas con las de baja virulencia y con la fusión y los conjuntos de cebadores/sonda para confirmar la presencia de los virus de poca virulencia y los de mucha virulencia, respectivamente (Armijos, 2014).

2.5. AVES MIGRATORIAS

Sin lugar a dudas las aves migratorias son las responsables de la diseminación y expansión a nivel mundial de la gripe aviar (Garcia, 2015).

2.5.1. Epidemiologia Mundial

De qué manera podemos explicar que de una forma simultanea se estén presentando brotes entre países tan distanciados. Considerando las posibles causas y la lógica se debe considerar a las aves migratorias como las responsables de la distribución y expansión a nivel mundial de esta enfermedad sin olvidar la intervención del hombre mediante la aviación comercial ayudadas en segundo lugar por los diverso fenómenos naturales producidos por el calentamiento global y cambio climático viéndose así estas obligadas a cambiar los trayectos de sus diferentes rutas migratorias razón por la cual están pasando por países que con anterioridad no cruzaban (Garcia, 2015).

2.5.2. Historia de las Aves Migratorias

Se piensa que la migración empezó en la era cuaternaria, en esa era el hielo cubría la mayoría de todos los continentes, cuando ocurrió el deshielo se movilizo el ártico de donde migra cada invierno. Las primeras observaciones de migración de las aves datan hace 300 años, este fenómeno es muy antiguo incluso la biblia en el libro del éxodo menciona que los israelitas en el viaje de la tierra prometida fueron ayudados por una inmensa cantidad de codornices. El primer caso de migración de las aves fue observado el 10 de octubre del año 1492, el capitán de la “Pinta’’ Martin Alonso Pinzón, que navegaba al oeste, observo una gran cantidad de aves en dirección al sudeste. Informado Colon del fenómeno cambio de rumbo y toco tierra en San salvador de esta forma las aves jugaron un papel fundamental en el descubrimiento de América (Garcia, 2015).

2.5.3. Migración Anual

El Ártico área que se sitúa alrededor del polo norte, incluye partes de Rusia, EEUU, Canadá, Groenlandia, Islandia, Suecia Noruega y Finlandia como también el océano Ártico. Se considera que en el Ártico viven unos cinco mil millones de aves (5.000) de 10.000 especies diferentes, aproximadamente el 50 por ciento de estas aves migran y se desplazan desde el Ártico a zonas distantes como Europa, Asia, África, América cada año (Rivera, 2016).

Se considera la migración como un fenómeno del hemisferio norte, en el hemisferio sur la migración por lo general tiende a ser menos evidente, la migración comprende dos etapas:

- La primera a finales de septiembre y durante octubre y noviembre esto se da por la presencia del invierno en el Ártico y la falta de alimento.
- La segunda en febrero, marzo y abril, en donde luego de haber permanecido durante 6 meses empiezan su regreso al sitio de partida coincidiendo con la primavera y la consecuente presencia de comida en esta época además cumplen funciones importantísimas de reproducción y a sus nuevos polluelos prepararlos para la migración.

A través de sus viajes realizan paradas para comer y descansar, en el presente, especialmente en el año 2014 las aves migratorias has sido destacadas por toda la humanidad como las directas responsables de la presencia de brotes en diferentes países por diferentes subtipos de virus como el A/H7N9, A/H5N8, A/H5N6, A/H5N1, A/H10N7, A/H7N1, A/H3N8, A/H7N3, A/H5N2, unos de alta patogenicidad y otros de baja produciendo mortalidades en diferentes especies de aves y aún en humanos.

Por lo mencionado anteriormente las aves que migraron del Ártico entre septiembre y octubre del 2014 estuvieron habitando en lugares donde se han presentado casos de gripe aviar con diferentes subtipos de virus y de esta manera pudieron introducir la enfermedad a países en donde no existía (Rivera, 2016).

2.5.4. Rutas

Las aves migratorias al llegar a las fronteras de una nación de acuerdo a la especie neo tropicales, acuáticas, playeras, rapaces, canoras, entre otras, se dirigen a buscar su hábitat ya en las playas, humedales, manglares, bosques, praderas y se convierten en parte integral de la avifauna de muchas naciones y ello explica el por qué una ave migratoria que contenga el virus puede infectar a un ave nativa, a un ave de traspatio o comercial (Rivera, 2016).

2.5.5. Nuevos Subtipos y Peligros

Se considera que el virus A/H5N1 ha producido a nivel mundial desde el año 1997 hasta finales del año 2014 la muerte de más de 650 millones de aves, afectado a 668 humanos de los cuales han muerto 393, en 16 países, Los patos migratorios es la especie animal donde los virus de la gripe aviar se encuentran con mayor frecuencia, y son estas aves las más resistentes a la infección. A diferencia, las aves de corral como pollos, gallinas y pavos, son más susceptibles y en ellas se presentan altas mortalidades cuando un virus de alta patogenicidad las infecta. La causa más frecuente de estas epidemias es, por tanto, un contacto directo entre las aves migratorias y las de corral (Rivera, 2016).

El peligro implica que al reunirse las aves migratorias procedentes de un continente en el cual estuvo presente el virus entran en contacto directo o indirecto con aquellas que han regresado de otros continentes, en donde no se han registrado brotes, no puede descartarse la hipótesis de transmisión de virus altamente patógeno de éstas a las aves migratorias aún “libres” quienes en la nueva migración se encargarán de difundirlo a otras regiones del planeta. En enero de 2015, el virus H5N8 impactó a una granja comercial de pavos en el norte del estado de California en EUA. (Ese hecho causó mucha alarma con avicultores en EUA y Latinoamérica). La amenaza de la gripe aviar para países de Centro y Sur América debe considerarse como un riesgo potencial presente y futuro pues a todo lo largo y ancho de su geografía se desplazan millones de aves migratorias por diferentes rutas, A pesar que hasta ahora en un determinado país no se hayan presentado brotes no hay que bajar la guardia, vigilancia y control que deben ser permanentes (Garcia, 2015).

2.6. HUEVOS SPF

La producción mundial de huevos SPF comenzó a nivel mundial en la década de los 60 y a mediados de los 70 se dictó una norma mundial sobre la crianza y mantención de animales SPF, es decir, Libre de Patógenos Específicos. SPF, significa Libre de Patógenos Específicos y se refiere a aves reproductoras que certificadamente no son portadoras de una lista de agentes infecciosos productores de enfermedades y que tampoco poseen anticuerpos contra estos agentes en su sangre.

El producto de estas aves son los huevos fértiles que mantienen la calidad SPF. Esta condición los hace útiles para el desarrollo de actividades de investigación científica, diagnóstico de enfermedades y elaboración de productos biológicos (Sánches, 2006).

2.7. MEDIO DE TRANSPORTE UNIVERSAL COPAN (UTM-RT)

El sistema Copan (UTM-RT) está destinado a la recogida y transporte de especímenes clínicos que contengan virus, clamidias, micoplasmas o ureaplasma desde el lugar de recogida hasta el laboratorio de ensayo. Proporciona un medio de transporte viral y un transporte para los organismos mencionados en un sistema. UTM-RT puede ser procesado usando procedimientos de laboratorio clínicos estándar para el cultivo viral, clamidial, micoplasma y ureaplasma (COPAN, 2016).

Uno de los procedimientos de rutina en el diagnóstico de infecciones causadas por virus, clamidias, micoplasmas o ureaplasma implica la recogida y transporte seguro de muestras biológicas. Esto se puede lograr utilizando el sistema Copan Universal Transport Medium (UTM-RT). Mientras que en el pasado había sistemas de transporte dedicados al transporte viral o transporte de clamidias o micoplasmas / ureaplasma, Copan UTM-RT proporciona un medio de transporte universal para los cuatro grupos de organismos. El sistema Copan UTM-RT incluye un medio de transporte universal que es estable a temperatura ambiente, de ahí la designación RT, que puede sostener la viabilidad (e infectividad) de una pluralidad de organismos que incluyen virus, clamidias, micoplasmas y ureaplasma clínicamente importantes durante el tránsito a la prueba de

laboratorio. La formulación del medio UTM-RT incluye proteína para estabilización, antibióticos para minimizar la contaminación bacteriana y fúngica, y un tampón para mantener un pH neutro (COPAN, 2016).

2.7.1. Principio

El medio de Copan UTM-RT consiste en una solución equilibrada de sal de Hank modificada suplementada con albúmina de suero bovino, cisteína, gelatina, sacarosa y ácido glutámico. El pH se tamponó con tampón HEPES. El rojo fenol se utiliza para indicar el pH. La vancomicina, la anfotericina B y la colistina se incorporan en el medio para inhibir el crecimiento de bacterias y levaduras competidoras. El medio es isotónico y no tóxico para las células huésped de mamífero. La presencia de sacarosa actúa como un crioprotector que ayuda a la preservación de virus y clamidias si las muestras son congeladas (-70ºC) para un almacenamiento prolongado (COPAN, 2016).

2.7.2. Resultados

Los resultados obtenidos dependerán en gran medida de la recolección de muestras adecuada, así como del transporte y procesamiento oportunos en el laboratorio (COPAN, 2016).

2.8. ARTICULOS RELACIONADOS

(Katrin Ventocila et al., 2011) Estudio la Presencia del Virus de la Enfermedad de Newcastle en Aves Silvestres de una Laguna Albufera cercana a Lima, donde el estudio evaluó la presencia del virus de la Enfermedad de Newcastle en heces de aves silvestres que habitan la laguna albufera “El Paraíso”, ubicada en el distrito de Huacho, Lima. Se recolectaron 942 muestras de heces frescas de diversas especies aviares y se realizó el aislamiento viral mediante la inoculación en huevos embrionados de pollo SPF de 10 días de edad. Se aislaron 4 cepas de Paramixovirus-1 (APMV-1), aparentemente de tipo lentogénico, demostrando que dichas aves estuvieron eliminando este virus. El presente estudio constituiría el primer reporte de aislamiento de APMV-1 en heces de aves silvestres aparentemente sanas en el Perú.

(Karen Segovia et al ., 2013) Determino la presencia del virus de influenza aviar (IA) en aves silvestres presentes en los Humedales de Puerto Viejo, en el departamento de Lima. Novecientas muestras de heces frescas de 18 especies de aves silvestres fueron colectadas desde abril de 2008 hasta febrero de 2009. Dichas muestras se analizaron mediante aislamiento viral en huevos embrionados de pollo SPF. Se logró aislar siete cepas de virus de IA de baja patogenicidad del subtipo H12N5 (seis cepas procedentes de la especie migratoria Arenaria interpres y una de la especie residente Fulica ardesiaca). La técnica de evaluación de riesgo mediante la simulación de Monte Carlo (programa @risk) indicó que la probabilidad de encontrar el virus de Influenza A en las aves silvestres de los Humedales de Puerto Viejo es de 0.88% con un intervalo de confianza de 0.15 a 2.53%. Los resultados demuestran que las aves silvestres de los Humedales de Puerto Viejo constituyen un reservorio para los virus de influenza aviar en el Perú.

