



Universidad  
Nacional  
de Loja

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

**“PREVALENCIA SEROLÓGICA DE LA ENFERMEDAD INFLUENZA  
AVIAR EN AVES DE TRASPATIO DE LA PROVINCIA DE LOJA”**

Trabajo de tesis previo a la obtención del título de  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**AUTOR:**

Ángel Medardo Tandazo Chamba

**DIRECTOR**

Dr. Galo Vinicio Escudero Sánchez Mg. Sc.

**LOJA – ECUADOR**

**2019**

## **CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Galo V. Escudero Sánchez, Mg. Sc.  
**DIRECTOR DE TESIS**

### **CERTIFICA:**

Haber revisado la presente tesis titulada “PREVALENCIA SEROLÓGICA DE LA ENFERMEDAD INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO DE LA PROVINCIA DE LOJA” realizada por el Sr. Ángel Medardo Tandazo Chamba, la misma que **CULMINÓ DENTRO DEL CRONOGRAMA APROBADO**, cumpliendo con todos los lineamientos establecidos en la reglamentación vigente de la Universidad Nacional de Loja, por lo cual, **SE AUTORIZA LA CONTINUACIÓN DEL TRÁMITE DE GRADUACIÓN.**

Loja, 23 de agosto de 2019

Atentamente,



Dr. Galo V. Escudero Sánchez, Mg. Sc.  
**DIRECTOR DE TESIS**

# CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

**“PREVALENCIA SEROLÓGICA DE LA ENFERMEDAD INFLUENZA AVIAR  
EN AVES DE TRASPATIO DE LA PROVINCIA DE LOJA”**

POR

Ángel Medardo Tandazo Chamba

Tesis presentada al tribunal de grado como requisito previo a la obtención del título de:  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.

**APROBADO**

Loja, 04 de octubre 2019



---

Ph.D. Rodrigo Medardo Abad Guamán  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



---

Dr. Manuel Benjamín Quezada Padilla

VOCAL



---

Dra. Iliana Natacha Ramírez Sanmartín

VOCAL


## AUTORÍA

Yo, **Ángel Medardo Tandazo Chamba**, declaro ser autor del presente trabajo de tesis que ha sido desarrollada con base a una investigación exhaustiva y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma; los conceptos, ideas, resultados, conclusiones y recomendaciones vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación, son de absoluta responsabilidad de su autor.

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

**AUTOR:** Ángel Medardo Tandazo Chamba

**FIRMA:**



**CÉDULA:** 1105115172

**FECHA:** 04 de octubre del 2019

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

Yo, **Ángel Medardo Tandazo Chamba**, declaro ser el autor de la tesis titulada “PREVALENCIA SEROLÓGICA DE LA ENFERMEDAD INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO DE LA PROVINCIA DE LOJA”, como requisito para optar al grado de Médico Veterinario Zootecnista; autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera, en el Repositorio Digital Institucional (RDI). Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo con el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad. La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero. Para constancia de esta autorización, firmo en la ciudad de Loja, a los días del mes de            del 2019

**FIRMA:**



**Autor** Ángel Medardo Tandazo Chamba  
**Cédula de Identidad:** 1105115172  
**Dirección:** Loja, Av. Barcelona y León  
**Correo electrónico:** angelmtandazo@hotmail.com  
**Celular:** 0994850229

**DATOS COMPLEMENTARIOS:**

**Director de Tesis:**

Mg. Sc. Galo V. Escudero Sánchez.

**Tribunal de grado:**

Ph.D. Rodrigo Medardo Abad Guamán (Presidente)  
Dr. Manuel Benjamín Quezada Padilla, Mg.Sc. (Vocal)  
Dra. Iliana Natacha Ramírez Sanmartín, Mg.Sc. (Vocal)

## **AGRADECIMIENTO**

*Primeramente a Dios, a la Virgen del Cisne y al Señor Cautivo de Ayabaca por haber iluminado mi camino, protegerme, bendecirme y permitir que llegue hasta esta meta muy importante en mi vida.*

*Agradecer infinitamente a mis padres Medardo Tandazo y Mariela Chamba que con su esfuerzo y dedicación me han ayudado a seguir en mis estudios académicos dándome apoyo moral y económico ante la prosperidad y adversidad de la vida ya que con sus consejos y buen ejemplo me han enseñado a no decaer y seguir adelante; así mismo a mis hermanas Nancy, Rocío, Rosa, Verónica y Yuliana por brindarme todo su apoyo y confianza para lograr esta meta.*

*A mi Esposa Thalia Cueva y mi hijo Jahdiel compañeros de vida que son mi motivo e inspiración de seguir adelante en mi vida; brindándome el apoyo incondicional para lograr mis metas y no desfallecer en el proceso y sobresalir en todas los obstáculos que se presenten en el camino y hacerme saber que están a mi lado en todo momento.*

*Agradezco a la Universidad Nacional de Loja que me acogió en las instalaciones de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, a las Dignas Autoridades y Docentes que mediante sus valiosas enseñanzas supieron brindarme sus conocimientos formándome de buenos valores y disciplina para ser un buen profesional.*

*Mis más sinceros agradecimientos a mi director de tesis Dr. Galo Vinicio Escudero Sánchez, Mg Sc.; quien mediante su confianza, tolerancia y conocimientos supo guiarme en el desarrollo de la investigación y estuvo presto para ayudarme en todo el proceso.*

*De igual manera a mis compañeros y amigos de aula Kimberly, Jefferson, Ronald, Marco y Patricio quienes me brindaron su amistad, compartieron aula y conocimientos académicos y gracias a su apoyo y consejos me ayudaron a lograr esta meta muy anhelada.*

**Ángel Medardo Tandazo Chamba**

## **DEDICATORIA**

*Primero a mi Dios, Virgen Santísima y al Señor Cautivo de Ayabaca por derramar todas sus bendiciones y guiar mi camino y llenarme de fuerza y sabiduría en este proceso.*

*A mis amados padres Medardo y Mariela que son el soporte fundamental de mi vida y que gracias a todo su apoyo, paciencia y consejos brindados me han ayudado en educación y así formarme y ser una mejor persona en la vida; a mis hermanas Nancy, Rocío, Rosa, Verónica y Yuliana por la confianza, apoyo y aliento brindado para seguir adelante.*

*De la misma manera a mi Esposa Thalia Cueva y mi hijo Jahdiel que siempre han estado junto a mí brindándome el apoyo incondicional y ser el bastón para seguir mi camino en cada proceso de mi vida y ser mi inspiración para no darme por vencido.*

*A mis amigos Kimberly, Jefferson, Ronald, Marco y Patricio que compartieron este gran proceso brindándome su amistad y colaboraron de la manera más idónea para llegar a esta meta esperada.*

**Ángel Medardo Tandazo Chamba**

# Índice general

ÍNDICE DE TABLA .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
RESUMEN .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1 ENFERMEDAD DE INFLUENZA AVIAR .....	3
2.1.1 Importancia Económica .....	3
2.1.2 Historia .....	4
2.1.3 Etiología .....	4
2.1.4 Clasificación del Virus de IA .....	4
2.1.5 Morfología del Virus de Influenza Aviar y Estructura .....	5
2.1.6 Proteína NA y HA .....	5
2.1.7 Proteína M2 .....	6
2.1.8 Ciclo de Replicación Viral del Virus de Influenza Aviar .....	7
2.1.9 Patogenicidad e Virus De Influenza Aviar .....	7
2.1.10 Transmisión del Virus de Influenza Aviar .....	8
2.1.11 Periodo de Incubación .....	8
2.1.12 Signos Clínicos .....	8
2.1.13 Lesiones Macroscópicas .....	9
2.1.14 Diagnóstico .....	9
2.1.15 Secuenciación del Virus de IA .....	10
2.1.16 Diagnóstico de Laboratorio .....	10
2.1.17 Diagnóstico de Diferencial .....	11



2.1.18	Prevención y Control.....	12
2.1.19	Vacunación.....	12
2.1.20	Vacunas de Virus Completamente Inactivado.....	13
2.1.21	Almacenamiento y Transporte de Muestras.....	13
2.1.22	Copan Medio de Transporte Universal (Utm-Rt) .....	13
2.1.23	Formulación del Medio UTM-RT .....	13
2.1.24	Huevos Embrionados Libre de Patógenos Específicos (SPF) .....	14
2.2	TRABAJOS RELACIONADOS .....	14
3.	METODOLOGÍA .....	16
3.1	MATERIALES .....	16
3.1.1	De Campo.....	16
3.1.2	De Laboratorio .....	16
3.1.3	De Oficina.....	16
3.2	MÉTODOS.....	16
3.2.1	Delimitación del Área de Estudio .....	16
3.2.2	Descripción del Estudio .....	17
3.2.3	Tipo de Muestreo y Tamaño de la Muestra .....	18
3.2.4	Variables .....	18
3.3	RECOPIACIÓN DE LA INFORMACIÓN.....	18
3.3.1	Toma y Registro de Datos.....	18
3.3.2	Trabajo de Campo .....	18
3.3.3	Análisis de Laboratorio .....	19
3.4	PROCEDIMIENTO DE LA INFORMACIÓN.....	20
3.4.1	Análisis Estadístico.....	20
4.	RESULTADOS.....	21

<b>4.1 PREVALENCIA DE INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO DE LA PROVINCIA DE LOJA .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO DE LA PROVINCIA DE LOJA.....</b>	<b>22</b>
<b>5. DISCUSIÒN.....</b>	<b>23</b>
<b>5.1 SEROPREVALENCIA .....</b>	<b>23</b>
<b>5.2 FACTORES DE RIESGO .....</b>	<b>24</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>26</b>
<b>7. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>27</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>28</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>32</b>

## ÍNDICE DE TABLA

<b>Tabla 1.</b> Composición Molecular del virus de Influenza .....	6
<b>Tabla 2.</b> Títulos positivos de la Seroprevalencia de la enfermedad de Influenza Aviar ....	21
<b>Tabla 3.</b> Seroprevalencia de Influenza Aviar en Aves de Traspatio de Diferentes Especies de la Provincia de Loja .....	21
<b>Tabla 4.</b> Prevalencia de Influenza Aviar en Aves de Traspatio en la Provincia de Loja, y Factores asociados. ....	22

