



1859

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS

NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y

ZOOTECNIA

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

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

AUTOR:

Eduardo Agustín Cueva Reátegui

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Galo Vinicio Escudero Sánchez Mg. Sc.

Loja – Ecuador

2017

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

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Dr. Galo Escudero Sánchez Mg. Sc.

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

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

Loja, 12 de Diciembre de 2016



.....
Dr. Galo Escudero Sánchez Mg. Sc.

DIRECTOR DE TESIS

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

CERTIFICADO DE CALIFICACIÓN DE TESIS

Loja, 28 de Marzo del 2017

Honorable tribunal de grado

CERTIFICA:

Que el señor Eduardo Agustín Cueva Reátegui egresado de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia ha incorporado las correcciones sugeridas por parte del tribunal de grado en la tesis titulada “**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO EN LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE**”, previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista.

Por lo que se autoriza la impresión del trabajo y continuar con los trámites de grado.

Muy atentamente,


.....
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Segundo German Barragán Fierro Mg. SC


.....
VOCAL DEL TRIBUNAL

Dr. José Stalin Yaguana Jiménez Mg. SC


.....
VOCAL DEL TRIBUNAL

Dra. Jhuliana Katherine Luna Herrera Mg. Sc.

AUTORÍA

Yo, Eduardo Agustín Cueva Reátegui, declaro ser autor del presente trabajo de investigación y eximo a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

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

Autor: Eduardo Agustín Cueva Reátegui

Firma: 
.....

Cedula: 1105113391

Fecha: Loja, 30 de marzo 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, Eduardo Agustín Cueva Reátegui, declaro ser autor de la tesis titulada: **“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO EN LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE”**, como requisito para optar al grado de: Médico Veterinario Zootecnista, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional (RDI):

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

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



Firma:

Autor: Eduardo Agustín Cueva Reátegui

Número de cédula: 1105113391

Dirección de domicilio: Loja, Miraflores Bajo entre Quinara y Atahualpa

Correo Electrónico: eduardocueva91@hotmail.com

Teléfono: 2-687-694 **Celular:** 0993881345

DATOS COMPLEMENTARIOS

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

Tribunal de Grado: Dr. Segundo German Barragán Fierro Mg. Sc.

Dr. José Stalin Yaguana Jiménez Mg. Sc.

Dra. Jhuliana Katherine Luna Herrera Mg. Sc.

AGRADECIMIENTO

Al concluir el presente trabajo de investigación agradezco a Dios y la Virgencita, por permitirme culminar esta etapa importante de mi vida. A la Universidad Nacional de Loja y de manera especial a la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia por haberme abierto sus puertas y permitir que cumpla una de mis sueños más anhelados; a todos sus docentes, por sus sabios conocimientos y experiencias.

Mi gratitud especial al Dr. Galo Vinicio Escudero Sánchez Mg. Sc. Director de tesis, a quien guardo un sentimiento de aprecio especial; quien ha colaborado de manera significativa con sus invalorable aportes y conocimientos, para culminar con éxito la presente investigación.

Finalmente, mi agradecimiento profundo y sincero a mis padres y hermanos que con su apoyo incondicional hacen que pueda cumplir con éxito mis estudios y en general a mi familia y a todos y cada uno de mis amigos y compañeros que han sido los pilares fundamentales para llevar adelante el desarrollo del presente trabajo investigativo.

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo y todo el desarrollo de mi carrera Universitaria la dedico a Dios y a mi familia, especialmente a mis padres: Vicente Cueva y Gloria Reátegui de manera especial a mis Hermanos por la confianza y apoyo brindado en cada momento, además por sus valiosos consejos e innumerables sacrificios realizados para poder llevar a cabo este trabajo de tesis.