(Luis Mendoza et al ., 2012), evaluó la presencia del virus de la Enfermedad de Newcastle en la laguna Albufera de Medio Mundo, situada al norte de Lima, y habitada por diversas especies de aves silvestres y migratorias. Se realizaron tres etapas de muestreo, de 6 semanas cada etapa, obteniéndose 900 muestras de heces frescas de 11 especies de aves silvestres. Las muestras se inocularon en huevos embrionados libres de patógenos específicos (SPF) de 10 días de edad para lograr el aislamiento viral. Se evaluó la actividad aglutinante del fluido alantoideo de los huevos embrionados obteniéndose resultados negativos en todas las muestras. Se calculó una prevalencia media de 0.1% y una distribución de 0.002 a 0.4% por medio de la simulación beta. La prevalencia encontrada fue muy baja para considerar a estas aves como una posible fuente de infección hacia las aves domésticas.

(Cuevas E. , 2009)Durante octubre 2005 a marzo 2006 muestreo 231 individuos de 7 especies diferentes, mediante hisopos cloacales y faríngeos. El objetivo fue la detección en condiciones naturales de orthomyxovirus en las ciénegas de Lerma y durante la estancia de los patos silvestres en el Estado de México. Durante el mes de febrero logró la detección de un orthomyxovirus H7N3 de baja patogenicidad. Siendo para México el primer reporte oficial de aislamiento viral de forma natural en un Anas Cyanoptera en los humedales de México.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. De Campo

- Mapa ARGIS-SIG con los diferentes puntos de muestreo
- 300 muestras de heces de aves silvestres
- Tubos UTM Copan (kits)
- Hisopos
- Cooler
- Registro de campo

3.1.2. De Laboratorio

- Mandil
- Guantes de látex descartables
- Huevos embrionados SPF
- Cajas Petri
- Reactivos
- Muestras fecales
- Suero sanguíneo
- Gradillas
- Solución de Antibióticos
- Parafina
- Mechero
- Portaobjetos
- Placa de 96 wells fondo en U limpias
- Cubetas descartables
- Micropipeta hasta 200µl (tolerancia máxima admitida: 5ul)
- Micropipeta hasta 40µl (tolerancia máxima admitida: 0.4ul)
- Micropipeta hasta 1000 µl (tolerancia máxima admitida: 10ul)
- Tips amarillos (hasta 200µl)
- Tips azules (hasta 1000 µl)

- Pipeta pasteur plástica
- Agujas hipodérmicas
- Jeringas de 5 ml
- Centrifuga
- Ovoscopio
- Microscopio
- Incubadora

3.1.3. De Oficina

- Computadora
- Internet
- Flash memory
- Impresora
- Material de escritorio
- Cámara fotográfica
- Calculadora

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Delimitación del Área de Estudio

El cantón Balsas está ubicado al Sur de la Provincia de El Oro y al Noroccidente de la Provincia del Loja. La ciudad de Balsas, cabecera cantonal, está ubicada en las coordenadas geográficas 3˚ 46´11´´ Latitud Sur y 79˚ 50´18´´ Longitud Oeste a 670 m s n m. Los límites cantonales son:

- **NORTE. -** Cantón Piñas
- **SUR. -** Provincia de Loja (Río Puyango)
- **ESTE. -** Cantón Piñas
- **OESTE. -**Cantón Marcabelí
- **DISTANCIA. -** Machala-Balsas: 77.9 Km.

Figura 4: mapa del Cantón Balsas.
Fuente: google maps.

3.2.2. Tamaño y Selección de la Muestra

Para la presente investigación se trabajó con un total de trescientas muestras de heces de aves silvestres, migratorias y residentes de humedales de la provincia De El Oro. El número de muestras por unidad muestreal se obtiene al emplear la prueba de prevalencia límite asumiendo que la prevalencia del virus de ENC e IA es de aproximadamente 4%. En este caso, se aseguró la colecta de especímenes considerando una prevalencia límite de 1%, la cuarta parte de la prevalencia en la región.

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 α si es que la prevalencia de la unidad muestral es igual o mayor que la prevalencia límite. Para el caso, se decidió emplear para influenza aviar 1% (González, 1986), y para Newcastle la prevalencia en la zona es igual a 9,85 %, (Villacis et al., 2014). Se determinó un tamaño muestral mínimo para una unidad muestral de al menos 298 muestras (n = 298). La fórmula usada fue:

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

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

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

Dónde:

n = número de muestras

p = prevalencia límite (1%)

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

α = confianza (0.05)

(González A., 1986)

Para el almacenamiento de las muestras se utilizaron las instalaciones del Departamento de Investigaciones de la Universidad Nacional de Loja, en la unidad de Biotecnología y para el análisis de las mismas se utilizaron las instalaciones del Laboratorio de Patología Aviar de la Universidad Mayor de San Marcos Perú por la dificultad de conseguir en el país huevos fértiles SPF.

3.2.3. Lugar de ejecución y periodo de duración

El estudio se realizó con la toma de 300 muestras en aves: silvestres y migratorias que se tomó en los alrededores de los manglares, humedales, quebradas, zoológicos alrededor de granjas avícolas del altiplano orense donde se concentra la producción avícola comercial de la provincia de El Oro. Las pruebas de aislamiento viral y detección de la actividad hemoaglutinante con eritrocitos de pollo al 0.7% se realizaron en el laboratorio de patología aviar de la facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La duración aproximada para todo el estudio fue 16 meses.

3.2.4. Variables

- Determinar la presencia del virus NC e IA en aves silvestres y migratorias de la Provincia de El Oro de mediante aislamiento viral en huevos embrionados SPF.

- Aislamiento de virus de Enfermedad de NC e IA en humedales de la Provincia de El Oro.
- Evaluar la patogenicidad de los virus de Enfermedad de NC e IA.
- Caracterización molecular de las cepas

3.3. RECOPILACIÓN DE LA INFORMACIÓN

En el presente estudio se desarrolló un trabajo de campo, previa elaboración de un mapa de la Provincia de El Oro mediante Sistemas de Información Geográficos, utilizando el programa ARGIS el cual permite detallar los diferentes sitios a muestrear y así proceder a la recolección de las muestras, todo esto apoyado en la aplicación de técnicas de laboratorio, los pasos para recolectar la información se describen a continuación:

3.3.1. Establecimiento de Muestreo

Se logró información de los cantones de la Provincia de El Oro de en donde existe producción avícola, correspondientes al censo del año 2015 las mismas que se obtuvieron en la base de datos de Agrocalidad. Esta información fue ingresada a un software académico ARGIS el cual es un programa de información geográfica que genera información especializada.

3.3.2. Ubicación Espacial de los Humedales para Muestreo

Como hábito de desarrollo de las aves migratorias y silvestres se determinaron las zonas conocidas como humedales por lo cual se los considera los siguientes:

- Sistema lacustre natural y artificial
- Cultivos de arrozales
- Represas
- Drenajes naturales y artificiales
- Embalses
- Área de inundación.

En el siguiente mapa se puede observar la distribución de los humedales considerados en este estudio a lo largo de la Provincia de El Oro.

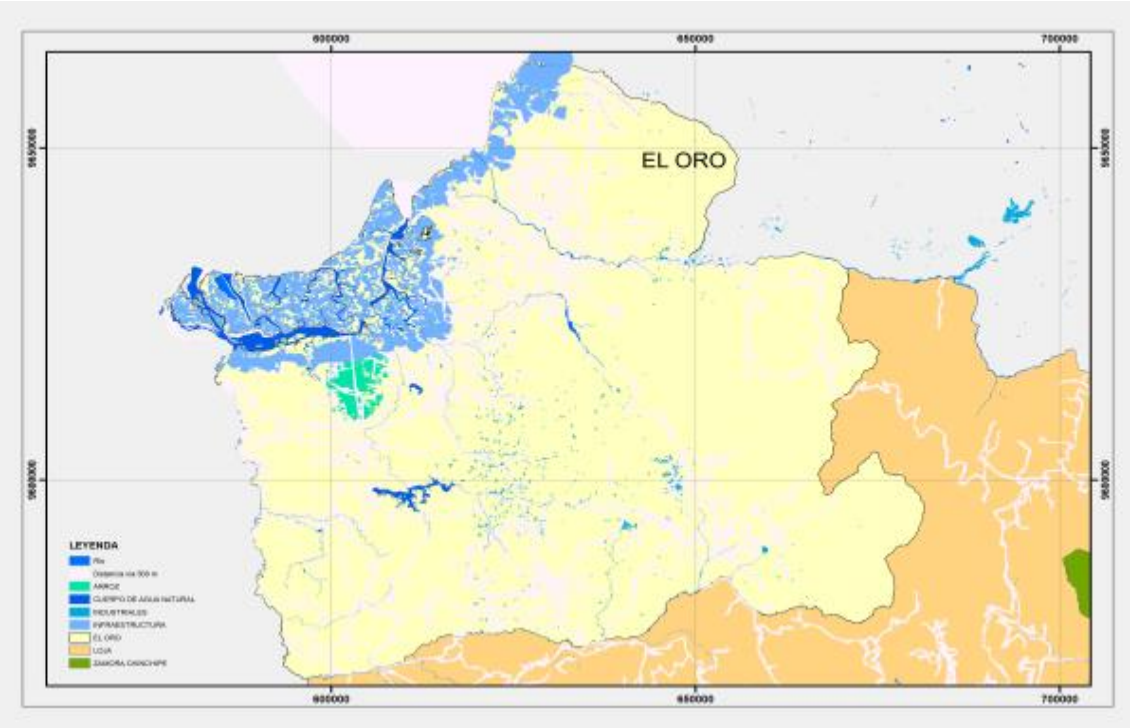


Figura 5. Presencia de humedales en la provincia de El Oro.
Fuente: (CINFA, 2016)

Una vez obtenida la capa de humedales se procedió a realizar el cruzamiento con la capa de puntos o sitios de muestreo que para la zona salieron alrededor de 6150 sitios de muestreo. Empleando la opción de Spatial Join Location dentro del software ArcGIS (Sistema de información geográfica), especificamos o seleccionamos la capa de muestreo original y en segunda instancia la capa de sectores de humedales. La lógica de funcionamiento es que puntos cercanos a los sectores de humedales serán asignados espacialmente los atributos de esta capa. Posteriormente se seleccionan los puntos que cumplen con esta relación llegando a eliminar el resto de puntos que no son necesarios.

3.3.3. Sectorización de la Zona de Estudio

En general el total de 714 sitios de muestreo realizando la operación de Spatial Join Location quedaron alrededor de 616 puntos posibles que cumplen esta condición. De los 816 puntos que cumplen las condiciones de muestreo en toda la zona 7 de la Región Sur del Ecuador, se realizó el conteo de los puntos existentes en el mapo a lo largo de la Provincia de El Oro, llegando a determinar la presencia de 300 puntos a muestrear en este sector.