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cantones de la Provincia de Loja. ....	17
<b>Figura 2.</b> Aves de traspatio a la intemperie.....	32
<b>Figura 3.</b> Aves de traspatio en corral .....	32
<b>Figura 4.</b> Aves de traspatio expuestas al contacto directo con aves silvestres.....	33
<b>Figura 5.</b> Ubicación de la vena alar para extracción de sangre.....	33
<b>Figura 6.</b> Extracción de la muestra de sangre .....	34
<b>Figura 7.</b> Centrifugación de las muestras para extracción del plasma sanguíneo.....	35
<b>Figura 8.</b> Finalización de la centrifugación para extraer del plasma sanguíneo .....	35
<b>Figura 9.</b> Muestras del plasma para su análisis .....	36
<b>Figura 10.</b> Kit de ELISSA para detección de Influenza Aviar.....	36
<b>Figura 11.</b> Colocación de las muestras en la placa .....	37
<b>Figura 12.</b> Colocación de las muestras diluidas en los pocillos correspondientes.....	37
<b>Figura 13.</b> Lavado de los pocillos .....	38
<b>Figura 14.</b> Agregamos solución stop a los pocillos correspondientes .....	38
<b>Figura 15.</b> Placa para la lectura en el espectrofotómetro .....	39
<b>Figura 16.</b> Lectura de la placa en el espectrofotómetro .....	39

**“PREVALENCIA SEROLÓGICA DE LA ENFERMEDAD INFLUENZA  
AVIAR EN AVES DE TRASPATIO DE LA PROVINCIA DE LOJA”**

## RESUMEN

El presente estudio observacional de corte transversal, tuvo como objetivo determinar la prevalencia serológica del virus de Influenza Aviar en aves de traspatio en la provincia de Loja. Se obtuvieron 276 muestras de sangre de aves en explotaciones de traspatio por punción alar de los cantones: Loja, Chaguarpamba, Catamayo y Zapotillo. Las explotaciones incluidas en el estudio estaban localizadas cerca de humedales y avicultura comercial. Se aplicó una encuesta epidemiológica en cada una de las propiedades, para recoger información acerca de las siguientes variables: procedencia (parroquia y cantón), manejo de más de un sistema de explotación avícola y factores de riesgo que influyen en la presencia de esta enfermedad como es cercanía de humedales entre otros. Las muestras de sangre colectadas fueron sometidas a serología mediante la prueba de ELISA indirecta con el kit de prueba de anticuerpos contra la Influenza Aviar (BioChek) para detección del virus de Influenza Aviar (LP H7N1, H9N2, LP H5N2, O H6N2); de las 276 muestras resultaron 4 muestras positivas con un porcentaje de (1,44%), y 272 muestras negativas con un porcentaje de 98,56%. En los cantones Loja, Chaguarpamba, Catamayo y Zapotillo tuvieron un resultado igualitario de 0,36% una en cada cantón. Dentro de las especies analizadas gallo y gallina tuvieron una prevalencia de 0.72% mientras que en los gansos la prevalencia fue 0%; debiendo ratificarse por pruebas confirmatoria como PCR. En lo que respecta a las variables que se mencionaron en este estudio, de acuerdo al análisis estadístico, el Test. Fisher siendo valores de p inferiores a 1 como estadísticamente no significativos el p valor de los cantones es de (p valor=0.2369), en cuanto a la producción de aves comerciales y especie de aves el (p valor=1). En lo que se refiere a las aves vacunadas el (p valor=1). Por cuanto podemos decir que no se encontró ningún factor asociado que influya en la enfermedad de Influenza Aviar cerca de humedales y granjas avícolas. Concluyendo que esta enfermedad no representa riesgos para la producción avícola comercial en el periodo en el cual se efectuó este estudio.

**Palabras clave:** influenza, prevalencia serológica, traspatio, húmedales, factores de riesgo.

## ABSTRACT

The present cross-sectional observational study aimed to determine the serological prevalence of Avian Influenza virus in backyard birds in the province of Loja. A total of 276 samples of bird blood were obtained in backyard farms due to alar puncture of the cantons: Loja, Chaguarpamba, Catamayo and Zapotillo. The farms included in the study were located near wetlands and commercial poultry. An epidemiological survey was applied in each of the properties, to collect information about the following variables: origin (parish and canton), management of more than one poultry exploitation system and risk factors that influence the presence of this disease as It is close to wetlands among others. Blood samples collected were subjected to serology by indirect ELISA with the Avian Influenza antibody test kit (BioChek) for detection of Avian Influenza virus (LP H7N1, H9N2, LP H5N2, or H6N2); Of the 276 samples, 4 positive samples resulted with a percentage of (1.44%), and 272 negative samples with a percentage of 98.56%. In the cantons Loja, Chaguarpamba, Catamayo and Zapotillo had an equal result of 0.36% one in each canton. Among the species analyzed rooster and chicken had a prevalence of 0.72% while in geese the prevalence was 0%; must be ratified by confirmatory tests such as PCR. Regarding the variables mentioned in this study, according to the statistical analysis, the Test. Fisher being p values less than 1 as statistically non-significant, the p value of the cantons is (p value = 0.2369), in terms of the production of commercial birds and species of birds the (p value = 1). Regarding vaccinated birds, the (p value = 1). As we can say that no associated factor was found that influences Avian Influenza disease near wetlands and poultry farms. Concluding that this disease does not represent risks for commercial poultry production in the period in which this study was carried out.

**Key words:** avian influenza, serological prevalence, backyard, wetlands, risk factors.

# 1. INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, la producción avícola se desarrolla a nivel industrial y de traspatio; la producción industrial cuenta con sistemas de manejo tecnificado y de alta bioseguridad que incluye la vacunación para la protección de las aves contra muchas enfermedades que podrían ocasionar serias pérdidas económicas. Por otro lado; la producción de traspatio tiene poca o ninguna tecnificación y con casi total ausencia de bioseguridad. Este segmento representa el 24,95% de la producción avícola en el Ecuador (ESPAC, 2017).

Tanto la producción avícola industrial y de traspatio son susceptibles a enfermedades infecciosas avícolas (Vargas, 2016). El uso rutinario de vacunas con virus vivos modificados para el control de enfermedades en el sector industrial y su estrecha relación con las aves de traspatio, podría convertir a las aves de traspatio en reservorios de enfermedades que afectarían al sector industrial o viceversa. (AGROCALIDAD, 2016), ha puesto en marcha y ha ejecutado monitoreos de vigilancia activa para el control y prevención de enfermedades respiratorias de importancia e interés económico para el país; siendo las principales la Influenza Aviar, que es de notificación obligatoria establecido por la Organización Mundial de Sanidad Animal – OIE. Además, es una barrera sanitaria importante que limita los procesos para la exportación de productos y subproductos avícolas, pues uno de los requisitos exigidos por los Servicios Sanitarios es la declaración, por parte de la OIE, como país o zonas libres de las enfermedades para realizar esta actividad, lo que implica la ausencia de la enfermedad en el país exportador (OIE, Código Sanitario Para los Animales Terrestres, 2018).

Las aves de traspatio son consideradas, por ciertos grupos, como potenciales reservorios de enfermedades para las aves comerciales no obstante, las aves de traspatio estuvieron antes que las aves comerciales y que, por su comportamiento etológico y el manejo natural no requieren de procesos de bioseguridad minuciosos como las aves comerciales que son criadas en espacios reducidos y condiciones especiales que permiten lograr los altos niveles de producción. El uso de vacunas con agentes vivos atenuados, podrían “accidentalmente”, llegar a las aves de traspatio



quienes podrían facilitar la mutación de estos agentes de cepas vacúnales a cepas de campo, incrementando el riesgo de brotes epidemiológicos en aves comerciales (Camacho, *et al.*, 2009).

La avicultura de traspatio una de sus características de este tipo de explotación es su pobre estructura y organización tanto en la parte de manejo, nutrición y sobre todo la sanitaria con escaso control de enfermedades, uso de vacunas y pobre bioseguridad, provocando altas mortalidades con la presencia de enfermedades letales entre estas podría estar Influenza Aviar (Pérez & Polanco, 2003).

Los virus de la influenza aviar son extremadamente variables, altamente contagiosos, y están ampliamente distribuidos entre las aves, especialmente en especies acuáticas, domésticas y silvestres. La gripe aviar es causada por un virus RNA (CFSPH, 2016). Una vez establecida, se puede diseminar rápidamente de parvada en parvada, para prevenir de estas enfermedades es necesario tener una estricta bioseguridad y llevar un calendario de vacunación en países donde esta práctica se ha implementado (Cardona, 2003).

En el presente estudio se propuso establecer la circulación viral de esta enfermedad a través de estudios serológicos y para lo cual se planteó los siguientes objetivos:

- Establecer la prevalencia serológica del virus de la enfermedad de Influenza Aviar en las aves de traspatio cerca de humedales y de granjas avícolas comerciales en la provincia de Loja mediante ELISA indirecta.
- Determinar factores de riesgo que influye la presencia del virus de Influenza Aviar en las aves de traspatio cerca de humedales y granjas a avícolas comerciales en la provincia de Loja.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 ENFERMEDAD DE INFLUENZA AVIAR**

Es la enfermedad causada por la infección del virus de la influenza (gripe) aviar (IA) (de aves) 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, 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 producir enfermedad y hasta matar a ciertas especies de aves domésticas, incluidos los pollos, los patos y los pavos (CDC, Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, 2015).

La mayoría de los virus de la IA son altamente patógenos y típicamente causan ninguno o muy pocos síntomas clínicos en aves infectadas, produciendo la muerte de inmediato. Algunos virus de baja patogenicidad de la IA son capaces de mutar a virus altamente patógenos bajo condiciones de campo (Gylstorff & Grimm, 1987).

Las epidemias de influenza aviar de alta patogenicidad se pueden propagar rápidamente, devastar la industria avícola y originar graves restricciones comerciales. Algunos virus de influenza aviar también pueden infectar a los mamíferos, como también a los humanos. La gravedad de la influenza aviar zoonótica varía según el virus (Rovid, Roth, Galyon, Lolsledt, & Lenardon, 2010).

#### **2.1.1 Importancia Económica**

El impacto comercial y económico es una preocupación cuando existen epidemias por H5/H7 de Influenza Aviar de Alta patogenicidad (IAAP) o Influenza Aviar de Baja patogenicidad (IABP). Las epidemias de IAAP están asociadas con pérdidas directas de índices de morbilidad y mortalidad que pueden alcanzar un 100% en las especies afectadas, un posible impacto zoonótico, con gastos relacionados con la atención médica. Las epidemias de IABP pueden estar asociadas con pérdidas directas derivadas de la disminución en la producción de huevos, el aumento de morbilidad y mortalidad en las aves afectadas y demás costos de la enfermedad (CFSPH, The Center for Food Security & Public Health, 2016).