Agradezco de todo corazón a mis abuelitos y en especial a mi abuelito Arcadio Cueva que hoy ya no está con migo, que por la motivación y ejemplo que fue para mí al inclinarme a seguir esta profesión por toda la ayuda y sus consejos en los momentos más difíciles de mi vida y enseñarme a salir adelante sobre todo luchar por lo que uno quiere en la vida.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁG.
CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS	ii
CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iii
AUTORÍA	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA.....	vii
ÍNDICE GENERAL	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1.1. Sinonimia	3
2.1.2. Importancia Económica	3
2.1.3. Historia	4
2.1.4. Etiología.....	4
2.1.4.1. Clasificación del virus de Newcastle (NC)	4
2.1.4.2. Morfología del virus de NC.....	5
2.1.5. Patogenicidad del virus de NC	8
2.1.5.1. Índice de patogenicidad intracerebral (IPIC).....	9
2.1.5.2. Índice de patogenicidad intravenosa (IPIV).....	9
2.1.5.3. Índice de mortalidad media embrionaria (IMME)	10
2.1.6. Período de Incubación.....	10
2.1.7. Transmisión del VNC	10
2.1.7.1. Formas de Transmisión.....	10
2.1.8. Signos Clínicos	11
2.1.8.1. Newcastle velogénico viscerotrópico	11
2.1.8.2. Newcastle velogénico neurotrópico.....	11

2.1.8.3. Newcastle mesogénico.....	12
2.1.8.4. Newcastle lentogénico.....	12
2.1.9. Lesiones Macroscópicas.....	12
2.1.10. Diagnóstico.....	13
2.1.10.1. Pruebas de laboratorio.....	13
2.1.11. Diagnóstico Diferencial.....	17
2.1.12. Prevención y Control	17
2.1.12.1. Medidas Sanitarias	17
2.1.13. Profilaxis.....	17
2.1.13.1. Vacunas de virus vivos.....	17
2.1.13.2. Vacunas Inactivadas.....	19
2.2. Influenza Aviar	19
2.2.1. Sinonimia	20
2.2.2. Importancia Económica	20
2.2.3. Historia	21
2.2.4. Etiología.	21
2.2.4.1. Clasificación del virus de IA.....	22
2.2.4.2. Morfología del virus de Influenza Aviar y Estructura.....	22
2.2.5. Composición molecular del virus de Influenza.....	25
2.2.6. Ciclo de Replicación Viral del Virus de Influenza Aviar	25
2.2.6.1. Patogenicidad del virus de IA.....	26
2.2.7. Transmisión del Virus de Influenza Aviar	26
2.2.8. Periodo de Incubación	27
2.2.9. Signos clínicos	27
2.2.10. Lesiones Macroscópicas.....	28
2.2.11. Diagnóstico.....	28
2.2.11.1. Secuenciación del virus de.....	29
2.2.12. Diagnóstico Diferencial.....	29
2.2.13. Prevención y Control	30
2.2.14. Vacunación.....	30
2.2.15. Almacenamiento y Transporte de Muestras.....	31
2.2.16. Copan Medio de Transporte Universal (Utm-Rt).....	31

2.2.16.1. Formulación del Medio UTM-RT	32
2.2.17. Huevos embrionados libre de patógenos específicos (SPF).....	32
2.2.18. Trabajos relacionados sobre el tema.....	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1. MATERIALES.....	34
3.1.1. Materiales de Campo	34
3.1.2. Materiales de Laboratorio	34
3.1.3. Materiales de Oficina.....	35
3.2. MÉTODOS	36
3.2.1. Delimitación del Área de Estudio	36
3.2.2. Tamaño y Selección de la Muestra	37
3.2.3. Variables	37
3.2.4. Recopilación de la Información	37
3.2.5. Establecimiento de Muestreo.....	38
3.2.6. Técnicas de Recolección de las Muestras de Heces	43
3.2.7. Análisis de Laboratorio	43
3.2.7.1. Preparación de las Muestras.....	43
3.2.7.2. Aislamiento del virus de NC e IA en huevos SPF	44
3.2.7.3. Cosecha de los líquidos amniótico y alantoideo.....	44
3.2.8. Prueba serológicas para los virus de NC e IA	45
3.2.8.1. Prueba de Hemaglutinación (HA).....	45
3.2.8.2. Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI).....	45
3.2.9. Pruebas de patogenicidad para los virus de NC e IA.....	46
3.2.9.1. Tiempo medio de muerte en huevos para el virus de NC e IA	46
3.2.9.2. Índice de patogenicidad intracerebral para el virus de NC.....	47
3.2.9.3. Índice de patogenicidad intravenosa para los virus de NC e IA.....	47
3.3. Procesamiento de la Información	48
3.3.1. Tabulación	48
3.3.2. Análisis e Interpretación.....	48
3.3.3. Presentación de resultados	48
4. RESULTADOS.....	49
4.1. Prevalencia de los virus de Newcastle e Influenza Aviar	49