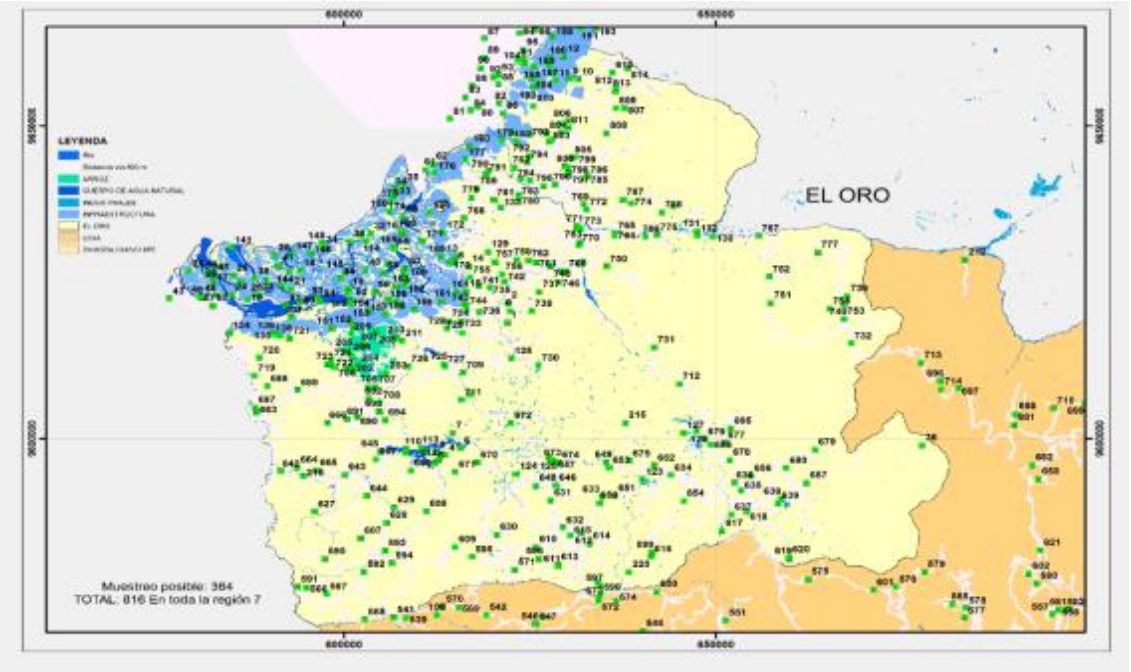


Figura 6. Mapa de distribución de sitios de muestreo en la Provincia de El Oro
Fuente: *(CINFA, 2016)*

Realizado el mapa con los diferentes puntos de muestreo se procedió a dividir el mismo en 3 zonas o grupos y así en primer lugar determinar el número de muestras a recolectar por cada zona.

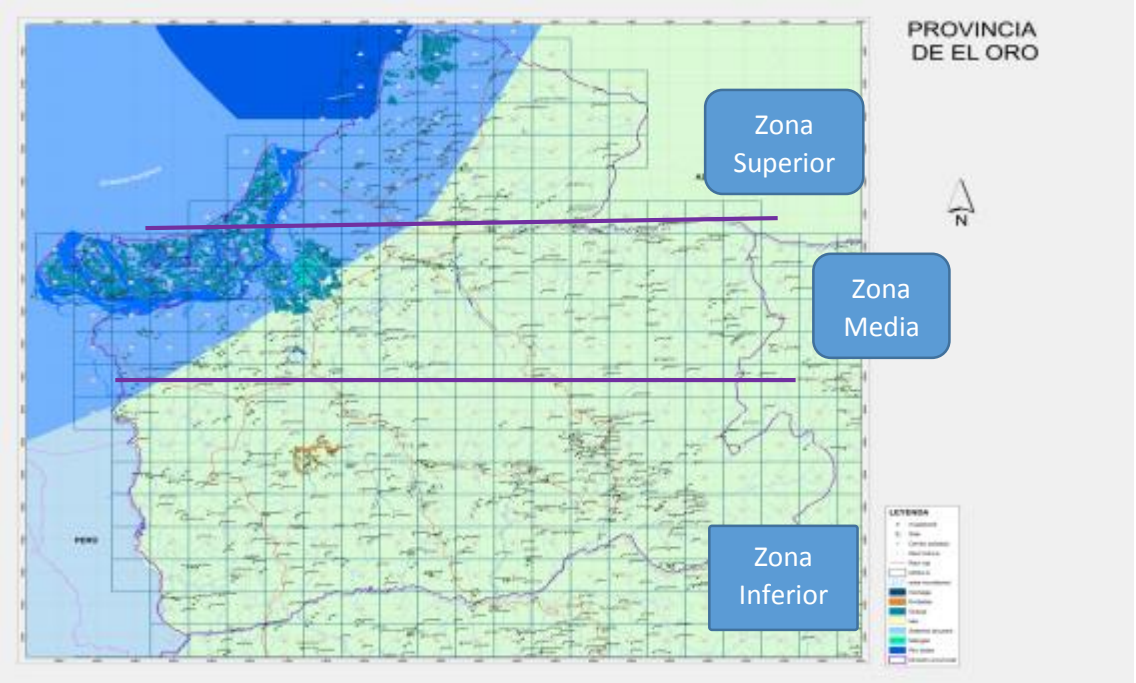


Figura 7. División del mapa de la provincia de Loja en tres zonas de muestreo
Fuente: (CINFA, 2016)

Cuadro *2*. *Muestras a recolectar en las distintas zonas de la Provincia de El Oro.*

ZONA	NUMERO DE MUESTRAS	PUNTOS MUESTREO
Superior	82	34
Medio	136	52
Inferior	82	67
TOTAL	300 MUESTRAS	153 PUNTOS MUESTREO

Fuente: (Autor, 2016)

Una vez determinado el número de muestras por zona, se procedió a extraer los datos para ubicar los cuadrantes, puntos de muestreo donde se encuentra de acuerdo a cada zona. Los sitios de muestreo ya están geo referenciados en el mapa

3.3.4. Técnicas de Recolección de Muestras de heces

Para determinar la presencia de virus de Newcastle e IA en aves domésticas criadas en zonas cercanas a los humedales (Marino costeros, fluviales, palustres y lacustres) y que tengan relación con aves silvestres, entre ellas y avicultura comercial de la Provincia de El Oro, se utilizarán 300 muestras de heces frescas pues fueron colectadas directamente de la cloaca de las aves utilizando hisopos estériles y luego se las colocó en viales estériles de medio de trasporte universal (UTM). Las muestras posteriormente fueron homogenizadas y rotuladas claramente e introducidas en caja térmica con gel refrigerante a una temperatura de 4°C para transportarlas, hasta su procesamiento en el laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en el área de aislamiento viral.

3.3.5. Análisis de Laboratorio

Los análisis de laboratorio se realizaron utilizando las siguientes técnicas:

Las suspensiones de hisopados obtenidos mediante clarificación por centrifugación a 100 rpm durante 20 minutos a una temperatura no excedida a 25 ºC. (Duran, 2014).

Cuadro 3. Cuadrantes de la Provincia De El Oro con sus respectivos puntos de muestreo correspondientes a la zona Inferior.

Zona inferior		
Cuadrante	**Sitio de muestreo**	**Total**
924	645	1
925	109,110,111,113	4
926	3,6,7,112	4
932	127	1
933	126,677,695	3
936	679	1
939	36	1
880	642	1
881	218, 664, 665	3
882	643	1
883	667	1
884	669	1
885	5,671	2
886	670	1
887	124,648	2
888	125,646,647,673,674	5
889	649,653	2
890	123,652,675	3
891	634	1
892	678	1
893	636,656	2
894	680	1
895	657	1
841	627	1
843	629, 644	2
844	608	1

848	631	1
849	633,650,651	3
851	654	1
853	635,618,637	3
854	638,639	2
802	593,607,628	3
804	609	1
805	630	1
806	610	1
807	612,615,632	3
808	614	1
811	617	1
760	590	1
761	592-594	2
764	595	1
765	571,596	2
766	611-613	2
768	220,599,616	3
719	566,591	2
720	567	1

Fuente: (Autor, 2016)

3.3.5.1. Preparación de las muestras de campo

Las muestras deben colocarse en solución salina isotónica tamponada con fosfato (PBS), pH 7,0–7,4, que contenga una solución de antibióticos con, penicilina (2.000 unidades/ml); estreptomicina (2 mg/ml); gentamicina (50 µg/ml); y micostatina (1.000 unidades/ml) para hisopos traqueales y de tejidos, pero a concentraciones cinco veces superiores para hisopos cloacales y de heces.

Es importante reajustar la solución reserva concentrada a pH 7,0–7,4 antes de añadirla a la muestra, Los líquidos sobrenadantes de las heces o las suspensiones de tejidos e hisopos obtenidos mediante clarificación por centrifugación a 1.000 g durante aproximadamente 10 minutos a una temperatura que no exceda los 25°C se inoculan en volúmenes de 0,2 ml en la cavidad alantoidea de cada uno de los huevos embrionarios de aves SPF de 9–11 días de incubación.

3.3.5.2. Formación de grupos

Para facilitar el análisis se concentran las muestras para formar grupos de diez, para lo cual se utilizó el siguiente procedimiento:

- Con la ayuda de un vórtice, se homogeneizaron las muestras individualmente por 15 segundos cada una.
- Se colectó 500 ul de cada muestra para luego formar grupos más homogéneos que contuvieron 10 muestras cada uno, haciendo un volumen total de 5 ml por grupo, rotulándose cada uno con el código correspondiente.

Nota: en el caso de encontrar un positivo se revisó los registros del grupo y se realizó individualmente el procedimiento de aislamiento con cada integrante del grupo.

3.3.5.3. Aislamiento del virus de EN e IA en embriones de pollo

- Se centrifugaron los tubos de cada grupo, por 10 minutos cada muestra se contuvo a 1000 g.
- Se retiraron los tubos de la centrífuga cuidadosamente y se colectó el sobrenadante en otro colector correctamente rotulado.
- Una vez colectado el sobrenadante se aplicó una solución de antibiótico en un volumen de 0.05 ml de penicilina - estreptomicina al 20 % por ml de muestra.
- Se incubaron las muestras de 2 a 3 horas a 4 ºC
- Se procedió a recolectar las muestras en jeringas individuales estériles para posteriormente ser filtradas, para lo cual se utilizaron filtros millipore

de 0.22 um, aperturándolos cuidadosamente para evitar su contaminación. Se realizó este procedimiento con cada grupo formado individualmente, finalmente se colectó el líquido filtrado en un vial estéril con un volumen mínimo de 2 ml.