### **2.1.2 Historia**

La primera descripción de la enfermedad se realizó en el Norte de Italia en 1878, cuando Perroncito describió una enfermedad contagiosa que afectaba a las aves domésticas causándoles una mortalidad elevada. Fue conocida como peste aviar y se confundía inicialmente con la forma aguda del cólera aviar. Sin embargo, en 1880, poco después de su primera descripción, Rivolta y Delprato mostraron la diferencia de esta enfermedad con el cólera aviar basándose en sus características clínicas y patológicas, y así, la llamaron “Typhus exudatious gallinarum”. En 1901, Centanni y Savunzzi mostraron que el agente etiológico de la enfermedad no era una bacteria sino un virus ultra-filtrable, aunque no fue hasta 1955 cuando Schäfer mostró que la clásica peste aviar estaba causada por un virus influenza tipo A (Lupiani & Reddy, 2009).

En 1981, se abandonó el término Plaga Aviar y se tomó el de Influenza Aviar altamente patógena. En agosto del 2000, el virus de Influenza Aviar H7N1 reapareció en pavos de engorde en la parte sur de la provincia de Verona al norte de Italia. Este fue un virus de moderada patogenicidad. En diciembre del 2000 a Abril del 2001, 29 virus de Influenza Aviar H5N1, de alta patogenicidad fueron aislados de patos y gansos. Algunos genes internos fueron similares a los del virus que afectó el área en 1997 (Swayne, 1998).

### **2.1.3 Etiología**

La influenza aviar se produce como resultado de virus que pertenecen a la especie influenza virus A, género influenza virus A y familia Ortomixoviridae. Estos virus también se denominan "virus de gripe tipo A" (CFSPH, The Center for Food Security & Public Health, 2016).

Para su inactivación pueden aplicarse temperaturas de 56°C por 3 horas ó 60°C por 30 min. Es vulnerable a pH ácido y a agentes oxidantes, (dodecil sulfato de sodio) y disolventes de lípidos, ( $\beta$ -propiolactona), se inactiva por la acción de la formalina y compuestos de yodo. En cuanto a su supervivencia permanece por largo tiempo en los tejidos, heces y agua (Fenner, 1992).

### **2.1.4 Clasificación del Virus de IA**

Los virus de la influenza A se clasifican en subtipos en base a dos antígenos de superficie; las proteínas hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N). Existen 16 antígenos hemaglutinina (de H1 a

H16) y nueve antígenos neuraminidasa (de N1 a N9). Estas dos proteínas participan en la adhesión de las células y la liberación desde las células. Los subtipos de los virus de la influenza A se clasifican en cepas. Las cepas de los virus de influenza se describen de acuerdo a su tipo, su huésped, el lugar del primer aislamiento, el número de cepa (si lo hubiera), el año de aislamiento y el subtipo de antígeno (Rovid, Roth, Galyon, Lolsledt, & Lenardon, 2010).

Los virus influenza A se dividen en dos grupos en función de la virulencia de la enfermedad que producen en las especies susceptibles. Los muy virulentos, pueden llegar a producir una tasa de mortalidad de hasta el 100% en 48 horas y son conocidos como altamente patógenos. Estos virus han sido restringidos a los subtipos H5 y H7 (OIE, Terrestrial Animal Health Code 2008, 2008).

### **2.1.5 Morfología del Virus de Influenza Aviar y Estructura**

Los virus influenza tipo A son virus pleomórficos de pequeño tamaño (80 a 120 nm de diámetro) que generalmente adoptan morfología esférica. Tienen una envoltura compuesta de una doble capa lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula hospedadora. En la envoltura se encuentran codificadas las glucoproteínas HA y NA proyectadas superficialmente en forma de espículas, y la proteína M2 (Lamb, 1989).

### **2.1.6 Proteína NA y HA**

La neuraminidasa (NA), también llamada sialidasa, es una glicoproteína de tipo II que contiene su extremo N-terminal insertado en la envoltura de la partícula vírica y el extremo C-terminal distal de la superficie de la misma. Está codificada por el segmento 6 del ARN vírico, es el segundo antígeno superficial, en importancia, del virión y los anticuerpos sintetizados contra ella son importantes en la protección del hospedador. Es una sialidasa que hidroliza el ácido siálico terminal de glicoproteínas y glicolípidos; y de este modo, contribuye a la liberación de las partículas víricas de los receptores de las células infectadas permitiendo que la progenie vírica escape de la célula en la que se forma y facilitando su diseminación (Aguirre, 2010).

La hemoaglutinina (HA) es una glicoproteína de tipo I con el extremo C-terminal insertado en la envoltura de los viriones y que constituye el principal antígeno de superficie de los virus

influenza. Tiene forma alargada y está constituida por un trímero, en el que cada monómero acaba en una cabeza globular. Está codificada por el segmento 4 del ARN vírico. La HA es responsable de la unión de los viriones a los receptores de la célula hospedadora y de la fusión de la envoltura del virus con una membrana intracelular de las células infectadas. La HA es el principal antígeno de superficie de los virus influenza e induce la formación de anticuerpos neutralizantes, que son muy importantes en la protección del hospedador frente a la infección (Aguirre, 2010).

### 2.1.7 Proteína M2

Actúa como un canal de protones que sirve para acidificar el virus con el fin de que pueda desnudarse de su cápside y liberar el ARN vírico y ARN polimerasas, para que vayan al núcleo celular y sean replicados. En la superficie interna de la envoltura y rodeando la nucleocápside del virión se encuentra la matriz proteica M1, que da forma y estabilidad a la envoltura y parece tener un importante papel en el ensamblaje de la progenie del virus (Wang, Lamb, & Pinto, 1994).

**Tabla 1.** Composición Molecular del virus de Influenza

Segmento Génico	Polipéptido	Función
<b>PB1, PB2 y PA</b>	Componentes de la RNA polimerasa	Transcripción.
<b>HA</b>	Haemaglutinina	Se enlaza a glicoproteínas y glicolípidos de la membrana celular que contienen residuos de ácido siálico y que son usados como receptores para la infección viral.
<b>NP</b>		Se asocia al RNA genómico.
<b>NA</b>	Neuraminidasa	Degrada el ácido siálico de las glicoproteínas y glicolípidos usados como receptores para la infección viral.
<b>M</b>	M 1 y M 2	M 1: nucleocápside M 2: proteína integral de membrana, canal iónico, acidificación del endosoma, liberación de las ribonucleoproteínas durante la infección.
<b>NS</b>		Desconocida

*Elaborado por: López M. I., 2015. UNAM. Departamento de Microbiología y Parasitología-Recursos en Virología.*

### **2.1.8 Ciclo de Replicación Viral del Virus de Influenza Aviar**

La infección viral se inicia con el enlace de la HA a un receptor de membrana que contienen residuos terminales de ácido neuramínico. El virus se internaliza en un endosoma y posteriormente las ribonucleoproteínas se liberan en el citoplasma. Subsecuentemente, estas pasan por los poros nucleares al núcleo para la transcripción (síntesis de RNA mensajero viral) y la replicación que son mediadas por la RNA polimerasa viral. La síntesis de las proteínas virales la lleva a cabo la célula. Los componentes proteicos necesarios para la formación de las ribonucleoproteínas y la nucleocápside se exportan al núcleo celular. Las proteínas virales de la envoltura se transportan y modifican en el aparato de Golgi para finalmente ser insertadas en la membrana celular. El ensamblaje final de la partícula viral es un proceso no bien comprendido. La liberación de la partícula viral produce lisis celular (Martínez, 2015).

### **2.1.9 Patogenicidad e Virus De Influenza Aviar**

El gen HA es el principal determinante del cambio en la patogenicidad de los virus IA (F.Bosch, 1979). Un precursor HA0 es cortado enzimáticamente dividiéndose en HA1 y HA2, el corte produce cambios en la región del ligando que exponen los aminoácidos de unión al receptor, permitiendo que el virus se adhiera fácilmente a la célula (Easterday B, 1997). Los virus IA de baja patogenicidad se caracterizan por contener al menos dos aminoácidos básicos del tipo lisina y arginina en la región terminal de la HA1, que son cortadas por la enzima tripsina, la cual se encuentra sólo en células del tracto respiratorio y digestivo de las aves (Swayne D, 2008). Mientras que los virus IA alta patogenicidad sufren una serie de cambios puntuales en su conformación estructural que pueden generar sustituciones e inserciones de múltiples aminoácidos básicos en la región terminal de la HA1. Los aminoácidos de la HA de la IAAP son reconocidos por enzimas celulares del tipo furina que están presentes en muchas células de numerosos órganos viscerales, favoreciendo la replicación sistémica del virus (Suarez, 2006).

### **2.1.10 Transmisión del Virus de Influenza Aviar**

Los virus de influenza aviar se excretan a través de las heces y las secreciones respiratorias de las aves, aunque la cantidad relativa de virus puede variar en función del virus específico, la especie hospedadora y otros factores. Una vez que un virus de influenza aviar se introduce en una bandada de aves de corral, este puede propagarse por la granja por la ruta fecal-oral y los aerosoles debido a la estrecha cercanía física entre las aves. Los fomites pueden ser importantes para la transmisión, y las moscas podrían ser un vector mecánico se han hallado virus de influenza aviar en la yema y la clara de los huevos de pollo, pavo y codorniz infectados con virus de IA (CFSPH, The Center for Food Security & Public Health, 2016).

### **2.1.11 Periodo de Incubación**

En las aves de corral puede ser de unas cuantas horas a unos días en aves individuales, se considera que el período de incubación en las aves domésticas dura entre 1 y 7 días. No obstante, en el contexto del control de la enfermedad se utiliza un período incubación de 21 días. El periodo de incubación de los virus de influenza aviar en mamíferos también se considera corto, y podría ser tan mínimo como de uno a dos días en algunos casos (CFSPH, The Center for Food Security & Public Health, 2016).