4.2.	Presencia de los virus de Newcastle e Influenza Aviar mediante aislamiento en huevos embrionados SPF y confirmada mediante hemaglutinación (HA).	50
4.2.1.	Aislamiento de los virus de Newcastle e Influenza Aviar en aves de traspatio en la provincia de Zamora Chinchipe.	50
4.2.2.	Presencia de los virus de Newcastle e Influenza Aviar en la zona norte de la provincia de Zamora Chinchipe	51
4.2.3.	Presencia de los virus de Newcastle e Influenza Aviar en la zona centro de la provincia de Zamora Chinchipe	52
4.2.4.	Presencia del virus de NC e IA en la zona sur de la provincia de Zamora Chinchipe	53
4.3.	Determinación de la patogenicidad de los virus	54
4.4.	Secuenciación de las cepas aisladas para evaluar sus relaciones genéticas.....	54
5.	DISCUSIÓN	55
5.1.	Presencia del virus mediante aislamiento en huevos embrionados SPF de la enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar.	55
5.2.	Determinación de la patogenicidad de los virus	56
5.3.	Secuenciación las cepas aisladas para evaluar sus relaciones genéticas.....	56
6.	CONCLUSIONES	57
7.	RECOMENDACIONES	58
8.	BIBLIOGRAFIA.....	59
9.	ANEXOS	66

ÌNDICE DE TABLAS

TABLAS	PÁG.
Tabla 1. Composición molecular del virus de influenza.....	25
Tabla 2. Zona norte de la provincia de zamora chinchipe	40
Tabla 3. Zona centro de la provincia de zamora chinchipe	41
Tabla 4. Zona sur de la provincia de zamora chinchipe	42
Tabla 5. Resultado general de los tres sectores a muestrear	42
Tabla 6. Prevalencia de los virus de nc e ia en aves de traspatio en la provincia de zamora chinchipe	49
Tabla 7. Aislamiento de los virus de nc e ia en aves de traspatio, por zonas en la provincia de zamora chinchipe	50
Tabla 8. Resultados del aislamiento viral en huevos spf y prueba de ha en la zona norte de la provincia de zamora chinchipe	51
Tabla 9. Resultados del aislamiento viral en huevos spf y prueba de ha en la zona centro de la provincia de zamora chinchipe	52
Tabla 10. Resultados del aislamiento viral en huevos spf y prueba de ha en la zona sur de la provincia de zamora chinchipe	53

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	PÁG.
Figura 1. Ciclo de replicación viral devnc.	7
Figura 2. Estructura De Un Virus Influenza Tipo A.	23
Figura 3. Cantones De La Provincia De Zamora Chinchipe	36
Figura 4. Mapa De Distribución De Sitios De Muestreo En La Provincia De Zamora Chinchipe.....	39

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

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de los virus de Newcastle (NC) e Influenza Aviar (IA) en aves de traspatio incluyendo las de riña que se encuentran cerca de humedales y avicultura comercial en la provincia de Zamora Chinchipe. Se recolectaron 300 muestras de acuerdo a la prevalencia límite descrita por González (1986), de hisopados cloacales de aves de traspatio y de riña sin distinción de especie, raza, estirpe, sexo y edad tomando como máximo tres a cuatro muestras por punto de muestreo en los meses enero-febrero 2016, para esto utilizamos ArcMap.

Las muestras fueron analizadas mediante aislamiento viral en huevos embrionados de pollo SPF. La presencia del virus de Influenza Aviar y Newcastle fue determinada por la actividad hemaglutinante del fluido alantoideo, y confirmada mediante pruebas de hemoaglutinación (HA). El 100% (300/300) de las muestras analizadas fueron negativas al virus de Influenza Aviar y Newcastle. La técnica de evaluación de riesgo mediante "epiR" versión 09-79 indicó que la prevalencia del virus de NC e IA en aves de traspatio y riña fue del 0% con un intervalo de confianza del 95 % y un índice de prevalencia de (0 - 1,19%).

Se concluyó que las aves aleatoriamente muestreadas no se encontraban infectadas con los virus ni eran portadores asintomáticos, por lo cual la prevalencia en la provincia de Zamora Chinchipe de estos dos virus fue del 0% que se confirmó mediante la prueba de hemoaglutinación (HA), por esta razón se recomienda realizar monitoreos permanentes usando pruebas moleculares que permitan identificar pequeñas cantidades de concentración de ARN material genético de estos dos virus, que solo RT-qPCR es capaz de detectar (Kubista M. et al., 2006).