- Para la inoculación se requiere huevos embrionados de 9-11 días (SPF).
- Observar en el ovoscopio si el huevo es fértil o infértil.
- Determinar la edad del embrión.
- Localizar la cámara de aire y marcarla.
- Marcar 0.2 mm sobre la línea a lado contrario del embrión.
- Limpiar la cáscara (con una torunda de alcohol yodado, sobre todo, la parte donde se va a inocular).
- Agujerear el cascarón con un taladro (dependiendo de dónde se vaya a inocular).
- Se inocularon a 3 embriones vía saco alantoideo por grupo formado, con 0.2 ml de inóculo cada uno con una jeringa de tuberculina.
- Sellamos el agujero con parafina (o cera de vela).
- Luego llevamos a estufa 37°C (controlar temperatura y humedad adecuada).
- Controlar, observar dos veces al día, para percatarse si están vivos o muertos. Aquellos que mueran en las primeras 24h después de la inoculación deben descartarse.
- Cepas velogénicas mata el embrión en 24-72 h, mesogénicas en 72-96 h y las cepas lentogénicas los mata en 96 h o más, por lo tanto, aquellos que mueran después de las 24 h deberán conservarse para ser examinados y para pruebas posteriores
- Los fluidos alantoideos de embriones muertos por el virus de EN tendrán suficientes niveles de hemaglutininas virales para producir la aglutinación de eritrocitos de pollo. Esta propiedad es útil para la identificación del aislamiento mediante las pruebas de HA y HI.

3.3.5.4. Pruebas de hemaglutinación (HA)

El fluido alantoideo de aquellos huevos que contenían embriones muertos o moribundos y todos los embriones que permanecieron vivos hasta el periodo

final de incubación se utilizaron para evaluar su actividad hemaglutinante con eritrocitos de pollo al 0.7%.

- Se distribuyen 100 ul de PBS en la primera celdilla y 50 ul en el resto los pasillos de una fila de la placa de microtitulación de plástico con fondo en U o V.
- Se añaden 25 ul de la suspensión vírica (líquido alantoideo infectivo) en la primera celdilla, mesclar bien. De esta manera tendremos una dilución de 1:5.
- A lo largo de toda la placa se practican diluciones, pasar 50 ul de la primera celdilla a la segunda, mesclar bien, pasar 50 ul de la segunda a la tercera, y así sucesivamente hasta llegar a la última celdilla donde se descartan los 50ul restantes. En esta forma se tienen diluciones 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, etc.
- Luego en cada pocillo se dispensan 50 ul de solución de glóbulos rojos (0.5%).
- Incluir un control de glóbulos rojos adicionando 50 ul de solución buferada y 50 ul de glóbulos rojos.
- Se dejan reposar durante unos 40 minutos una hora a temperatura ambiente.
- La HA se determina inclinando la placa y observando la presencia o ausencia de botones claramente diferenciados. Debe leerse la titulación a la dilución más alta a la que se dé una hemaglutinación completa.

3.3.6. Identificación de Aves

La identificación de las aves se realizó comparando las fotografías con las ilustraciones que se presenta en el libro “Aves del Ecuador” de autoría de (Ridgely & Greenfield, 2006)

Cuadro 4. Identificación de aves observadas.

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO
Ibis Blanco	*Eudocrimus albus*
Negro Ojipáido	*Agelaius xanthophalmus*
Cormorán Neotropical	*Phalacrocorax brasilianus*
Fragata Magnífica	*Fragata magnificens*
Piquero Patas Azules	*Sula nebouxii*
Tiranolete Gorrinegro	*Camptostoma obsoletum*
Frijilo Pechicinéreo	*Phrygilus plebejus*
Tortolita Ecuatoriana	*Colombina buclhleyi*
Momoto Coroniazul	*Momotus momota*
Gallinazo Negro	*Coragyps atratus*
Orapéndola De Casco	*Clypicterus oseryi*
Tortolita Azul	*Clarivus pretiosa*
Reinita Blanquinegra	*Mniotitla varia*
Vaquero Brilloso	*Molothrus bonariensis*
Barbablanca Rayda	*Pseudocolalaptes boissonneautii*
Negro Matorralero	*Dive warszewiczi*
Torolita Pachimarrón	*Clarivis mondetoura*
Perico Cachetigrís	*Brotogeris pyrrhoptrus*
Amazona Alinaranga	*Amazona amazónica*
Tucán del Chocó	*Ramphastos*
Arasari Piquirrado	*Pteroglossus sanguineus*
Loro Alibronceado	*Pianus chalcopterus*
Loro piquirrojo	*Pianus sordidus*
Guacamayo Escarlata	*Ara macao*
Perico Caretirrojo	*Aratinga Erythrogenys*
Anade cariblanco	*Anas bahamensis*
Gallareta Común	*Gallunula cloropus*
Pava Crestada	*Penelope purpurascens*
Gaviotita Reidora	*Larus atricilla*
Garceta Bueyera	*Crypturelleus tataupa*
Garceta Nívea	*Egretta thula*
Caracara Crestado Norteño	*Caracara cheriway*
sotorry Ondeado	*Campylorbynchusfasciatus*
Garrapatero	*Crotophaga sulcirostris*
Tortolita Ecuatoriana	*Columbina buckleyi*
Semillero Menor	*Oryzoborus angolensis*
Perico Cachetigrís	
Amazona Coroniamarilla	*Amazona ochrocephala*
Perico de Orcés	*Phyrrhuraorcesi*
Garceta Bueyera	*Bubulcus ibis*
Perico Caretirrojo	
Garcete Azul	*Engretta caerulea*
Garceta Grande	*Ardea alba*
Tucán Coliblanco	*Ramphastos tucanus*
Arasuri Piquipálido	*Pteroglossus erythrpygius*

Guacamayo Rojo y Verde	*Ara chloroptera*
Amazona Frentirroja	*Amazona autumnalis*
Tucanetes	*Aulacorhynchus*
Tucán de Swainson	*Ramphastos swainsonii*
guacamayo Frentecastaño	*Ara severa*
Loro Cabeciazul	*Pianus menstruus*
Caracara Crestado Norteño	*Caracara Cheriway*
halcón peregrino	*Falco perigrinus*
Tortolita Pechimarrón	*Clarivis pretiosa*
Reinita Manglara	*Dendroica petechia*
Golondrina Azuliblanca	*Notiochelidom cyanoleuca*
Hornero del Pacífico	*Furnarius cinnamomeus*
Tirano todi Coronirrufo	*Poecilotriccus ruficeps*
Tangara Ojeralimón	Chlorothraupis olivácea
Mirlo Grande	Turdus fuscater
Tiranolete Silbador Sureño	Camptostama obsoletum
Pastorero Peruano	*Sturnella bellicosa*

Fuente (Autor, 2016)

PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Tabulación

Se procedió a ordenar y clasificar los resultados obtenidos mediante la elaboración de tablas y cuadros estadísticos de cada una de las variables en estudio.

Análisis e Interpretación

La prevalencia se calculó con intervalos de confianza al 95 % utilizando el programa estadístico “R” aplicando el paquete “epiR” versión 09-79.

Presentación de Resultados

Los resultados de este trabajo van a permitir determinar la relación del virus de ENC e IA entre los compartimentos, con los factores que determinan su distribución y transmisión y plantear sistemas de vigilancia y control adecuado.

Descripción del Material Experimental

La muestra biológica consistió en hisopados de heces frescas de aves silvestres residentes y migratorias de la Provincia De El Oro que fueron geo referenciadas (cámara fotográfica georeferenciadora), para determinar su especie y el lugar de toma de muestra.

3.3.7. Análisis Estadístico

Para el cálculo de la prevalencia aparente de Newcastle e Influenza Aviar con un intervalo de confianza del 95%, se aplicó la fórmula (1) y fórmula (2), respectivamente (Thursfield, 2007). Utilizando epi.prev del paquete epiR version 0.9-79 del programa estadístico Sas University Edition 2016.

$$\mathbf{Pa} = \frac{\mathrm{C+}}{\mathrm{N}} \qquad (1)$$

Donde:

C+ = casos positivos

N = número total de muestras analizadas

$$\mathbf{IC95\%} = \mathrm{p} \pm \mathrm{Z}\propto/_2 \times \sqrt{\frac{\mathrm{p}\,(1-\mathrm{p})}{\mathrm{n}}} \qquad (2)$$

Donde:

p = prevalencia de Newcastle e Influenza Aviar

$\mathbf{Z}\propto/_{\mathbf{2}}$ = valor z dado el nivel de confiabilidad del 95%, 1,96.

1 – p = individuos aparentemente sanos.

4. RESULTADOS

En el presente estudio se analizaron 300 muestras de heces frescas en aves migratorias y silvestres de la Provincia De El Oro, se comprobó la presencia o ausencia del virus de Newcastle e Influenza Aviar, mediante el aislamiento viral en huevos embrionados SPF y fue avalada mediante pruebas de hemoaglutinación, obteniendo siguientes resultados:

4.1. PREVALENCIA DE LOS VIRUS DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN AVES SILVESTRES DE HUMEDALES DE LA PROVINCIA DE EL ORO

Cuadro 5. Prevalencia de los virus de Newcastle e Influenza Aviar en aves silvestres de humedales de la Provincia De El Oro.

ZONA	NUMERO MUESTRAS	POSITIVAS	PREVALENCIA (IC. 95%)
SUPERIOR	82	0	0(0 – 4,35)
MEDIO	136	0	0(0 - 2,62)
INFERIOR	82	0	0(0 – 4,35)
TOTAL	**300**	**0**	**0(0 - 1,19)**

Fuente: “epiR” versión 09 – 79
Elaborado: (Autor, 2016)

Como se detalla en el cuadro 6, utilizando un intervalo de confianza del 95 %, en 82 muestras pertenecientes a la zona Superior resultaron (0) muestras positivas con una prevalencia de (0 – 4,35%), en 136 muestras pertenecientes a la zona Media resultaron (0) muestras positivas con una prevalencia de (0 – 2,62%), en 82 muestras pertenecientes a la zona Inferior resultaron (0) muestras positivas con una prevalencia de (0 – 4,35%).

4.2. AISLAMIENTO DE VIRUS NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN AVES SILVESTRES POR SECTORES DE LA PROVINCIA.

Cuadro 6. Aislamiento de virus Newcastle e Influenza Aviar en aves silvestres por sectores en la Provincia De El Oro.

ZONA	MUESTRAS TOTALES	GRUPOS	HUEVOS INOCULADOS	HA+
SUPERIOR	82	8	24	0
MEDIA	136	13	39	0
INFERIOR	82	9	27	0
TOTAL:	300	30	90	

Fuente: (Autor, 2016)

En el cuadro 7 se observa el número de muestras por zona de estudio, grupos analizados y el número de huevos embrionados SPF que se utilizaron. En la zona superior se colectó 82 muestras de aves en las cuales se analizaron 8 grupos utilizando 39 huevos SPF. En zona Media es donde hubo el mayor número de muestras colectadas 136, se analizaron 13 grupos y se utilizó 39 huevos SPF. En la zona Media se colectaron 82 muestras y se analizaron 9 grupo, utilizando 27 huevos SPF.