### **2.1.12 Signos Clínicos**

La sintomatología clínica de aves infectadas con IA puede variar ampliamente dependiendo de factores como: la especie hospedadora, la cepa viral, la edad del hospedador, el estado del sistema inmune del hospedador, la presencia de infecciones concomitantes, y las condiciones ambientales. Cuando se presenta la Influenza Aviar de alta patogenicidad, el primer signo es el comienzo abrupto de alta mortalidad que puede alcanzar hasta 100 % en pocos días. En aves que tardan más tiempo en morir los signos que se pueden presentar son estertores, lagrimeo excesivo, sinusitis, edema de la cabeza y cara, diarrea y hemorragia subcutánea con cianosis de la piel (en particular en cresta, barbillas y patas) (Calnek, 1995; Blaha, 1995; Altman, *et al.*, 1997).

La influenza aviar en su forma de baja patogenicidad suele ser asintomática o producir signos clínicos ligeros en las aves infectadas. Entre los signos más frecuentes destacan: plumaje erizado, ligera depresión, reducción de la producción de huevos, y problemas respiratorios leves (Alexander & Spackman, 1981; Sturm-Ramirez *et al.*, 2006).

### **2.1.13 Lesiones Macroscópicas**

En aves que mueren rápidamente a causa de la enfermedad, solo se observan pocas lesiones generalizadas: Deshidratación y congestión de órganos internos y músculos.

En aves que mueren más lentamente: Se observan hemorragias petequiales o difusas en toda la canal y órganos internos, particularmente en la laringe y tráquea así como en las superficies interna y externa del corazón. Edema subcutáneo extensivo, particularmente alrededor de la cabeza (conocido como cabeza hinchada) y en tarsos (AGROCALIDAD, 2013).

### **2.1.14 Diagnóstico**

Los virus de la influenza aviar pueden identificarse a través de las pruebas de reacción de cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), la detección del antígeno o el aislamiento viral en muestras de exudados de las vías respiratorias y faríngeas. La prueba de RT-PCR es normalmente la primera que se realiza para detectar la infección por virus de linaje asiático H5N1. El aislamiento viral se realiza en los laboratorios de referencia H5 de la Organización Mundial de la Salud (OMS). En los EE.UU, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de EE.UU. (CDC) confirman las muestras que resultan positivas según las RT-PCR o las pruebas de antígeno (CDC, Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, 2015).

Las pruebas RT-PCR y de antígeno de los virus de la influenza aviar deben realizarse en laboratorios con condiciones de bioseguridad de nivel (BSL) 2. Se necesitan laboratorios con condiciones de bioseguridad de nivel 3+ mejoradas para realizar el aislamiento de los virus H5N1 de IAAP. La serología se ha utilizado para vigilancia. El ensayo de microneutralización es la prueba más confiable para detectar anticuerpos contra los virus de la influenza aviar (CDC, Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, 2015).



### **2.1.15 Secuenciación del Virus de IA**

Se ha utilizado la técnica denominada "el método de Sanger" para monitorear la evolución de la influenza como parte de la vigilancia virológica. La secuenciación de Sanger identifica la secuencia genética que predomina entre todos los virus de la influenza detectados en una muestra aislada. Esto quiere decir que las pequeñas variaciones en la población de virus presentes en una muestra no se ven reflejadas en el resultado final. A menudo, los científicos usan el método de Sanger para realizar la secuenciación parcial del genoma de los virus de la influenza pero existen tecnologías modernas que funcionan mejor para la secuenciación completa del genoma (CDC, Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, 2015).

En los últimos años Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) ha utilizado las metodologías "secuenciación de próxima generación (NGS), las cuales han ampliado significativamente la cantidad de información y detalles que pueden obtenerse del análisis de secuenciación. A diferencia de la secuenciación de Sanger, la NGS utiliza la detección molecular avanzada (AMD) para identificar las secuencias de genes de cada uno de los virus que componen una muestra. Por lo tanto, la NGS revela las variaciones genéticas que hay entre muchas partículas de virus de la influenza diferentes en una sola muestra; y estos métodos también ponen al descubierto toda la región de codificación de los genomas. Este nivel de detalle puede beneficiar directamente la toma de decisiones de la salud pública (CDC, Centro para el Control y Prevención de Enfermedades 2015).

### **2.1.16 Diagnóstico de Laboratorio**

Es difícil diferenciar a la IA de otras enfermedades sin contar con resultados de pruebas de laboratorio, pero el Médico Veterinario Oficial de campo no debe esperar los resultados de estas pruebas, para implementar algunas medidas de control, más que todo orientadas a fortalecer la bioseguridad en la granja avícola o predio en el cual existe una sospecha de la enfermedad. Normalmente se deben tomar muestras de aves enfermas pero también de animales sanos. (AGROCALIDAD, 2015).

Las pruebas serológicas se han empleado enzimoimmunoanálisis para detectar anticuerpos frente a antígenos específicos del virus de la influenza tipo A en formatos de prueba dependientes (indirecto) o bien independientes (de competición). Los kits de ELISA tienen un costo moderado y están preparados para aportar un alto rendimiento en la detección de infecciones por virus influenza A, pero todos los resultados positivos deben ir seguidos de una prueba HI de subtipificación, en la que se determinará si el subtipo es H5 o H7. Se empieza a disponer de algunos kits de ELISA específicos de subtipo, por ejemplo para la detección de anticuerpos contra H5, H7 y N1. (AGROCALIDAD, 2015).

También se han utilizado pruebas de inhibición de la hemaglutinación en la serología diagnóstica de rutina, pero es posible que en esta técnica pasen desapercibidas algunas infecciones, debido a que la hemaglutinina es específica de subtipo. Como todos los virus de la influenza tipo A poseen antígenos de las nucleoproteínas y de la matriz antigénicamente similar, son las dianas de elección de los métodos serológicos destinados a detectar virus del grupo de la influenza A. Para detectar anticuerpos frente a estos antígenos, se emplean pruebas de inmunodifusión en gel de agar (se utiliza para discriminar sueros positivos en ELISA previo a HI). En estas pruebas se utilizan preparaciones de virus concentradas que contengan uno o ambos tipos de antígeno. No todas las especies de aves desarrollan anticuerpos precipitantes demostrables (AGROCALIDAD, 2015)

### **2.1.17 Diagnóstico de Diferencial**

La Influenza Aviar Altamente Patógena es difícil de distinguir de otras enfermedades que causan elevada y repentina mortalidad en las parvadas como: enfermedad de Newcastle de tipo velogénico o virulenta; enteritis viral del pato (plaga del pato); envenenamientos agudos; otras enfermedades que causan hinchazón de las crestas y barbillas como: cólera aviar y otras enfermedades septicémicas; infección bacteriana de la cresta y barbillas. Se debe sospechar de gripe aviar ante cualquier brote de enfermedad respiratoria de aves que se asocie a una elevada mortalidad y persistencia, a pesar de la aplicación de medidas preventivas y terapéuticas empleadas para otras enfermedades (AGROCALIDAD, 2013).

### **2.1.18 Prevención y Control**

Las aves de corral pueden infectarse mediante el contacto con aves o fómites recién introducidos y también mediante el contacto con aves silvestres, particularmente aves acuáticas. Se puede disminuir el riesgo de infección mediante un manejo de la parvada tipo todo adentro / todo afuera. Las aves de corral provenientes de mercados de aves vivas o del matadero no deben devolverse al criadero. Además, es necesario mantener estrictas medidas de higiene y bioseguridad para evitar la transmisión del virus (CDC, Centro para el Control y Prevención de Enfermedades 2015).

Los brotes pueden controlarse mediante la rápida despoblación de las parvadas infectadas y expuestas, la eliminación adecuada de materiales contaminados y aves muertas y estrictas medidas de bioseguridad. Las granjas deben permanecer en cuarentena, y se deben establecer controles de movimiento y vigilancia. Se deben eliminar los insectos y los ratones de las instalaciones, luego se deben despoblar las parvadas y destruir las aves muertas, para lo cual se pueden enterrar o utilizar en tratamientos de compostaje o incinerar. No debe alimentarse a los mamíferos con aves de corral u otras aves que puedan estar infectadas con los virus H5N1 de linaje asiático o con otros virus de IAAP. También debe evitarse que estos entren en contacto con parvadas y aves silvestres posiblemente infectadas. Durante los brotes, los gatos y perros deben permanecer, en lo posible, en espacios cerrados (CDC, Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, 2015).

### **2.1.19 Vacunación**

Se pueden considerar la vacunación como una medida de control preventiva o auxiliar durante un brote. Las vacunas aviares son generalmente autógenas o de los virus con el mismo subtipo o tipo de hemaglutinina (CFSPH, The Center for Food Security & Public Health, 2016).

Las vacunas contra la superficie protéica de hemaglutinina proveen la mejor protección contra el desafío de la influenza aviar, pero la protección es limitada por ser específica de un subtipo. Las vacunas de neuraminidasa también proveen protección contra el desafío de influenza aviar para subtipos homólogos de neuraminidasas, pero la vacuna basada en el tipo A específico de la

nucleoproteína no provee protección. Existen tres tipos de tecnologías disponibles en la actualidad (Swayne, 1998).

#### **2.1.20 Vacunas de Virus Completamente Inactivado**

Recombinantes como el virus de viruela aviar con un gene insertado de hemaglutinina de influenza. Subunidades de proteínas como la hemaglutinina del virus de influenza aviar producidas en un sistema de cultivo celular con el virus de insectos llamados baculovirus, producido por ingeniería genética (Swayne, 1998).

#### **2.1.21 Almacenamiento y Transporte de Muestras**

Para mantener la viabilidad óptima, transportar la muestra al laboratorio lo antes posible. La mejor recuperación se obtiene cuando los especímenes se refrigeran a 2-8 °C o se mantienen en hielo húmedo después de la recogida y mientras están en tránsito. Si se produce un largo retraso antes del procesamiento, los especímenes deben congelarse a -70 °C o más fríos y transportarse sobre hielo seco (COPAN, 2004).

#### **2.1.22 Copan Medio de Transporte Universal (Utm-Rt)**

El sistema Copan Medio de transporte universal (UTM-RT) está destinado a la recogida y transporte de especímenes clínicos que contengan virus, clamidia, micoplasma o ureaplasma desde el sitio de recogida hasta el laboratorio de ensayo. Proporciona un transporte viral medio y un transporte para los organismos mencionados en un sistema. UTM-RT puede ser procesado usando la clínica estándar procedimientos operativos de laboratorio para cultivo viral, clamidial, micoplasma y ureaplasma (COPAN, 2004).