Palabras claves: Virus, Newcastle, Influenza aviar, aislamiento.

ABSTRACT

This research study was carried out with the purpose of determining the presence of the Newcastle (NC) and Avian Influenza (AI) virus in backyard birds including cockfight that can be found near wetlands and commercial poultry in the province of Zamora Chinchipe. 300 samples were collected according to limit prevalence described by González (1986), swab sewage of backyard poultry and cockfight regardless of species, breed, race, sex and age taking a maximum three to four samples per point in the months of January – February 2016, to do this ArcMap was applied.

The samples were analyzed by virus isolation in embryonated chicken eggs SPF. The presence of Avian Influenza and Newcastle virus was determined by the allantoic fluid hemagglutinating activity, and confirmed by hemagglutination tests (HA). 100% (300/300) of the specimens tested were negative to the virus of Avian Influenza and Newcastle. The technique of risk evaluation through "epiR" version 09-79 indicated that the prevalence of NC e AI virus in backyard birds and cockfight was 0% with a 95% confidence interval and a prevalence rate of (0 - 1.19%).

It was concluded that randomly sampled birds were not infected with the virus or were asymptomatic carriers, so the prevalence in the province of Zamora-Chinchipe of these two viruses was 0%, which was confirmed by the hemagglutination test (HA) for this reason it is recommended to perform permanent monitoring using molecular tests that identify small amounts of concentration of genetic material RNA of these two viruses, only RT-qPCR is capable of detecting (Kubista M. et al., 2006)

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

1. INTRODUCCIÓN

La avicultura constituye una de las principales actividades realizadas por el hombre a nivel mundial, ya que cuenta con un ciclo corto de explotación y buena conversión permitiendo obtener buena calidad de carne y huevos; sin embargo esta producción está seriamente amenazada por la presencia de enfermedades infecciosas, como son la enfermedad de Newcastle (EN) e Influenza Aviar (IA) (Cuello, S., Armando, V., & Julia, N. 2011), desde el punto de vista económico a nivel mundial son las más importantes tanto por su control a través del uso de biológicos, como también por la incidencia de brotes en explotaciones comerciales, aves de traspatio y de riña.

Se considera que la enfermedad más común y problemática es la enfermedad de Newcastle es causada por un Paramixovirus aviar tipo 1 provocando afecciones respiratorias, nerviosas y digestivas causando elevadas mortalidades y gran disminución en la producción (Arenas R. M. 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 específicos del genero influenza virus A que son miembros de la familia Orthomyxoviridae (CFSPH, 2016).

Los grandes problemas que estas enfermedades presentan se distingue en la avicultura de traspatio, debido al escaso uso de tecnología avícola; donde las aves se las alojan en instalaciones rústicas, carecen de un control sanitario, programas de bioseguridad y su alimentación tiene como base diversos productos o subproductos generados en su mayoría en la misma unidad de producción siendo estos factores los que inciden en la prevalencia de estas enfermedades (Molina, P. 2013).

Como medida de control de las enfermedades se ha establecido la vacunación rutinaria contra el virus de Newcastle e Influenza aviar en todas las aves

comerciales, sin embargo, las aves de traspatio no son sometidas a este procedimiento por razones socio-culturales y económicas. Se ha descrito la aparente resistencia de estas aves a la enfermedad, pero se reconoce que actúan como importantes portadores y fuentes de infección para la avicultura comercial.

Para cumplir con esta investigación se cumplieron los siguientes objetivos:

Determinar la presencia del virus de Newcastle e Influenza Aviar en aves de traspatio incluyendo las de riña que se encuentran cerca de humedales y avicultura comercial.

Aislar el virus de Newcastle mediante huevos embrionados SPF.

Aislar el virus de Influenza Aviar mediante huevos embrionados SPF.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Enfermedad de Newcastle.

La enfermedad de Newcastle (ENC) es causada por un virus específico del paramixovirus aviar de tipo I (APMV-1), es de alta transmisión que causa mayor impacto económico a la avicultura por las pérdidas que ocasiona, las que se encuentran representadas por elevadas mortalidades, bajas en la producción (ICA, 2009).