4.3. AISLAMIENTO DEL VIRUS NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN ESPECIES DE AVES SILVESTRES POR ZONAS EN LA PROVINCIA DE EL ORO

Cuadro 7. Aislamiento del virus Newcastle e Influenza Aviar en aves silvestres en la zona superior de la Provincia De El Oro.

ZONA SUPERIOR					
ORDEN	**ESPECIE**	**FRECUENCIA**	**PORCENTAJE**	**GRUPOS**	**HA+**
Accipitriformes	*Colombina buclhleyi*	1	1,22		0
Anseriformes	*Anas bahamensis*	*3*	3,66		0
Cathartiformes	*Coragyps atratus*	5	6,10		0
Charadriiformes	*Mniotitla varia*	*1*	1,22		0
Charadriiformes	*Larus atricilla*	*2*	2,44		0
Columbiformes	*Clarivus pretiosa*	*2*	2,44		0
Columbiformes	*Pseudocolalaptes boissonneautii*	*1*	1,22		0
Columbiformes	*Clarivis mondetoura*	*1*	1,22		0
Coraciiformes	*Momotus momota*	1	1,22		0
Falconiformes	*Caracara cheriway*	*2*	2,44		0
Galliformes	*Penelope purpurascens*	*2*	2,44		0
Gruiformes	*Gallunula cloropus*	*2*	2,44		0
Passeriformes	*Agelaius xanthophalmus*	1	1,22		0
Passeriformes	*Camptostoma obsoletum*	1	1,22		0
Passeriformes	*Phrygilus plebejus*	2	2,44		0
Passeriformes	*Clypicterus oseryi*	*1*	1,22		0
Passeriformes	*Molothrus bonariensis*	*1*	1,22		0
Passeriformes	*Dive warszewiczi*	*1*	1,22	**8**	0
Pelecaniformes	*Eudocrimus albus*	1	1,22		0
Pelecaniformes	*Egretta thula*	*2*	2,44		0
Piciformes	*Ramphastos*	*3*	3,66		0
Piciformes	*Pteroglossus sanguineus*	*2*	2,44		0
Piciformes	*Pianus chalcopterus*	*3*	3,66		0
Piciformes	*Pianus sordidus*	*4*	4,88		0
Psittaciformes	*Brotogeris pyrrhoptrus*	*6*	7,32		0
Psittaciformes	*Amazona amazónica*	*13*	15,85		0
Psittaciformes	*Ara macao*	*3*	3,66		0
Psittaciformes	*Aratinga Erythrogenys*	*2*	2,44		0
Suliformes	*Phalacrocorax brasilianus*	2	2,44		0
Suliformes	*Fragata magnificens*	2	2,44		0
Suliformes	*Sula nebouxii*	3	3,66		0
Tinamiformes	*Crypturelleus tataupa*	*6*	7,32		0
	TOTAL:	**82**	**100**		

Fuente: (Autor, 2016)

En el cuadro 8, se presentan el porcentaje de muestras analizadas de las especies que se identificaron en la zona superior, clasificadas por órdenes así:

aquellas especies del orden Psittaciformes *(Amazona amazónica)* presento el mayor número de muestras recolectadas representando el 15,85%, de la especie del orden Tinamiformes *(Crypturelleus tataupa)* el 7,33% de muestras se recolectó; de igual forma en las especie del orden Cathartiformes *(Coragyps atratus)* tuvo una representación de un 6.10%, a si mismo de la especie del orden Anseriformes *(Anas bahamensis)* de la muestra recolectada represntan un 3,66%; finalmente de obtiene una representación en aquellas especies del orden en menores porcentajes tales como: Charadriiformes *(Larus atricilla), del* 2,44%, y la Accipitriformes y *(Colombina buclhleyi)* 1,22% de las muestras recolectadas respectivamente.

Cuadro 8. Aislamiento del virus Newcastle e Influenza Aviar en aves silvestres en la zona media de la Provincia De El Oro.

ZONA MEDIA					
OREN	**ESPECIE**	**FRECUENCIA**	**PORCENTAJE**	**GRUPOS**	**HA+**
Columbiformes	*Columbina buckleyi*	*2*	1,47		0
Columbiformes	*Clarivis pretiosa*	3	2,21		0
Cuculiformes	*Crotophaga sulcirostris*	*1*	0,74		0
Falconiformes	*Caracara Cheriway*	3	2,21		0
Falconiformes	*Falco perigrinus*	2	1,47		0
Passeriformes	*Campylorbynchus fasciatus*	1	0,74		0
Passeriformes	*Molothrus bonariensis*	2	1,47		0
Passeriformes	*Quiscalus mexicanus*	4	2,94		0
Passeriformes	*Oryzoborus angolensis*	4	2,94		0
Pelecaniformes	*Ardea alba*	*39*	28,68		0
Pelecaniformes	*Egretta thula*	11	8,09		0
Pelecaniformes	*Bubulcus ibis*	11	8,09		0
Pelecaniformes	*Engretta caerulea*	4	2,94		0
Pelecaniformes	*Eudocrimus albus*	3	2,21		0
Pelecaniformes	*Butorides striatus*	3	2,21		0
Piciformes	*Ramphastos tucanus*	1	0,74	13	0
Piciformes	*Pteroglossus erythrpygius*	1	0,74		0
Piciformes	*Aulacorhynchus*	1	0,74		0
Piciformes	*Ramphastos swainsonii*	1	0,74		0
Podicipediformes	*Coragyps atrus*	10	7,35		0
Psittaciformes	Brotogeris pyrrhoptherus	4	2,94		0
Psittaciformes	*Amazona ochrocephala*	1	0,74		0
Psittaciformes	*Phyrrhura orcesi*	1	0,74		0
Psittaciformes	*Aratinga erythrogenys*	14	10,29		0
Psittaciformes	*Ara chloropterus*	1	0,74		0
Psittaciformes	*Amazona autumnalis*	1	0,74		0

Psittaciformes	*Ara severa*	1	0,74	0
Psittaciformes	*Pianus chalcopterus*	3	2,21	0
Psittaciformes	*Pianus chalcopterus*	1	0,74	0
Psittaciformes	*Pianus sordidus*	2	1,47	0
	TOTAL:	**136**	**100**	

Fuente: (Autor, 2016)

En el cuadro 9, se presentan el porcentaje de muestras analizadas de las especies que se identificaron en la zona media, clasificadas por órdenes así: especies del orden Pelecaniformes (*Ardea alba*) el cual presento el mayor número de muestras recolectadas representando el 28,68%, y de la especie del orden Psittaciformes *(Aratinga erythrogenys)* el 10,29%, de igual manera de la especie del orden Pelecaniformes *(Bubulcus ibis)* de la muestra recolectada tuvo una representación del 8.09%, y de la especie del orden Podicipediformes *(Coragyps atrus)* de la muestra recolectada represento un 7,35%; finalmente en las especies del orden de menores porcentajes se obtuvo una representación como son: especies: Pelecaniformes *(Engretta caerulea) del* 2.94%, Falconiformes *(Caracara Cheriway),* 2,21%, Psittaciformes *(Pianus sordidus)* 1,47% de las muestras recolectadas respectivamente.

Cuadro 9. Aislamiento de virus Newcastle e Influenza Aviar en aves silvestres en la zona inferior de la Provincia De El Oro.

ZONA INFERIOR					
Orden	**ESPECIE**	**FRECUENCIA**	**PORCENTAJE**	**GRUPOS**	**HA+**
Psittaciformes	*Pionus sordidus*	6	7,30		0
Psittaciformes	Brotogeris pyrrhoptherus	2	2,44		0
Pelecaniformes	Ardea alba	4	4,88		0
Pelecaniformes	Egretta thula	2	2,44		0
Accipritiformes	Coragyps atratus	14	17,07		0
Columbiformes	*Clarivis pretiosa*	5	6,10		0
Caprimulgiforme	Malathus bonariensis	6	7,32		0
Passeriformes	*Dendroica petechia*	1	1,22		0
Passeriformes	*Notiochelidom cyanoleuca*	8	9,76	9	0
Passeriformes	*Furnarius cinnamomeus*	1	1,22		0
Passeriformes	*Poecilotriccus ruficeps*	1	1,22		0
Coraciiformes	*Camplorthyn fasciatus*	4	4,88		0
Columbiformes	*Columbina buckleyi*	11	13,41		0
Passeriformes	Chlorothraupis olivácea	2	2,44		0
Passeriformes	Turdus fuscater	4	4,88		0
Passeriformes	Camptostama obsoletum	3	3,66		0
Cuculiformes	*Crotophaga sulcirostris*	6	7,32		0
Passeriformes	*Sturnella bellicosa*	2	2,44		0
	TOTAL:	**82**	**100**		

Fuente: (Autor, 2016)

En el cuadro 10, se presentan el porcentaje de muestras analizadas de las especies que se identificaron en la zona inferior, clasificadas por órdenes así: especies del orden Accipritiformes *(Coragyps atratus)* presento el mayor número de muestras recolectadas representando el 17,07%, y de la especie del orden Columbiformes *(Columbina buckleyi)* el 13,41% de muestras se recolectó; de igual forma en la especie del orden Passeriformes *(Notiochelidom cyanoleuca)* de la muestra recolectada represntando un 9,79%, de la especie del orden Cuculiformes *(Crotophaga sulcirostris)* de la muestra recolectada represntando un 7,35%; de igual manera en la especie del orden Psittaciformes *(Pionus sordidus);* finalmente en las especies del orden de menores porcentajes se

obtuvo una representación como son: Passeriformes *(Camptostama obsoletum)* 3,66%, Passeriformes *(Sturnella bellicosa),* 2,44%, Passeriformes *(Furnarius cinnamomeus)* 1,22% de las muestras recolectadas respectivamente.

4.4. PREVALENCIA DEL VIRUS DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN ESPECIES DE AVES SILVESTRES Y MIGRATORIAS EN LA PROVINCIA DE EL ORO.

Cuadro 10. Presencia del virus de Newcastle e Influenza aviar en especies de aves silvestres que se identificaron durante la recolección.