#### **2.1.23 Formulación del Medio UTM-RT**

El medio 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. Vancomicina, Anfotericina B y 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 en la preservación de virus si los especímenes se congelan (-70°C) para un almacenamiento prolongado (COPAN, 2004).

#### **2.1.24 Huevos Embrionados Libre de Patógenos Específicos (SPF)**

La producción mundial de huevos SPF se inició 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 o Specific Patogen Free, 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 (Sánchez, 2006).

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. Otro uso que se le da a este material SPF es el control de la calidad de las vacunas para aves (Sánchez, 2006).

## **2.2 TRABAJOS RELACIONADOS**

Lugo, (2017) en su trabajo de investigación sobre: DETECCIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN *Gallus gallus domesticus* DE GRANJAS INDUSTRIALES DEL ECUADOR MEDIANTE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO. Las pruebas serológicas permiten la detección de anticuerpos ante IA y constituyen una herramienta diagnóstica indirecta y efectiva. El trabajo de investigación realizado tuvo por objetivo detectar el virus de Influenza aviar en aves de corral de granjas industriales del Ecuador Continental mediante diagnóstico serológico, Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) e Inhibición de la Hemoaglutinación (HI). El tipo de muestreo que se realizó fue aleatorio simple. El tamaño de muestra fue determinado a través de la fórmula para estimar detección de la presencia de la enfermedad, muestreándose al azar 152 granjas industriales, sin considerar número de granjas por provincias o categoría de producción.

Para la prueba de ELISA competitivo se empleó el kit comercial de IDvet. En total fueron analizados 3.800 sueros. A partir de la prueba de ELISA se obtuvieron 3.95% de granjas positivas (6 granjas positivas), 1.97% de granjas sospechosas (3 granjas sospechosas) y 94.08% de granjas negativas (143 granjas negativas). Los sueros sospechosos y positivos obtenidos por ELISA fueron serotipificados para los subtipos H5N2 y H7N3 mediante la técnica HI. Los resultados obtenidos de la seropificación para H5N2 y H7N3 fueron negativos para las 9 granjas analizadas. Por consiguiente, no se detectó la presencia del virus de IA en aves de corral (*Gallus gallus domesticus*) de granjas industriales del Ecuador Continental.

OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal, (2012) notifica, A efectos del Código Terrestre, la influenza aviar de declaración obligatoria es una infección de las aves de corral causada por cualquiera de los virus de influenza aviar de tipo A perteneciente a los subtipos H5 o H7 o por cualquiera de los virus de influenza aviar con un índice de patogenicidad intravenosa (IPIV) superior a 1,2 (o que cause mortalidad en al menos el 75% de los casos).

Caicedo, (2009). En el año 2005 se detectó el virus H9N2 de influenza aviar en tres granjas, ubicadas en el municipio de Fresno en el departamento del Tolima, Colombia. Este hallazgo se caracterizó por la ausencia de manifestaciones clínicas compatibles con la enfermedad, son aumento en la mortalidad ni cambios en los parámetros productivos de las aves de dichas granjas. Se realizaron todas las actividades de control como cuarentena, control de movilización, desinfección, despoblación controlada, centinelización, repoblamiento y vigilancia en aves de traspatio, entre otras actividades. Después de controlado este evento, las granjas en las cuales se había detectado esta enfermedad mediante pruebas serológicas han continuado siendo parte de la vigilancia epidemiológica activa que se desarrolla anualmente, sin que se haya encontrado nuevamente. El programa de vigilancia epidemiológica activa desarrollo entre los años 2006 y 2009 ha permitido muestrear 2.362 granjas y procesar 82.829 sueros utilizando un inmunoensayo (ELISA). De este total solo el 4,45% resultaron positivas, estas 4.45% de las muestras fueron sometidas a la prueba de inmunodifusión en gel agar (AGID), que es la prueba serológica confirmatoria; todos los resultados de esta prueba fueron negativos.

## **3. METODOLOGÍA**

### **3.1 MATERIALES**

#### **3.1.1 De Campo**

- 276 Muestras de suero sanguíneo de gallinas criollas
- Guantes
- Jeringas
- Torundas de alcohol
- Tubos vacutainer sin anticoagulante
- Cooler para las muestras
- Bolsas de hielo
- Registro para las muestras

#### **3.1.2 De Laboratorio**

- Centrifuga
- Tubos vacutainer sin anticoagulante
- Micro pipetas
- Puntas para micro pipetas
- Micro tubos
- Kit ELISA de prueba de detección de anticuerpos contra el virus de la influenza aviar
- Espectrofotómetro

#### **3.1.3 De Oficina**

- Registro de las muestras
- Computadora
- Impresora

### **3.2 MÉTODOS**

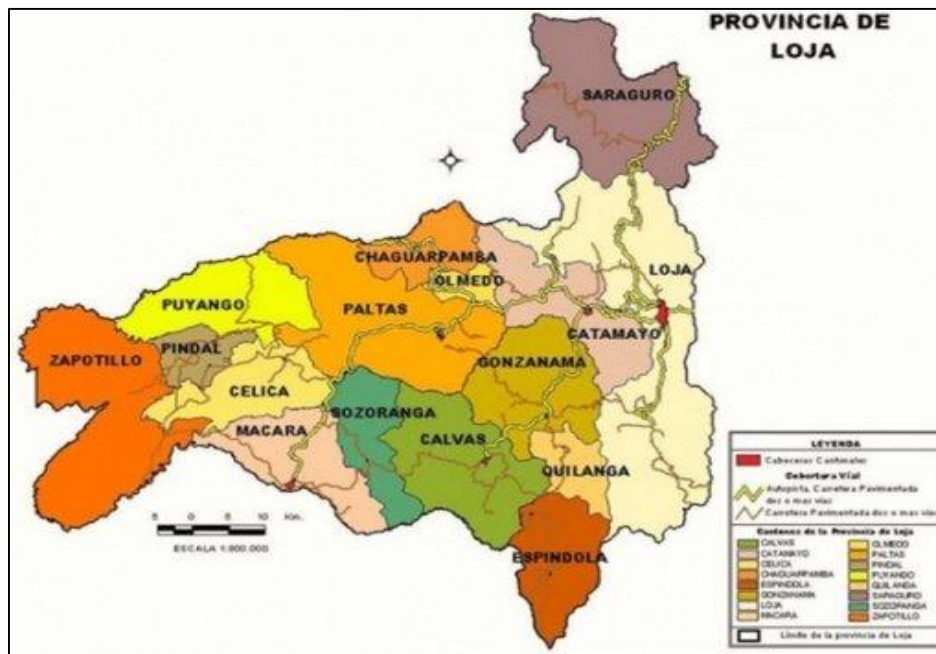
#### **3.2.1 Delimitación del Área de Estudio**

La presente investigación se realizó en la Provincia de Loja, ubicada entre las latitudes Sur: 03°19'49" y 04°45'00", constituye la provincia más austral del Ecuador. Tiene una superficie

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

La provincia de Loja limita con las provincias de El Oro al oeste; con la provincia de Zamora Chinchipe al este; con la provincia del Azuay al norte; y al sur con la República del Perú (Stacey, 1999).

Los cantones que se consideraron en el presente estudio son: Loja, Catamayo, Chaguarpamba y Zapotillo.



**Figura 1.** Cantones de la Provincia de Loja.

### 3.2.2 Descripción del Estudio

Este es un estudio de tipo prospectivo y de corte transversal, en el cual se considerarán: una fase de campo, en el cual se recogerán muestras de sangre de aves de traspatio en los cantones de la provincia de Loja: Chaguarpamba, Zapotillo, Catamayo y Loja; y, una de laboratorio, en la cual se procesarán dichas muestras y se procedió al diagnóstico de la Enfermedad de Influenza Aviar mediante serología.

Se trabajó con un total de doscientas setenta y seis muestras de suero sanguíneo que fueron tomadas en la Provincia de Loja, de preferencia en las zonas donde existe avicultura comercial, de traspatio y cerca de humedales que presenten síntomas de la enfermedad de Influenza Aviar.



### **3.2.3 Tipo de Muestreo y Tamaño de la Muestra**

La presente investigación se consideró un tipo de muestreo probabilístico. Se trabajó con un total de 276 muestras de suero sanguíneo de aves de traspatio, en los cantones de la Provincia de Loja: Chaguarpamba, Zapotillo, Catamayo y Loja. La prevalencia de virus de Influenza A en aves silvestres es de 4% (Senne, 2010). Por tanto, se fijó una prevalencia límite de 1% para calcular el tamaño muestral. De acuerdo a la fórmula de prevalencia límite, si la prevalencia es igual o mayor que la prevalencia límite, la probabilidad que al menos haya un resultado positivo es igual a la confianza- $\alpha$  (Gonzalez, 1986).

### **3.2.4 Variables**

Las variables que se tomarón en cuenta en el presente estudio fueron una dependiente: Resultado positivo/negativo al ELISA indirecto para el diagnóstico de Influenza Aviar en aves de traspatio. Mientras las consideradas como variables independientes: Factores de riesgo que influyen en la presentación de la enfermedad, cercanía a explotaciones de aves comerciales, presencia de otras especies de aves, procedencia; Cantón.

## **3.3 RECOPIACIÓN DE LA INFORMACIÓN**

### **3.3.1 Toma y Registro de Datos**

Para la ejecución de la presente investigación se realizó un trabajo de campo apoyado de un mapa georreferenciado de todos los cantones donde existe avicultura comercial que de acuerdo a datos de AGROCALIDAD son cerca de 80 y se tomarón muestras de sangre de aves de traspatio cercanas a estas granjas y un trabajo de laboratorio donde se ejecutó los análisis de las muestras.

### **3.3.2 Trabajo de Campo**

#### **3.3.2.1 Procedimiento para los puntos de muestreo**

Para realizar el estudio en la provincia de Loja se dividió en zonas, para de esta manera obtener el número de muestras a recolectar por sitio.

Los cantones con mayor población avícola comercial son: Chaguarpamba, Catamayo, Loja, y los fronterizos donde puede existir la presencia de los virus y sus humedales pueden alojar aves migratorias y residentes como Macara, Zapotillo entre los más relevantes.

### **3.3.2.2 Técnica de recolección de las muestras de sangre**

Se realizaron visitas a las viviendas donde se encontraban las aves de traspatio, con el fin de muestrear la mayor cantidad de viviendas. Una vez que se nos permitió el ingreso al predio, se procedió a capturar de aves adultas al azar o aves con síntomas de enfermedad e inmediatamente se tomó la muestra sanguínea.