El curso de la enfermedad en las aves puede variar desde forma subclínica hasta moderado o severo con alta mortalidad dependiendo principalmente de la virulencia de la cepa circulante y de la susceptibilidad de la especie infectada, así como también de los anticuerpos que puedan tener las aves al momento del desafío (Alexander, 2001 y 2003).

2.1.1. Sinonimia

- Pseudopeste aviar
- Peste atípica
- Neumoencefalítis aviar
- Peste de diarrea verde (Serna, D. 2011).

2.1.2. Importancia Económica

Está en ser una de las enfermedades, en su forma patógena, más importante y devastadora que afecta a las aves. La magnitud de este problema a nivel mundial varía debido a la presentación de brotes recurrentes caracterizados por altas tasas de morbilidad y mortalidad de hasta 100% causando grandes pérdidas económicas, y otros donde solo se observan infecciones respiratorias ligeras o en algunos casos sin evidencias clínicas de enfermedad (Alexander, 2003).

2.1.3. Historia

En 1926, se reporta una enfermedad altamente contagiosa y mortal de las gallinas en dos lugares diferentes del mundo, las Islas de Java, Indonesia y en la localidad de Newcastle-on-Tyne, Inglaterra (Cuello, S. et al., 2011)

En 1980 la enfermedad se distribuye por numerosos países europeos. En 1987, el Veterinario Belga Guy Brasseur escribe acerca de la paramixovirosis: “Se trata de una enfermedad en plena evolución. El virus se adapta a todos los lugares, se multiplica fácilmente desde ese entonces ha sido reconocida y es endémica en muchos países del mundo (ICA, 2009).

El nombre de Newcastle lo acuñó Doyle como una medida temporal, ya que deseaba evitar un nombre descriptivo que pudiera confundirse con otras enfermedades (Calnek, B. 1995).

2.1.4. Etiología

La enfermedad de Newcastle es causada por los virus RNA del serotipo paramixovirus aviar del tipo 1 (APMV-1). Estos virus, llamados APMV-1 o virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), son miembros del género Avulavirus de la familia Paramyxoviridae (CFSPH. 2008).

Se inactiva a 56°C en 3 horas, y a 60°C en 30 minutos. Sobreviven períodos largos a temperatura ambiente, especialmente en heces. Es infectivo hasta 60 días si se conserva a temperatura de -10 a 2 °C se inactiva por formalina y fenol (ICA, 2009).

2.1.4.1. Clasificación del virus de Newcastle (NC)

Las cepas del virus de la enfermedad de Newcastle según la OIE (2012), se agrupan en cinco patotipos en base a los signos clínicos observados en pollos infectados y menciona que una de las propiedades más características de las

distintas cepas del VEN es su enorme variación respecto a la patogenicidad, estas cepas son:

- Velogénico viscerotrópico: es una forma muy patógena en la que se observan frecuentemente lesiones intestinales hemorrágicas.
- Velogénico neurotrópico: se presenta con mortalidad elevada, habitualmente después de signos respiratorios y nerviosos.
- Mesogénico: se presenta con signos respiratorios y signos nerviosos ocasionales pero baja mortalidad.
- Lentogénico o respiratorio: se presenta con una infección respiratoria leve o subclínica.
- Entérico asintomático: normalmente consiste en una infección entérica subclínica.

2.1.4.2. Morfología del virus de NC

Los virus NC son pleomórficos aunque generalmente adoptan una morfología esférica con un diámetro que oscila entre 100 a 150 nm. El peso molecular de la partícula viral es de 500×10^6 Da. El virión se encuentra rodeado de una envoltura con una doble capa lipídica derivada de la membrana de la célula hospedadora (Alexander, 1997).

Los rubulavirus están constituidos por seis proteínas estructurales (16): la nucleoproteína (NP), la fosfoproteína (P) y la proteína de alto peso molecular (L), se encuentran asociadas al genoma viral; mientras que la proteína de matriz (M) y dos glicoproteínas, la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y las glicoproteínas de fusión (F1y F2) se localizan en la membrana viral (Leyva, J. R. et al., 2002).

A. Hemoaglutinina- Neuraminidasa HN

Es una proteína multifuncional ya que posee la capacidad de reconocer un receptor específico sobre la membrana celular, cataliza la liberación de ácidos neuramínicos de glicoconjugados, lo cual evita la agregación de los viriones y

además, en conjunto con la proteína F, promueve la fusión de las membranas celular y viral (Leyva, J. R. et al., 1999).