RESULTADOS						
Orden	**ESPECIE**	**POSITIVO NEWCASTLE PRUEBA HA**	**POSITIVOS I. AVIAR PRUEBA HA**	**Frecuencia**	**porcentaje %**	**Prevalencia (IC=95%)**
Accipitriformes	*Colombina buclhleyi*	0	0	14	4,67	0(0- 23.09)
Anseriformes	*Anas bahamensis*	0	0	*3*	1,00	0(0-63,16)
Charadriiformes	*Mniotitla varia*	0	0	1	0,33	0(0-95)
Charadriiformes	*Larus atricilla*	0	0	*2*	0,67	0(0-77,65)
Columbiformes	*Clarivus pretiosa*	0	0	5	1,67	0(0-50,00)
Columbiformes	*Pseudocolalaptes boissonneautii*	0	0	1	0,33	0(0-95)
Columbiformes	*Clarivis mondetoura*	0	0	6	2,00	0(0-40,62)
Coraciiformes	*Momotus momota*	0	0	1	0,33	0(0-95)
cuculiformes	*Crotophaga sulcirostris*	0	0	7	2,33	0(0-37,72)
Falconiformes	*Caracara cheriway*	0	0	*5*	1,67	0(0-50,00)
Falconiformes	*Falco perigrinus*	0	0	*2*	0,67	0(0-77,65)
Galliformes	*Penelope purpurascens*	0	0	*2*	0,67	0(0-77,65)
Gallunula cloropus	*Gallunula cloropus*	0	0	*2*	0,67	0(0-77,65)
Passeriformes	*Agelaius xanthophalmus*	0	0	1	0,33	0(0-95)
Passeriformes	*Camptostoma obsoletum*	0	0	1	0,33	0(0-95)
Passeriformes	*Phrygilus plebejus*	0	0	2	0,67	0(0-77,65)
Passeriformes	*Clypicterus oseryi*	0	0	1	0,33	0(0-95)
Passeriformes	*Molothrus bonariensis*	0	0	9	3,00	0(0-31,61)
Passeriformes	*Dive warszewiczi*	0	0	1	0,33	0(0-95)
Passeriformes	*Oryzoborus angolensis*	0	0	*4*	1,33	0(0-52,71)
Passeriformes	*Quiscalus mexicanus*	0	0	*4*	1,33	0(0-52,71)
Passeriformes	*Notiochelidom cyanoleuca*	0	0	*8*	2,67	*0(0-35,86)*
Passeriformes	*Dendroica petechia*	0	0	*1*	0,33	0(0-95)

Passeriformes	*Furnarius cinnamomeus*	0	0	*1*	0,33	0(0-95)
Passeriformes	*Poecilotriccus ruficeps*	0	0	*1*	0,33	0(0-95)
Passeriformes	Chlorothraupis olivácea	0	0	*2*	0,67	0(0-77,65)
Passeriformes	Turdus fuscater	0	0	*4*	1,33	0(0-52,71)
Passeriformes	Camptostama obsoletum	0	0	*3*	1,00	0(0-63,16)
Passeriformes	*Sturnella bellicosa*	0	0	*2*	0,67	0(0-77,65)
Pelecaniformes	*Eudocrimus albus*	0	0	4	1,33	0(0-52,71)
Pelecaniformes	*Egretta thula*	0	0	*17*	5,67	0(0-18,91)
Pelecaniformes	*Ardea alba*	0	0	*43*	14,33	*0(0-7,39)*
Pelecaniformes	*Egretta thula*	0	0	*15*	5,00	*0(0-21,50)*
Pelecaniformes	*Engretta caerulea*	0	0	*4*	1,33	0(0-52,71)
Piciformes	*Ramphastos*	0	0	3	1,00	0(0-63,16)
Piciformes	*Pteroglossus sanguineus*	0	0	2	0,67	0(0-77,65)
Piciformes	*Pianus chalcopterus*	0	0	6	2,00	0(0-40,62)
Piciformes	*Ramphastos tucanus*	0	0	*1*	0,33	0(0-95)
Piciformes	*Pteroglossus erythrpygius*	0	0	*1*	0,33	0(0-95)
Piciformes	*Aulacorhynchus*	0	0	*1*	0,33	0(0-95)
Piciformes	*Ramphastos swainsonii*	0	0	*1*	0,33	0(0-95)
Podicipediformes	*Coragyps atratus*	0	0	29	9,67	0(0-10,99)
Psittaciformes	*Brotogeris pyrrhoptrus*	0	0	12	4,00	0(0-23,55)
Psittaciformes	*Amazona amazónica*	0	0	13	4,33	0(0-22,52)
Psittaciformes	*Pianus sordidus*	0	0	12	4,00	0(0-23,55)
Psittaciformes	*Ara macao*	0	0	3	1,00	0(0-63,16)
Psittaciformes	*Aratinga Erythrogenys*	0	0	16	5,33	0(0-20,12)
Psittaciformes	*Pianus chalcopterus*	0	0	*1*	0,33	0(0-95)
Psittaciformes	*Amazona ochrocephala*	0	0	*1*	0,33	0(0-95)
Psittaciformes	*Phyrrhuraorcesi*	0	0	*1*	0,33	0(0-95)
Psittaciformes	*Ara chloroptera*	0	0	*1*	0,33	0(0-95)
Psittaciformes	*Amazona autumnalis*	0	0	*1*	0,33	0(0-95)
Psittaciformes	*Ara severa*	0	0	*1*	0,33	0(0-95)
Psittaciformes	*Campylorbynchu s fasciatus*	0	0	*5*	1,67	0(0-50,00)
Sula nebouxii	*Sula nebouxii*	0	0	3	1,00	0(0-63,16)
Suliformes	*Phalacrocorax brasilianus*	0	0	2	0,67	0(0-77,65)
Suliformes	*Fragata magnificens*	0	0	2	0,67	0(0-77,65)
Tinamiformes	*Crypturelleus tataupa*	0	0	3	1,00	0(0-63,16)
	TOTAL	0	0	**300**	**100**	0 – 1.19

Fuente: (Autor, 2016)

En el Cuadro 10, En el cual se presentan los resultados de la prevalencia del virus de Newcastle e Influenza aviar en especies de aves silvestres, en la provincia De El Oro; donde se analizaron 300 muestras, de las cuales se identificaron 18 órdenes y 53 especies de aves silvestres, logrando determinar cero prevalencias con un intervalo de 0 – 1.19.

El mayor número de muestras recolectadas de prevalencia por especies: *Ardea alba* 43 muestras que representa el 14,33% y una prevalencia 0(0-7,39), 29 muestras que representa el 14,33% y una prevalencia 0(0-10,99), Egretta thula 17 muestras que representa el 5,67% y una prevalencia 0(0-18,91), *Aratinga Erythrogenys* 16 muestras que representa el 5,33% y una prevalencia 0(0-20,12), *Colombina buclhleyi* 14 muestras que representa el 4,76% y una prevalencia 0(0-23.09), *Amazona amazónica* 13 muestras que representa el 4,33% y una prevalencia 0(0-22,52), *Pianus sordidus* 12 muestras que representa el 4,00% y una prevalencia 0(0-23,55).

4.5. FACTORES DE RIESGO DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE E INFLUENZA VIAR EN LA PROVINCIA DE EL ORO.

Para determinar factores de riesgo de la Enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar presentes en la provincia de El Oro se realizó mediante la observación directa de las características que presenta la provincia, a continuación, se especifica:

4.5.1. Susceptibilidad de las Aves Silvestres.

A pesar que en nuestro estudio no se logró aislar ningún virus de EN e IA en la provincia de Zamora Chinchipe, existe una diversidad de estudios realizados alrededor del mundo que han confirmado la presencia de estos virus en aves silvestres, esto sumado a la gran variedad de aves silvestres presentes en la provincia de Zamora Chinchipe muchas de ellas migratorias, no se descarta la idea que puedan ser un factor importante para que se presente la enfermedad en cualquier momento por lo que la vigilancia debe ser permanente.

4.5.2. Presencia de Humedales

Las tipos de humedales no presentan un riesgo mayor para la entrada de estos virus debido a que los principales humedales que la provincia posee son ríos y quebradas muy caudalosos, solamente podrían presentar un riesgo en épocas de verano prolongado en el cual su caudal disminuye y proporcionan ambientes adecuados para la aglomeración de aves.

4.5.3. Vía Mecánica Mediante Transporte, Personas y otros Fómites Contaminados

Las formas de transmisión de los virus de EN e IA no se da únicamente por contacto directo sino también por fómites puesto que es un virus que sobrevive bien en materiales como cascaras de huevo y, especialmente con heces contaminadas, desechos de vacunas. La provincia es una zona de tránsito fronterizo (tránsito de personas, al ingreso de animales y alimentos).

4.5. FACTORES DE RIESGO DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE E INFLUENZA VIAR EN LA PROVINCIA DE EL ORO.

Para determinar factores de riesgo de la Enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar presentes en la provincia de El Oro se ejecutó mediante la observación directa de las características que presenta la provincia, a continuación, se especifica:

4.5.1. Susceptibilidad de las Aves Silvestres.

A pesar que en nuestro estudio no se logró aislar ningún virus de EN e IA en la provincia de El Oro, existe una diversidad de estudios realizados alrededor del mundo, que han confirmado la presencia de estos virus en aves silvestres y migratorias, esto sumado a la gran variedad de aves migratorias presentes en la provincia de El Oro mi de ellas silvestres, no se descarta la idea que puedan ser un factor importante para que se presente la enfermedad en cualquier momento por lo que la vigilancia debe ser permanente.

4.5.2. Presencia de Humedales

Las características de humedales no presentan un riesgo mayor para la entrada de estos virus debido a que los principales humedales que la provincia posee son ríos y quebradas muy caudalosos, solamente podrían presentar un riesgo en épocas de verano prolongado en el cual su caudal disminuye y proporcionan ambientes adecuados para la aglomeración de aves.

4.5.3. Vía Mecánica Mediante Transporte, Personas y otros Fómites Contaminados

Las formas de transmisión de los virus de EN e IA no se da únicamente por contacto directo sino también por fómites puesto que es un virus que sobrevive bien en materiales como cascaras de huevo y, especialmente con heces contaminadas, desechos de vacunas. La provincia es una zona de tránsito fronterizo (tránsito de personas, al ingreso de animales y alimentos). La supervivencia del virus es muy variable, probablemente debido a que se ve afectada por varios factores como la humedad, temperatura, agentes en suspensión y exposición a la luz, incluso un mal manejo de vacunas puede originar la enfermedad.

5. DISCUSIÓN

5.1. PRESENCIA DEL VIRUS DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR

En el trabajo de investigación se analizaron 300 muestras de heces frescas de aves silvestres migratorias y residentes de la provincia de El Oro, en al cual no se comprobó la presencia de los virus de la enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar. Mediante el cual se logró analizar muestras de especies aves silvestres pertenecientes a diversos órdenes de aves.

(Mendoza, 2012) Evaluó la presencia del virus de la Enfermedad de Newcastle en la laguna Albufera de Medio Mundo, situada al norte de Lima, y habitada por diversas especies de aves silvestres y migratorias. Se evaluó la actividad aglutinante del fluido alantoideo de los huevos embrionados obteniéndose resultados negativos en todas las muestras. La alta tasa de casos negativos puede deberse a que la recolección se hizo cuando el periodo de eliminación de virus en las aves ha terminado por lo cual al momento del análisis no estuvo presente el virus como lo explica CFSPH las gallináceas eliminan el APMV-1 por sólo 1-2 semanas, pero a menudo las psitácidas lo eliminan durante varios meses; algunas especies de aves psitácidas pueden eliminarlo por más de un año y la eliminación puede ser esporádica. En el caso de Influenza Aviar algunas cepas recientes de los virus de linaje asiático H5N1 (IAAP) se han encontrado en mayores cantidades en las secreciones respiratorias, que en las heces. Esto sugiere que, por lo menos en algunas aves silvestres, estas cepas pueden ya no ser transmitidas principalmente por vía fecal-oral.