Para la recolección, transporte, mantenimiento y almacenamiento de las muestras se adquirió un medio de transporte (cooler), el cual contaba con una adecuada formulación para impedir que se dañen las muestras y mantener el virus.

La toma de muestras se la tomó directamente de la vena de las aves con una jeringa para evitar que se contaminen con elementos extraños que puedan impedir su interpretación.

### **3.3.3 Análisis de Laboratorio**

#### **3.3.3.1 Preparación de las muestras de campo**

Para evaluar la presencia de anticuerpos contra el virus de la IA, se realizó el análisis de 276 sueros sanguíneos que se obtuvieron de aves domésticas de traspatio, criadas en zonas cercanas a los humedales y que hayan estado en relación con aves silvestres y comerciales de la provincia de Loja. Las muestras fueron analizadas por la prueba de ELISA indirecta usando un kit de prueba para la detección de anticuerpos contra el virus de influenza aviar (LP H7N1, H9N2, LP H5N2, O H6N2) BIOCHEK.

## **3.4 PROCEDIMIENTO DE LA INFORMACIÓN**

### **3.4.1 Análisis Estadístico**

Por medio de estadística descriptiva se estimó la proporción de aves de traspatio positivas y negativas a la presencia de Influenza Aviar. Para dicho análisis se usó Test. Exacto de Fisher considerándose valores de  $p$  inferiores a 1 como estadísticamente no significativos. Para cumplir con lo anteriormente indicado se emplearon hojas de cálculo de Excel 2010 y el programa estadístico “R” versión 3.5.1 ´ de libre acceso.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 PREVALENCIA DE INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO DE LA PROVINCIA DE LOJA

**Tabla 2.** Títulos positivos de la Seroprevalencia de la enfermedad de Influenza Aviar

<b>Cantón</b>	<b>Parroquia</b>	<b>Sector</b>	<b>Especie</b>	<b>Títulos</b>
Chaguarpamba	Chaguarpamba	Guaduas Chiquito	Gallina	1265,03
Loja	Punzara	Los Ciprés	Gallo	2519,58
Catamayo	San José	Cetnail	Gallo	4006,28
Zapotillo	Paletillas	Paletillas	Gallina	1624,53

Mediante el kit de prueba de anticuerpos contra la Influenza Aviar (LP H7N1, H9N2, LP H5N2, O H6N2) BioChek, los títulos que son de 667 o menos no se detectan anticuerpos contra IA y de intervalo de 668 o más son positivos, que dio como resultado de las 276 muestras de suero sanguíneo 4 de ellas fueron positivas con títulos mayores a 668 como lo indica en kit (BioChek) que utilizamos para este estudio.

**Tabla 3.** Seroprevalencia de Influenza Aviar en Aves de Traspatio de Diferentes Especies de la Provincia de Loja

<b>Aves</b>	<b>Casos Positivos</b>		<b>Casos Negativos</b>	
	<b>Número</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje</b>
Gallo	2	0.72	110	39.86
Gallina	2	0.72	140	50.73
Ganso	0	0	22	7.97
<b>Total general</b>	<b>4</b>	<b>1.44</b>	<b>272</b>	<b>98.56</b>

De las 276 muestras de suero sanguíneo de aves de traspatio procesadas, se identificaron 4 positivas a Influenza Aviar mediante la técnica de ELISA indirecto, lo que corresponde a una prevalencia de 1,44% ; en especie tanto de gallo como gallina tuvieron una prevalencia de 0,72% y de ganso 0% (Tabla 3).

#### 4.2 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO DE LA PROVINCIA DE LOJA.

En todas las explotaciones, de acuerdo a la información proporcionada, las aves de traspatio si mantienen contacto con otras especies de aves no domésticas.

De acuerdo a lo que se muestra en la tabla cuatro, el riesgo de seroprevalencia de la enfermedad de IA en el cantón Chaguarpamba es de 0,36%, así mismo en los cantones Loja, Catamayo y Zapotillo la seroprevalencia es igual 0.36%, con respecto a la del cantón Chaguarpamba, como se indica (Tabla 4).

**Tabla 4.** Prevalencia de Influenza Aviar en Aves de Traspatio en la Provincia de Loja, y Factores asociados.

Variable	Positivo		Negativo		Test. Fisher
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	p Valor
<b>Cantón</b>					0.2369
Chaguarpamba	1	0.36	163	59.06	
Loja	1	0.36	49	17.75	
Catamayo	1	0.36	31	11.23	
Zapotillo	1	0.36	29	10.51	
<b>Producción de aves comerciales</b>					1
Si	1	0.36	65	23.55	
No	3	1.09	207	75	
<b>Especie</b>					1
Gallo	2	0.72	110	39.86	
Gallina	2	0.72	140	50.72	
Ganso	0		22	7.97	
<b>Vacunados</b>					1
Si	0		0	50	
No	4	1.45	272	48.55	
<b>Total general</b>	4	1.45	272	98.55	

Asimismo, de acuerdo al análisis estadístico, el Test. Fisher considerándose valores de p inferiores a 1 como estadísticamente no significativos, el p valor de los cantones es de (p valor=0.2369), en cuanto a la producción de aves comerciales y especie de aves el (p valor=1). En lo que se refiere a las aves vacunadas el (p valor=1). Por cuanto se puede decir que no existen factores asociados. (Tabla 4).

## 5. DISCUSIÒN

### 5.1 SEROPREVALENCIA

Las explotaciones que fueron parte del estudio cumplieron con la característica de estar cerca de humedales o sistemas hídricos y de explotaciones comerciales; y las aves muestreadas no estuvieron vacunadas contra la enfermedad de Influenza Aviar ya que en el país la vacunación no está regulada ni aprobada por AGROCALIDAD.

Se analizaron 276 muestras de plasma sanguíneo mediante el diagnóstico de ELISA indirecta con el kit de prueba de anticuerpos contra la Influenza Aviar (LP H7N1, H9N2, LP H5N2, O H6N2) BioChek, habiéndose encontrado 4 muestras positivas y 272 negativas, con una prevalencia en aves de traspatio de 1.44% en los cantones Loja (0,36%), Chaguarpamba (0,36%), Catamayo (0,36%), Zapotillo (0,36%) de la Provincia de Loja. Una prevalencia cercana reportó (Lugo, 2017), en su trabajo de investigación, a partir de la prueba de ELISA reportó 3.95% positivas y 1.97% de granjas sospechosas. Los sueros sospechosos y positivos obtenidos por ELISA fueron serotipificados para los subtipos H5N2 y H7N3 mediante la técnica HI. Los resultados obtenidos de la seropificación para H5N2 y H7N3 fueron negativos para las muestras analizadas, situación que no ocurrió en esta investigación que no se pudo confirmar con pruebas de HI para los subtipos H5N2 y H7N3.

Una prevalencia similar, fue registrada en Colombia; (Caicedo, 2009) donde se desarrolló un programa de vigilancia epidemiológica activa entre los años 2006 y 2009 en 2.362 granjas y procesar 82.829 sueros utilizando un inmunoensayo (ELISA). De este total solo el 4,45% resultaron positivas, estas 4.45% de las muestras fueron sometidas a la prueba de inmunodifusión en gel agar (AGID), que es la prueba serológica confirmatoria; todos los resultados de esta prueba fueron negativos al igual que los que reportó (Lugo, 2017) con la misma prueba confirmatoria.

OIE, (2012) determinó que la influenza aviar de declaración obligatoria es una infección de las aves de corral causada por cualquiera de los virus de influenza aviar de tipo A perteneciente a los subtipos H5 o H7 o por cualquiera de los virus de influenza aviar con un índice de patogenicidad

intravenosa (IPIV) superior a 1,2 (o que cause mortalidad en al menos el 75% de los casos). Situación que no ocurrió en este trabajo con las pruebas positivas.

Dentro de la prevalencia serológica de las especies de gallo es de 0,72%, igual que el de las gallinas 0.72%; en los Gansos es del 0%. Un estudio realizado (Rondon, 2011) en aves silvestres de los Humedales de Puerto Viejo, Provincia de Cañete, Departamento de Lima, Perú. Utilizando 12 patos domésticos negativos por serología y aislamiento viral como centinelas, los cuales fueron introducidos a las zonas que circundan los humedales por un periodo de 70 días; los resultados obtenidos fueron negativos igual que los resultados de serología aplicados a gansos en este estudio.

## **5.2 FACTORES DE RIESGO**

De acuerdo al análisis estadístico aplicado, en las variables que formaron parte de esta investigación no se encontró ningún factor asociado a la enfermedad de Influenza Aviar los resultados del Test. Exacto de Fisher considerándose valores de p inferiores a 1 como estadísticamente no significativos. En la variable Cantón el resultado es (p valor=0.2369), en cuanto a la producción de aves comerciales (p valor=1), especie de aves el (p valor=1); aves vacunadas el (p valor=1). Debido a los valores no existen factores de riesgo.

Según AGROCALIDAD (2015), indica que en Ecuador existen humedales y lagos que en ocasiones albergan anátidas y otras aves acuáticas migratorias, son alrededor de 4 especies de aves que migran desde Norteamérica: Cerceta aliazul, Andarríos coleador, Patiamarillo Menor y el Cormorán neotropical de carácter migratorio intratropical. Pero que no existe prevalencia de la enfermedad ni factores de riesgo asociados. Además AGROCALIDAD, (2011).notifica que “Se ha logrado el reconocimiento del Ecuador como país libre de Influenza Aviar ante la OIE” el resultado se lo define en forma abreviada como Reconocimiento Internacional. A fin de cada año se emitirá un reporte a la OIE a fin de que se otorgue el reconocimiento de país libre de la enfermedad.

(Varga, 2018). En un estudio realizado en Ecuador de Análisis espacial del riesgo de enfermedades respiratorias de notificación obligatoria en aves de traspatio. Los resultados

demuestran que la enfermedad de Influenza aviar, al ser considerada una enfermedad exótica se confirmó la ausencia de la enfermedad en el país.