B. Nucleocápside (NP)

Tiene un peso molecular de 53 kDa y sus funciones son participar en el proceso de encapsidación interaccionando con la proteína M y en los procesos de transcripción y replicación colaborando con las proteínas L y P, además de mantener la integridad estructural de la nucleocápside (García et al., 1989).

C. Proteína de fusión (F)

La proteína de fusión tiene la función de llevar a cabo el proceso de ingreso de la partícula viral al interior de la célula. Esta proteína es la principal responsable del fenotipo de patogenicidad. Dicho fenómeno depende de las propiedades químicas de los aminoácidos presentes en el sitio de ruptura de la proteína. La presencia mayoritaria de aminoácidos básicos expresa un fenotipo velogénico, mientras que su baja presencia es característico de cepas lentogénicas (Glickman et al., 1988).

D. Proteína Matrix (M)

Es la proteína más abundante del virión, forma un almacén o matriz periférica que recubre internamente la envoltura membranosa, manteniendo la estructura del virión al interactuar tanto con el resto de las proteínas de membrana como con las de la nucleocápside. Juega un papel fundamental en la liberación de los viriones de la célula infectada (Teng, M. N., & Collins, P. L., 1998).

E. Fosfoproteína (P)

Es una proteína muy variable en su longitud dentro de los virus de la familia y está compuesta por dos dominios, el N-terminal y el C-terminal, separados por una región hipervariable. La proteína P desempeña un papel importante en la

síntesis de ARN, pues junto con la proteína L forman la polimerasa viral (P-L) y junto a la NP forman un complejo que se supone active la encapsidación del ARN (García-Barreno, B., Delgado, T., & Melero, J. A., 1996).

F. Proteína L

La proteína L es la más voluminosa del virión y es el componente catalítico de la ARN polimerasa. Las funciones entre ellas se encuentran actividades catalíticas en la síntesis de ARN genómico y mensajero, estas actividades explican por qué los paramixovirus realizan sus ciclos completos de replicación en citoplasma sin necesidad de ingresar al núcleo, ya que la proteína L proveería de actividades de replicación del genoma completo para dar origen a nuevas partículas virales (Santos-López et al., 2004).

G. Ciclo de Replicación Viral del VNC

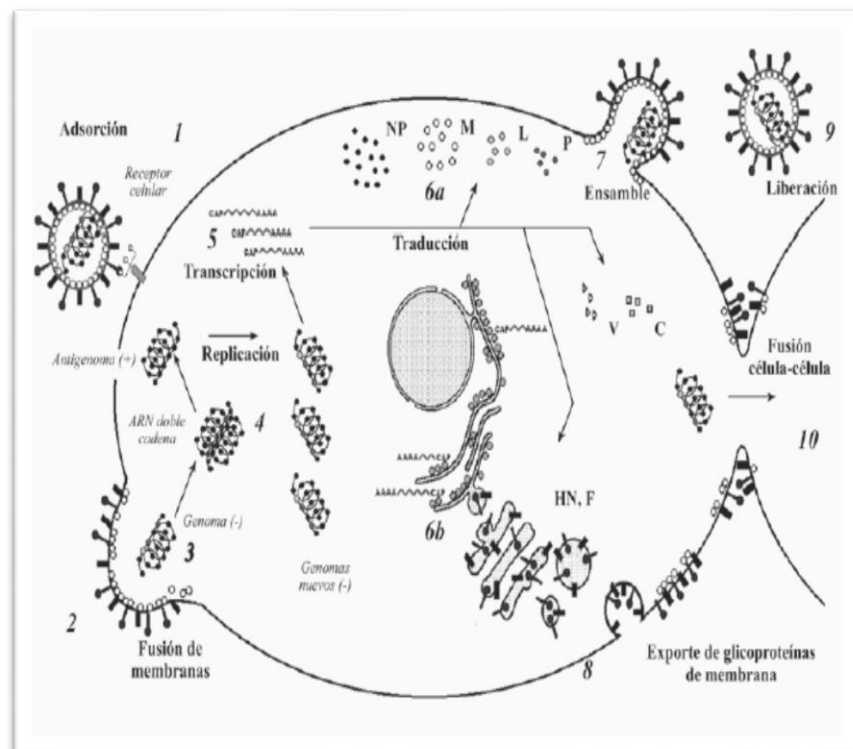


Figura 1. Ciclo de replicación viral de VNC. Lamb y Kolakofsky, 1996 y Leyva, J. R. et al., 2002.