5.2. AISLAMIENTO VIRUS DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR.

Los resultados de aislamiento presentes en este estudio no concuerdan con los obtenidos por Segovia en el periodo 2008-2009 en aves silvestres presentes en los Humedales de Puerto Viejo, en el departamento de Lima –Perú. Quien logro aislar siete cepas de virus de IA de baja patogenicidad del subtipo H12N5. Al igual no concuerdan (Cuevas & etal, 2005-2006) donde logro aislar un virus de Influenza Aviar de patotipo H7N3 de baja patogenicidad en anátidos.

Se plantearon dos hipótesis por cual no se logró aislar el virus una es que las aves al momento de recolección el virus no se encontraban presentes en las aves y la segunda es que el virus sí estuvo presente pero su concentración fue muy baja que no pudo mantenerse en los UTM medios de transporte y se perdió fácilmente por lo que se debe trabajar directamente con pruebas de RT- qPCR que es capaz de detectar pequeñas cantidades de ARN.

5.3. FACTORES DE RIESGO.

La presencia de estos virus de IA y VNC en las aves silvestres y migratorias por sí sola no constituye un peligro, lo sería en la medida que estos virus pudieran estar circulando en su organismo como portadores asintomáticos e interactuar con aves domésticas, como pollos, gallinas y pavos, aumentándose la probabilidad de adaptación a especies mamíferas y al hombre en el caso de IA pero en Newcastle existe esa posibilidad latente de incrementar su posibilidad de transmisión por contacto directo con aves comerciales y de traspatio (Beldomenico y Uhart, 2008).

Las características que presentan los humedales y sistemas hídricos de la provincia de El Oro la cual en su mayoría está constituida por ríos y quebradas con caudales fuertes que son muy distintos a estudios donde se han realizado aislamientos víricos de estas dos enfermedades por ejemplo: Ventocilla y col. 2011 aislaron 4 cepas de APMV-1, aparentemente de tipo lentogénico, en las heces colectadas de aves silvestres en la zona de la laguna albufera “El Paraíso” en Lima-Perú. Aunque en épocas de verano se presentan condiciones en los humedales por la disminución significante del caudal y formación de pequeñas “playas” en las riveras de ríos que permiten la aglomeración constituyendo un riesgo si es que entran en contacto con aves enfermas.

6. CONCLUSIONES

- Se analizaron 300 muestras, la prevalencia estimada fue de 0% con un intervalo de confianza de 0 a 1.19%.
- No se comprobó la presencia del virus de la enfermedad de Newcastle e influenza aviar en aves migratorias de humedales de la provincia de El Oro el periodo de recolección enero – febrero 2016.
- Existe gran variedad de especies de aves silvestres migratorias y residentes capaces de ser un medio de difusión de la enfermedad especialmente en aves de producción y traspatio.
- Al momento de la recolección de las muestras las aves no se encontraban eliminado los virus y no podían, por ello, constituir un reservorio de la enfermedad de VNC e IA razón por la cual no se constató la presencia de los virus.
- Los factores de riesgo de entrada de estas dos enfermedades no se enfoca en esta investigación a las aves silvestres migratorias o residentes por los resultados negativos que se consiguieron

.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar investigación epidemiológica para establecer zonas endémicas y libres de los virus mediante serología con pruebas screening o pruebas tamiz
- Continuar con el monitoreo de estas dos enfermedades en aves silvestres y migratorias, mediante estudios en base a RT qPCR que identifica pequeñas cantidades de virus ARN, tomando medidas preventivas y de control ya que en países cercanos como Chile y Perú se han reportado brotes.
- Realizar estudios en los posibles reservorios de los virus, en aves de producción y traspatio especialmente al momento en que se manifiesta la enfermedad de Newcastle en estas para sí determinar si hay o no transmisión a aves silvestres.
- Utilizar la técnica de ELISA ya que esta prueba indica la existencia de niveles de anticuerpos altos, dándonos un diagnóstico presuntivo de la presencia de la circulación del virus.

8. BIBLIOGRAFIA

Aguado, B. (2014). *Sección de Zoonosis y Riesgos Biológicos*. Recuperado el 26 de 07 de 2015, de http://www.colvema.org/PDF/GripeAviar.pdf

Albino, G. (agosto de 2007). *Inoculacion de virus en huevos embrionados.* Obtenido de https://es.scribd.com/doc/6851738/Virologia-Practica-05-Inoculacion-de-virus-en-huevos-embrionados

Alexander Piñon et al. (2013). *Instituto de medicina tropical pedro kouri.* Obtenido de http://tesis.repo.sld.cu/739/1/TESIS_Alexander_Pi%C3%B1%C3%B3n_Ramos.pdf

Angulo, E. (2014). *Virbac* . Recuperado el 19 de 07 de 2015, de http://www.webveterinaria.com/virbac/news16/aves.pdf

Araujo, J. R. (2011). Enfoque Zoonótico de la Enfermedad de Newcastle. *Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Lara*(1), 1.

Araujo, R. (07 de 2011). *Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Lara*. Recuperado el 16 de 07 de 2015, de http://revistacmvl.jimdo.com/suscripci%C3%B3n/volumen-1/new-castle/

Armijos, J. (2014). *Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Loja.* Obtenido de http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/12362/1/Janeth%20Elizabeth%20Armijos%20Monta%C3%B1o.pdf

Autor. (2016).

Brett, M., & Saume, E. (10 de 01 de 2006). *CENIAP*. Recuperado el 26 de 07 de 2015, de http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n10/arti/brett_m/arti/brett_m.htm

Briseño, M. Á. (2012). *México Gallero*. Recuperado el 20 de 07 de 2015, de http://www.mexicogallero.net/index.php?option=com_content&view=article&id=214:newcastle-prevencion-y-control&catid=32:enfermedades&Itemid=47

Bug, L. (13 de junio de 2014). *Prezi.com.* Obtenido de Reacciones de hemoaglutinacion: https://prezi.com/_5qfpbrppqrq/reacciones-de-hemaglutinacion/

Carlos Badillo, C. Y. (31 de marzo de 2011). *SliderShare*. Obtenido de http://es.slideshare.net/cbadillodiaz/newcastle-aves

CDC. (18 de 03 de 2015). *Centros para el Control y Prevención de Enfermedades*. Recuperado el 26 de 07 de 2015, de http://espanol.cdc.gov/enes/flu/avianflu/avian-in-birds.htm

CINFA, A. (2016).

COPAN. (2016). *RED.* Obtenido de http://www.red-gdl.com/portfolio-view/medio-de-transporte-universal-utm/

CReSA. (2013). *Gripe Aviar*. Recuperado el 26 de 07 de 2015, de http://www.cresa.es/granja/gripe-aviar.pdf

Cuello et al. (06 de 06 de 2011). *REDVET*. Recuperado el 18 de 07 de 2015, de http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060611/061111.pdf

Cuevas, & etal. (2005-2006). *Aislamiento de virus.* Mexico.

Cuevas, E. (abril de 2009). *Redalyc.* Obtenido de revista electronica de veterinaria: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63611961006

Dinev, I. (2014). *El Sitio Avicola*. Recuperado el 18 de 07 de 2015, de http://www.elsitioavicola.com/publications/6/enfermedades-de-las-aves/275/enfermedad-de-newcastle-nd/

Endara, R. A. (2014). *UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS* . Obtenido de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4479/1/Buendia_er.pdf

Escudero, G. (2015). *Cedamaz.* Obtenido de prevalencia del virus de newcastle en pollos nativos de las comunidades rurales en el sur del ecuador: https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/51

Espinoza, J. A. (2011). *UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS* . Recuperado el 29 de 07 de 2015, de http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibVirtualData/Tesis%20para%20marcaci%C3%B3n3%20%28para%20Inform%C3%A1tica%29/2011/rondon_ej/rondon_ej.pdf

García, L. (2009). *Instituto Politecnico Nacional*. Obtenido de http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/4264/MONITOREOINFLUEN.pdf?sequence=1

Garcia, R. (9 de Marzo de 2015). *El Sitio avicola*. Obtenido de El Sitio Avicola: http://www.elsitioavicola.com/articles/2689/aves-migratorias-y-la-gripe-aviar/

González. (1986). *Muestreo.*

Health, T. C. (01 de 2010). *Institute For International Cooperation In Animal Biologics*. Recuperado el 27 de 07 de 2015, de http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/influenza_aviar_de_alta_patogenicidad.pdf

HIPRA. (2013). *HIPRA*. Recuperado el 23 de 07 de 2015, de https://www.hipra.com/wps/portal/web/inicio/conocimientoHipra/patologias/!ut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3gDU8dASydDRwMLpwADA09PC2cXA3MnA28LE_2CbEdFAIQWwfY!/?WCM_GLOBAL_CONTEXT=/web_es/hipra/secciones/conocimientodehipra/patologias/aves/pt2010070722

ICA. (2009). *GUIA PARA LA PREVENCIÓN, CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA ENFERMEDAD DEL NEWCASTLE.* Bogotá: Produmedios.

Iglesia Martin et al. (2008). *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. Obtenido de file:///C:/Users/HP/Downloads/23682-23701-1-PB.PDF

J, A. R. (2011). *Enfoque Zoonótico de la Enfermedad de Newcastle. R.*

Jong-wook, L. (2005). Worl Organization Health. *Centro para el Control y la prevencion de enfermedades*, 2-3.

Karen Segovia et al . (2013). *Scielo peru.* Obtenido de Revista de investigaciones veterinarias del peru: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172013000100014&script=sci_arttext

Katrin Ventocila et al. (2011). *SCIELO PERÚ*. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172011000100007&script=sci_arttext

Leon, L. (25 de febrero de 2013). *Manual de practicas del laboratorio de virologia.* Obtenido de http://veterinaria.uaemex.mx/_docs/607_974_MP%20Virolog%C3%ADa.pdf

Luis Mendoza et al . (diciembre de 2012). *Scielo peru.* Obtenido de revista de investigaciones veterinarias del peru: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172012000400020&script=sci_arttext

Malo, A. (08 de 04 de 2011). *WATTAgNet.com*. Obtenido de http://www.wattagnet.com/La_enfermedad_de_Newcastle_es_una_grave_amenaza_para_las_parvadas_comerciales_en_Am%C3%A9rica_Latina.html

Mapas, E. (2015). *Mapa de la Organizacion Terriotial del Loja*. Obtenido de http://www.mapasecuador.net/mapa/mapa-loja-mapa-division-politica.html

Marín, F. P. (12 de 06 de 2012). *Avicultura*. Recuperado el 25 de 07 de 2015, de http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/actualidades-sobre-enfermedad-newcastle-t4179/165-p0.htm

Melissa Viveros et al. (13 de 03 de 2012). *Mundo Pecuario*. Recuperado el 23 de 07 de 2015, de http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/35474/1/articulo6.pdf

Mendoza. (2012). *Virus del Newcstle.*

Moreno, R. (1994). La enfermedad del Newcastle y algunos avances recientes del diagnostico. *Ciencia Veterinaria, 6*, 46-70.