Rondon, (2011). Así mismo se confirma la ausencia de Influenza aviar donde se aplicó un método de vigilancia dirigida para la detección temprana del Virus de Influenza Aviar (VIA) en aves silvestres de los Humedales de Puerto Viejo, Provincia de Cañete, Departamento de Lima, Perú. Como centinelas se usaron 12 patos domésticos negativos por serología y aislamiento viral, los cuales fueron introducidos a las zonas que circundan los humedales por un periodo de 70 días durante el invierno del 2006, Se evaluó el estado sanitario de las aves centinelas mediante exámenes clínicos periódicos, muestreos de hisopados cloacales y sangre. A lo largo del estudio no se detectaron anticuerpos ni se aisló VIA. Los resultados negativos obtenidos en las evaluaciones, sugieren la ausencia del VIA y su transmisión horizontal por las poblaciones de aves silvestres de los humedales de Puerto Viejo.



## 6. CONCLUSIONES

De los análisis y discusión de los resultados obtenidos en esta investigación se concluye lo siguiente:

- La prevalencia serológica de anticuerpos para el virus de Influenza Aviar en la Provincia de Loja fue del 1,44% en aves de traspatio, porcentaje no validado mediante pruebas como HI de mayor exactitud que confirmen el pasaje viral.
- La prevalencia serológica de anticuerpos en las especies de los gallos es de 0,72% similar al de las gallinas de 0,72%, en cuanto a los gansos es de 0%.
- En el estudio realizado estadísticamente no representa riesgo del virus de Influenza Aviar en Aves de traspatio de la Provincia de Loja, en los datos encontrados.
- No existen factores de riesgo de la enfermedad de Influenza Aviar en las variables que formaron parte de este estudio en aves de traspatio cerca de humedales y granjas avícolas comerciales en la provincia de Loja.

## **7. RECOMENDACIONES**

- Ejecutar más trabajos serológicos en el Ecuador para determinar si existe o no la prevalencia de la Enfermedad de Influenza Aviar tanto en aves comerciales, de traspatio y silvestres.
- Establecer el manejo de bioseguridad más estructurado en las aves de traspatio como en las aves comerciales ya que estas tienen contacto directo con las aves silvestres para evitar que haya brotes de prevalencia serológica de la enfermedad de Influenza aviar.
- Analizar con más profundidad los factores de riesgo cerca de humedales y lagos con trabajos de investigación de seroprevalencia de aves acuáticas que migran al Ecuador y aves que estén en contacto con estas aves.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- AGROCALIDAD. (2011). Programa Nacional de Prevencion de Influenza Aviar . *Programa Nacional Sanitario Avicola*, 26-48.
- AGROCALIDAD. (2013). Guía para la prevención y control de Influenza Aviar y la enfermedad de Newcastle en avicultura de pequeña escala. *Programa Nacional Sanitario Avícola*, 5-10.
- AGROCALIDAD. (2015). plan de contingencia para la Influenza Aviar. *Coordinacion General de Sanidad Animal*, 17-19.
- AGROCALIDAD. (2016). Sistema de Vigilancia Epidemiologica. *AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO*, 8-12.
- Aguirre, M. (2010). Aislamiento del Virus de Influenza Aviar en pierna y pechuga y pechuga de pollos desafiados con virus H5N2 vacunados y no vacunados con vacuna recombinante . *Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia* , 10-13.
- Alexander, D., & Spackman, D. (1981). Emerging Infectious Diseases. En C. o.-M. 1979., *Avian Pathology* (págs. 10,281-93). University of Minnesota: National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention .
- Altman, R., Clubb, S., Dorrestein, G., & Quesenberry, K. (1997). Avian Medicine and Surgery. En *Saunders* (pág. 1070). Pensilvania, E.E.U.U.: Serie Veterinaria.
- Blaha, T. (1995). Epidemiologia Especial Veterinaria. Zaragoza, España, Acribia: Serie Ciencias Veterinarias.
- Caicedo, L. (2009). Auto declaracion de Colombia como pais libre de Influenza Aviar de declaracion obligatoria . *Istituto Colombiano Agropecuario (ICA), Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Bogota, Colombia*.
- Calnek, B. (1995). Enfermedades de las aves. En *Manual Moderno* (pág. 1147). Mexico, DF: Serie veterinaria.
- Camacho, M., Perez, E., Arroyo, J., Sanchez, E., & Jimenez, M. (2009). Guajolotes de traspatio como reservorios de enfermedades de aves domésticas y silvestres en tres ecosistemas de

- la costa mexicana. *Tropical and Subtropical Agroecosystems vol. 10 Universidad Autonoma de Yucatan*, 109-115.
- Cardona, C. (2003). Influenza Aviar . *CID LINES* .
- CDC. (06 de febrero de 2015). *Centro para el Control y la Prevencion de Enfermedades*. Obtenido de <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/avianflu/avian-in-birds.htm>
- CFSPH. (2016). Influenza Aviar. *The Center for Food Security & Public Health*.
- COPAN. (14 de December de 2004). *Universal Transport Medium*. Obtenido de Copan UTM-RT System: [http://www.copanusa.com/files/9214/2489/1963/UTM-RT\\_Flocked\\_Polyester\\_Swabs.pdf](http://www.copanusa.com/files/9214/2489/1963/UTM-RT_Flocked_Polyester_Swabs.pdf)
- Easterday B, H. V. (1997). Influenza. En C. B. eds, *Diseases of Poultry, 10a ed* (págs. 583-605). IowaState University Press: Ames, IA.
- ESPAC. (2017). Encuesta de Superficie y Produccion Agropecuaria. *Instituto Nacional de Estadistica y censos*.
- F.Bosch, M. (1979). The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology*, 197-207.
- Fenner, F. (1992). *Virologia Veterinaria*. Zaragoza, España: Acribia (Serie Veterinaria).
- Gonzalez, A. (1986). Presencia de anticuerpos de Influenza A en aves. *Tesis Médico Veterinario*, 36.
- Gylstorff, I., & Grimm, F. (1987). *Vogelkrankheiten*. Stuttgart, Alemania, UTB Grosse Reihe. *Serie Veterinaria*, 609.
- Jaimes, J., Gomez, P., Alvarez, M., Soler, D., Romero, J., & villamil, L. (2010). Las enfermedades infecciosas y su importancia en el sector avícola. *Revista de Medicina Veterinaria* (20), 49-61.
- Lamb, R. A. (1989). Genes and Proteins of the Influenza Viruses. New York: In: Krug R.M. (eds).
- Lugo, K. (2017). DETECCIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN Gallus gallus domesticus DE GRANJAS INDUSTRIALES DEL ECUADOR MEDIANTE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO. (*Trabajo de Grado. Médico Veterinario y Zootecnista*) UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.
- Lupiani, B., & Reddy, S. S. (2009). The history of avian influenza. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 311-323.
- Martínez, I. L. (2015). Influenza, influenza A(H1N1), Influenza A(H7N9). *Unam*.

- Molina, P. (2013). Comparación de dos sistemas de producción y de manejo sanitario de las aves criollas de traspatio en los municipios de Ignacio de la Llave y Teocelo, Veracruz. (*tesis de pregrado*). Universidad Veracruzana. Veracruz, Mexico .
- OIE. (2008). Terrestrial Animal Health Code 2008. Capter 10.4 Avian Influenza.
- OIE. (2012). Código Sanitario para los Animales Terrestres . *Organización Mundial de Sanidad Animal*, 142-161.
- OIE. (2018). *Código Sanitario Para los Animales Terrestres*. Obtenido de Organización Mundial de Sanidad animal: <https://www.oie.int/es/normas/codigo-terrestre>
- OR, MARIANA. (11 de Abril de 2018). *Innovación radical: necesidad urgente del sistema alimentario actual*. Obtenido de Agromás S.C: <http://agromassc.com/>
- Pérez, A., & Polanco, G. (2003). La avicultura de traspatio en zonas campesinas de la provincia de Villa Clara, Cuba. *Levistock Research for Rural Development*, 15-22.
- Perret, C., & Dabanch, J. (2008). Influenza Aviar y Riesgo de Pandemia . *Revista chilena de pediatría* 79(4) , 358-363.
- Rodríguez Buenfil, J. C., Allaway, C. E., Wassink, G. J., Segura Correa, J. C., & Rivera Ortega, T. (1996). Estudio de la avicultura de traspatio en el municipio de Dzununcán, Yucatán. *Vet. Mex;*(27)3, 215-219.
- Rondon, J. (2011). Vigilancia dirigida de influenza aviar en aves silvestres de los humedales de Puerto Viejo usando patos domésticos (*Cairina moschata*) como centinelas. *Tesis para optar el grado de magíster en Salud Animal* , 107-122.
- Rovid, A., Roth, J., Galyon, J., Lolsledt, J., & Lenardon, M. (2010). Enfermedades Emergentes y Exóticas de los Animales. *The Center for Food Security & Public Health*, 170.
- Sánchez, L. (2006). Huevos fértiles SPF: Una Eficaz Herramienta para la Investigación de Enfermedades de las Aves. *Noticias Uach*.
- Segovia, K., Icochea, E., Gonzalez, R., Bruno, G., & Gonzalez, A. (2013). Presencia del Virus de Influenza Aviar en Aves Silvestres de los Humedales de Puerto Viejo, Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24(1), 98-103.
- Senne, D. (2010). Avian Diseases. *American Association of Pathologists*, 179-186.
- Stacey, d. V. (1999). *Maravillas de Loja* . Loja-Ecuador: Editorial Delta.
- Sturm-Ramirez, K., Hulse-Post, D., Humberd, J., Seiler, P., Govorkova, E., Krauss, S., & Long, H. (2006). Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly

- pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. En *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (págs. 103, 8-9). Universidad de Wisconsin - Madison: National Academy of Sciences.
- Suarez, G. (2006). Historia natural de la influenza aviar o gripe del pollo: análisis sanitario actual y prospectivo. En G. S.eds, *La gripe aviaria: un reto de salud pública* (pág. 23). España: Ed. de la Univ. de de Castilla-La Mancha.
- Swayne D, H. D. (2008). Influenza. En Y. E. Saif, *Diseases of Poultry, 12th Ed* (págs. 153-174). Estados Unidos. Iowa: Blackwell Publishing.
- Swayne, D. E. (1998). *Avian Influenza: Current World Situation and Control Measures*. In Sexto Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar (1998 Athens, GA): Seminario de actualización de patología y producción aviar.
- Valladares, J. (2015). DETECCIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN PATOS DOMÉSTICOS DE CRIANZA FAMILIAR EN LAS PROVINCIAS DE HUARAL Y HUAURA. (*Tesis para optar el Título de Médico Veterinario*) UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS .
- Varga, J. (2018). Análisis espacial del riesgo de enfermedades respiratorias de notificación obligatoria en aves. *Trabajo de titulación, modalidad proyecto de investigación para la obtención del título de*, 37.
- Vargas, O. (2016). Avicultura . *Universidad Técnica de Machala* , 61-101.
- Wang, C., Lamb, R. A., & Pinto, L. H. (1994). Direct measurement of the influenza A virus M2 protein ion channel activity in mammalian cells. *Virology*, 205, 133-140.