Natalia Majo, R. D. (2011). *Atlas de Necropsia Aviar.* Obtenido de http://edicioneselprofesional.com.co/pdf/598.pdf

Noguera, C. R. (Agosto de 2003). *Sanidad Animal*. Recuperado el 16 de 07 de 2015, de http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n2/texto/cramirez.htm

OIE. (2004). *Enfermedad de Newcastle.* Obtenido de http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.1.15_Enfermedad_de_Newcastle.pdf

OIE. (2013). *Organización Mundial de Sanidad Animal*. Recuperado el 26 de 07 de 2015, de http://www.oie.int/doc/ged/D13948.PDF

OIE. (2013). *Organización Mundial de Saninad Animal*. Recuperado el 21 de 07 de 2015, de http://www.oie.int/doc/ged/D13966.PDF

OIE. (mayo de 2015). Obtenido de Influenza Aviar: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf

OIE. (mayo de 2015). *Influenza Aviar.* Obtenido de http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf

Quintana, A. J. (27 de 04 de 2012). *Scribd*. Recuperado el 20 de 07 de 2015, de http://es.scribd.com/doc/91474998/Virus-de-La-Enfermedad-de-Newcastle#scribd

Quintero, M. (19 de mayo de 2012). *Enfermedad de Newcastle*. Recuperado el 15 de 07 de 2015, de http://manuelquintero2489.blogspot.com/2012/05/enfermedad-de-newcastle.html

Ramos, M. F. (noviembre de 2003). *USAC*. Obtenido de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10_0930.pdf

Ridgely, R., & Greenfield. (2006). *Identificación de Aves.*

Rivera, O. (2016). Interrogante Epidemiologico Mundial. *Aves Migratorias y la gripe aviar*.

Romero, F. C. (2003). *Universidad Nacional Mayor de San Marcos.* Recuperado el 24 de 07 de 2015, de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/846/1/Caballero_rf.pdf

Sánches, L. (16 de Marzo de 2006). *http://noticias.uach.cl/*. Obtenido de http://noticias.uach.cl/principal.php?pag=noticia-externo&cod=5428

SENASA. (08 de 2009). *Manual de Procedimientos www.senasa.gov.ar*. Recuperado el 30 de 07 de 2015, de http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File2820-influenza-aviar.pdf

Serma. (2011). *Newcastle en Aves.*

Sevilla, E. (2014). influenza Aviar. *Enfermedad Viral en Aves*, 10.

Swayne, D. E., Halvors, D., & A. (2003). *Influenza* (Undecima Diseases of Poultry ed.). Estados Unidos: Board ford the American Association of Avian.

The Center for Food Security & Public Health. (2011). *Programa Nacional de Acreditación Veterinaria.* Iowa, Estados Unidos. Obtenido de http://www.aphis.usda.gov/NVAP

Viveros M., C. L. (2012). *Control y prevención del virus Newcastle en aves de unidades de producción familiar en comunidades de las colonias agrícolas de Yumare.* Mundo Pecuario.

wikipedia. (30 de noviembre de 2016). *wikipedia la enciclopedia libre*. Obtenido de https://es.wikipedia.org/wiki/Provincia_de_Loja

Zuluagua Ruiz, j. (21 de febrero de 2012). *SliderShare*. Obtenido de http://es.slideshare.net/homsapdel/esquema-pai-colombia

9. ANEXOS

Anexo 1. Elaboración del mapa para ubicar sitios de muestreo con el personal del CINFA- UNL.

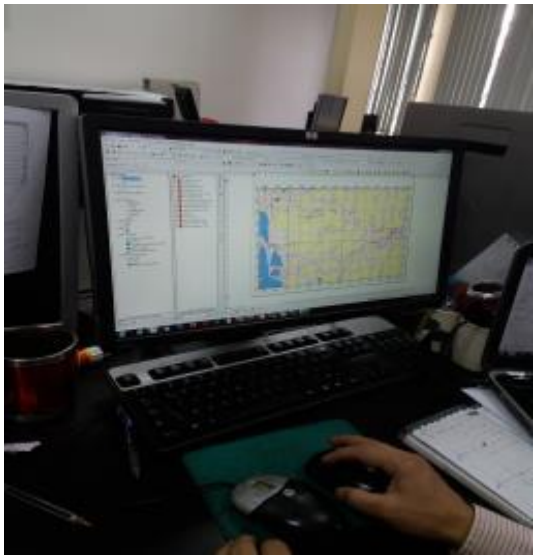


Foto 1. Elaboración de mapa CINFA

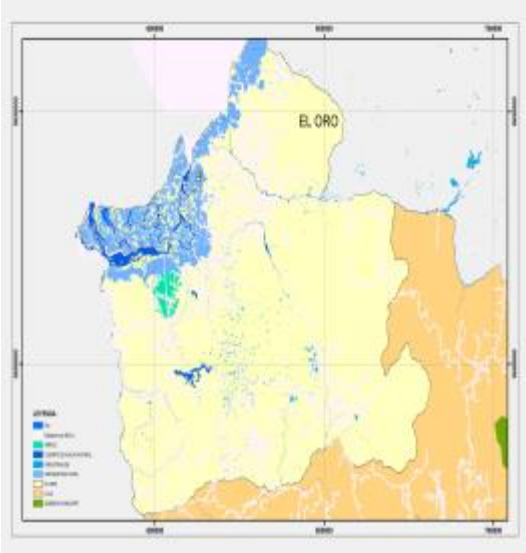


Foto 2. Cuadrantes

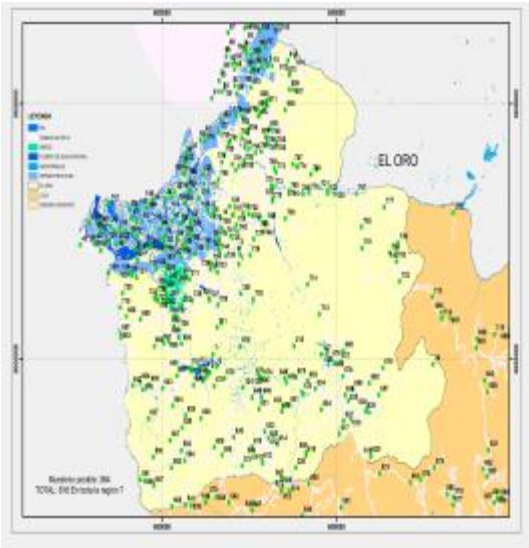


Foto 3. Sitios/sector

Foto 4. Puntos de muestreo

Anexo 2. Recolección de las muestras en los diferentes puntos de muestreo.

Foto 5. Colocacion de muestra en el tubo UTM

Foto 6. Recolecion de heces frescas

Foto 7. Recolección de heces en diferentes sitios

Foto 8. Recolección de heces frescas en humedales

Foto 9. Identificación de heces de las aves Frescas en humedales

Foto 10. Recolección de heces de diferentes especies

Anexo 3. Tipos de aves muestreadas y sus respectivos registros.

Foto 11. Garceta Grande (*Ardea alba)*

Foto 12. *Cormorán Neotropica (Fragatamagnificens)*

Foto 13. Gallinazo Negro *Coragyps atrus*

Foto 14. Tucán Coliblanco *Ramphastos tucanus*

Foto 15. Amazona Frentirroja (*Amazona autumnalis)*

Foto16. Garcete Azul (*Engretta caerulea)*

Foto 14. Perico Cachetigrís

(Brotogeris pyrrhoptherus)

Foto 15. Mirlo Grande (*Turdus uscater)*

Foto 19. Pastorero Peruano
(*Sturnella bellicosa)*

Foto 20. Oropéndola De Casco
(Clypicterus osery)

Foto 21. Ibis Blanco *(Eudocrimus albus)*

Anexo 4. Muestras totales recolectas en diferentes puntos.

Foto 22. Muestras totales en los tubos UTM

Anexo 5. Laboratorio de patología aviar Universidad Nacional Mayor De San Marcos

Foto 23. Universidad de San marcas

Foto 24. Medicina veterinaria

Foto 25. Laboratorio de patología aviar

Foto 26. Procesamiento de muestras

Foto 27. Estufa estéril

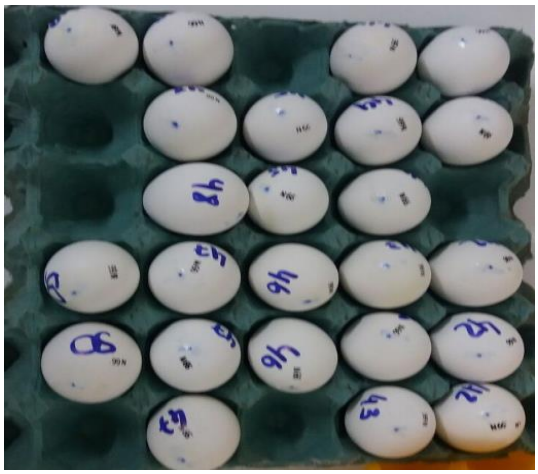
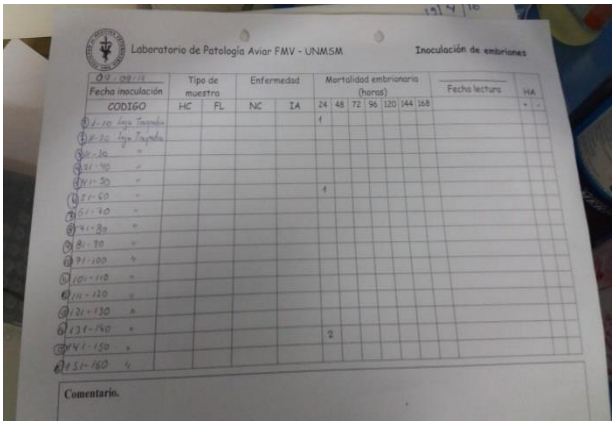


Foto28. Huevos fertiles



Laboratorio de Patología Aviar FMV – UNMSM

Inoculación de embriones

Fecha inoculación	Tipo de muestra		Enfermedad		Mortalidad embrionaria (horas)						Fecha lectura	HA	
CODIGO	HC	FL	NC	IA	24	48	72	96	120	144	168				
1 1-10 Tipo Trapezoide					1								
2 11-20 Tipo Trapezoide													
3 21-30 "													
4 31-40 "													
5 41-50 "					1								
6 51-60 "													
7 61-70 "													
8 71-80 "													
9 81-90 "													
10 91-100 "													
11 101-110 "													
12 111-120 "													
13 121-130 "													
14 131-140 "					2								
15 141-150 "													
16 151-160 "													

Comentario.

Foto 29. Registro inoculación de embriones