## 9. ANEXOS

### ANEXO I: FOTOGRAFIAS DE TRABAJO DE CAMPO



**Figura 2.** Aves de traspatio a la intemperie



**Figura 3.** Aves de traspatio en corral



**Figura 4.** Aves de traspatio expuestas al contacto directo con aves silvestres



**Figura 5.** Ubicación de la vena alar para extracción de sangre





**Figura 6.** Extracción de la muestra de sangre

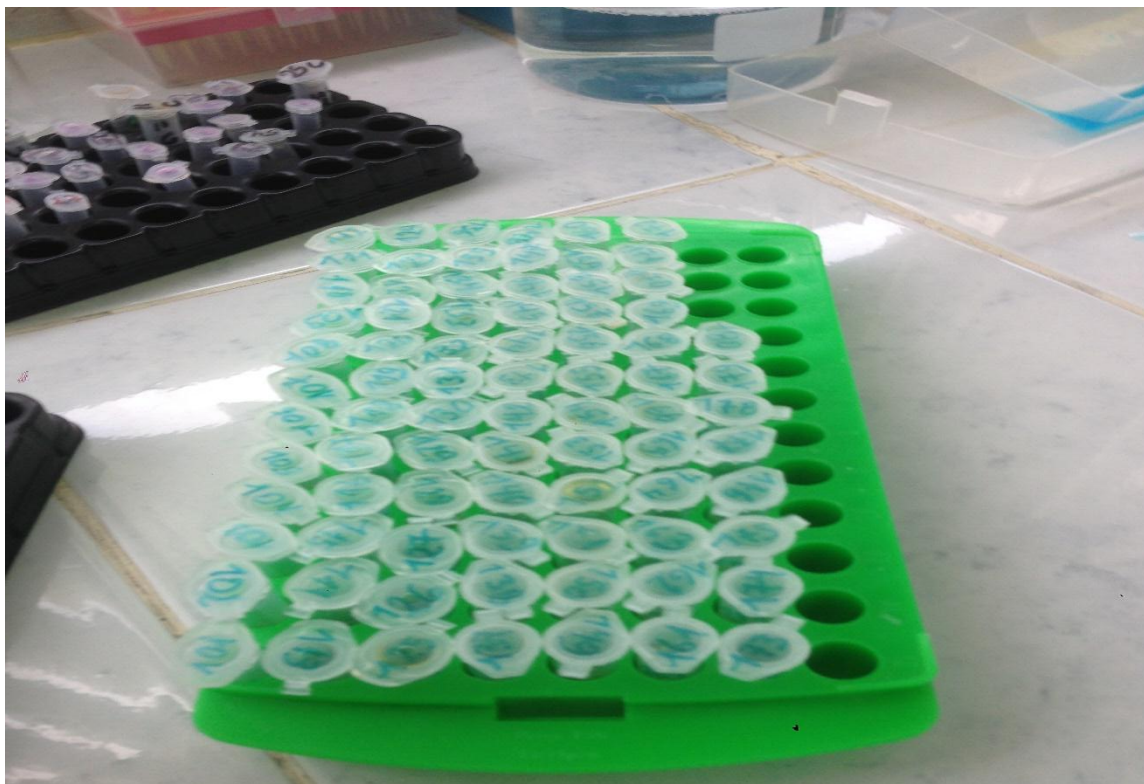
## ANEXO I: FOTOGRAFÍAS DE TRABAJO DE LABORATORIO



**Figura 7.** Centrifugación de las muestras para extracción del plasma sanguíneo



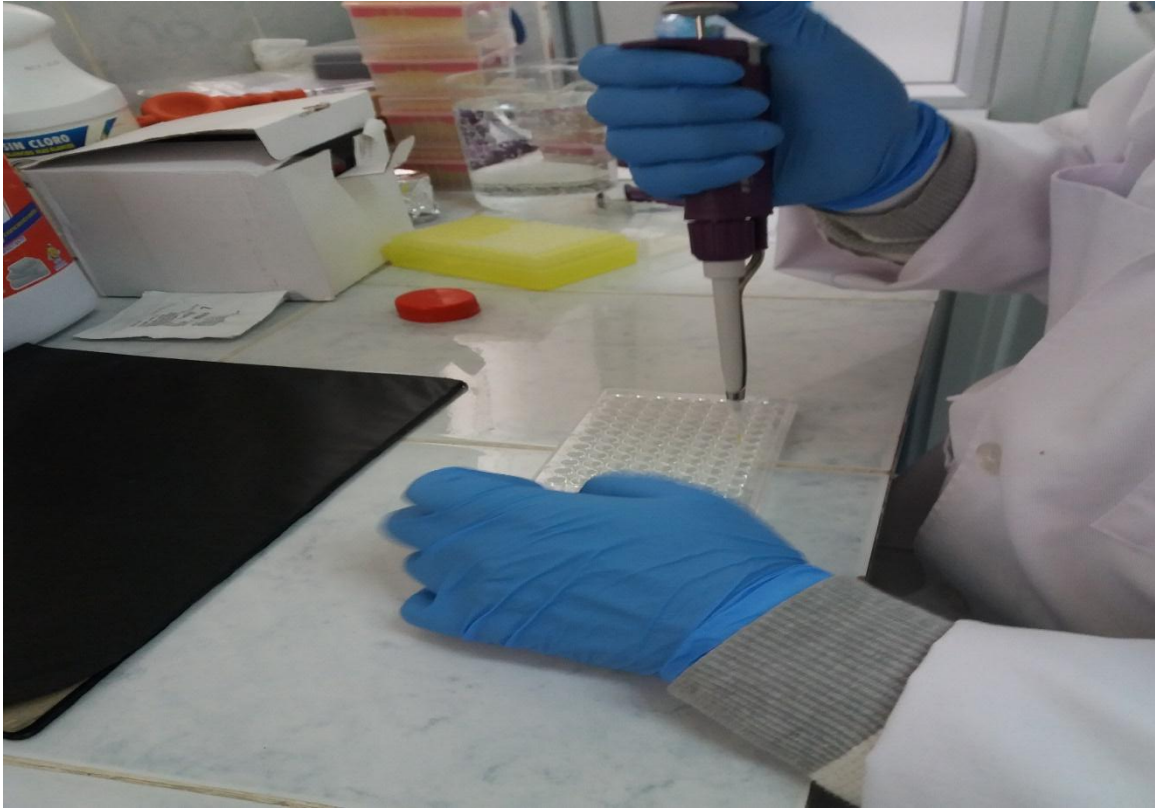
**Figura 8.** Finalización de la centrifugación para extraer del plasma sanguíneo



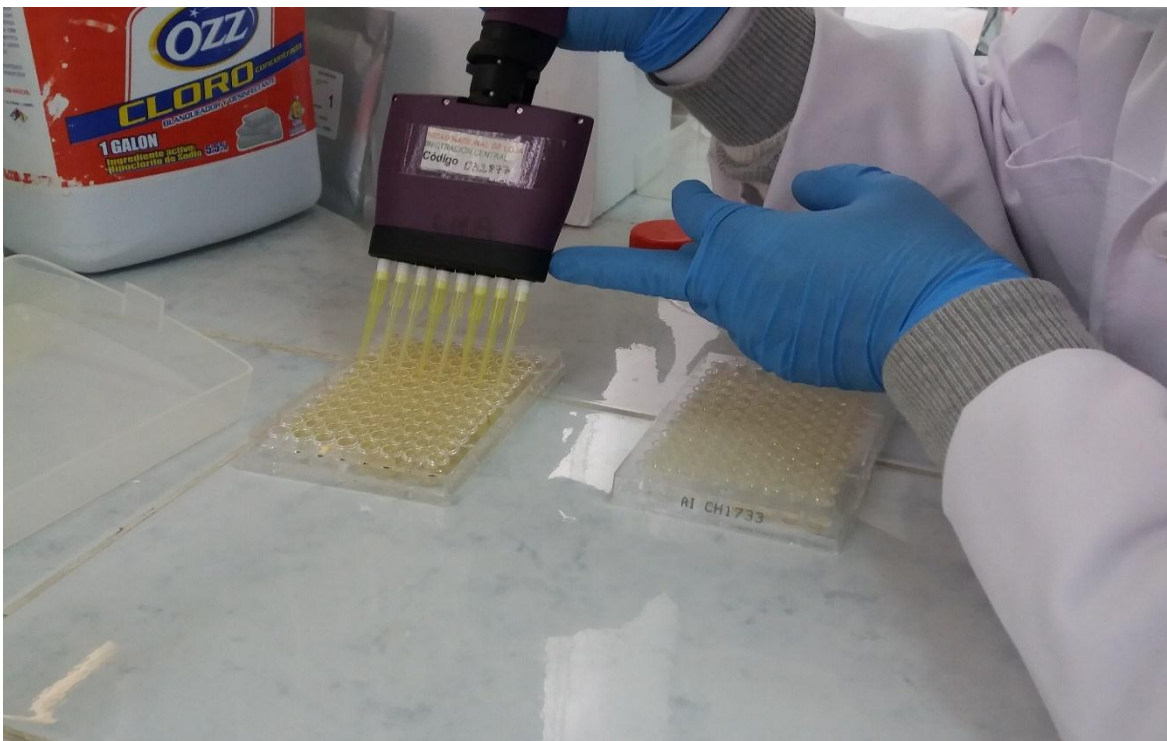
**Figura 9.** Muestras del plasma para su análisis



**Figura 10.** Kit de ELISSA para detección de Influenza Aviar



**Figura 11.** Colocación de las muestras en la placa



**Figura 12.** Colocación de las muestras diluidas en los pocillos correspondientes



**Figura 13.** Lavado de los pocillos



**Figura 14.** Agregamos solución stop a los pocillos correspondientes



**Figura 15.** Placa para la lectura en el espectrofotómetro



**Figura 16.** Lectura de la placa en el espectrofotómetro