La replicación del virus ocurre en el citoplasma. Luego de la unión del virus a la célula por medio de los receptores glicolipídicos, se produce la fusión de las membranas virales y celulares a pH fisiológico y la nucleocápsida penetra dentro de la célula, donde permanece intacta con sus tres proteínas asociadas. Seguidamente, se activa la ARN polimerasa ARN dependiente para producir varios ARN complementarios de polaridad positiva, que actúan como ARN mensajeros y utilizan los mecanismos celulares para la producción de proteínas virales. Al mismo tiempo, se sintetiza un ARN completo de polaridad positiva que sirve como molde para la replicación del genoma viral de polaridad negativa que se asocia con la nucleoproteína y la transcriptasa para formar la nucleocápsida. La maduración del virión involucra en primer lugar la incorporación en la membrana de la célula hospedero de las proteínas virales de la envoltura sintetizadas, seguido de la asociación de la proteína M y otras proteínas no glicosiladas con la membrana celular modificada. Posteriormente, se ubica la nucleocápsida bajo la proteína M y ocurre la formación y liberación de los viriones maduros por exocitosis (Alexander, 1997; Murphy et al., 1999).

2.1.5. Patogenicidad del virus de NC

Los virus de NC, se distinguen entre virus de alta y baja virulencia en pollos, o virus enzoótico y epizoóticos. Los pollos son altamente susceptibles, mientras que los patos y gansos pueden encontrarse infectados y mostrar signos clínicos leves o ninguno, incluso con cepas letales para pollos (Alexander, 2003; Alexander D. et al., 1998). La virulencia de las cepas varía considerablemente según el huésped y aparentemente es dependiente del determinante antigénico y el estatus enzimático del huésped (Gerlach, 1994).

La determinación de la virulencia de los aislados del virus de Newcastle, según la actual definición de la enfermedad por la OIE (2008), se realiza tanto por la secuenciación nucleotídica y deducción de la secuencia de aminoácidos de la región del péptido conectante de la proteína F como por pruebas de laboratorio in vivo.

La prueba in vivo recomendada es el índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) en pollitos de 1 día de edad (OIE, 2008). Sin embargo, otras pruebas como el índice de mortalidad media de muerte embrionaria (IMME), y el índice de patogenicidad intravenoso (IPIV) en pollos de 6-8 semanas de edad también son empleadas (Alexander, 1998; OIE, 2004). Estas pruebas de acuerdo con sus resultados permiten clasificar las cepas o aislados en cepas asintomáticas, cepas de baja virulencia conocidas como lentogénicas, cepas de virulencia intermedia, conocidas como mesógenicas y las cepas altamente virulentas denominadas velogénicas, que a su vez se dividen en viscerotrópica y neurotrópica (Alexander, 1997, 1998; Panda y col., 2004).

2.1.5.1. Índice de patogenicidad intracerebral (IPIC)

Para determinar el (IPIC) se utilizan 10 pollitos SPF de un día de edad a los cuales se les va a inocular líquido alantoideo, vía intracerebral y se observan cada 24 horas por un período de ocho días, registrando las observaciones de acuerdo con los siguientes valores de lectura diaria: 0 -Normal, 1-Enfermo, 2 -Muerto. Se suman los datos de cada pollito y con estos valores se calcula el promedio aritmético. El valor obtenido es el índice de patogenicidad intracerebral del aislamiento estudiado. El valor máximo que se puede obtener es de 2.0 (ICA, 2009).

2.1.5.2. Índice de patogenicidad intravenosa (IPIV)

La prueba consiste en inocular 10 pollos SPF de 6 semanas de edad a nivel de la vena braquial con líquido alantoideo y se observan cada 24 horas por un período de diez días, registrando las observaciones de acuerdo a los siguientes valores: 0- Normal, 1-Enfermo, 2-parálisis, 3-Muerto. Se suman los datos de cada pollito y con estos valores se calcula el promedio aritmético. El valor obtenido es el índice de patogenicidad intravenoso. El valor máximo de esta prueba es de 3.0 (ICA, 2009).

2.1.5.3. Índice de mortalidad media embrionaria (IMME)

Es el tiempo en horas, que transcurre para que la dosis mortal mínima (DMM) cause la muerte de embriones de pollos SPF de 9 a 11 días de incubados, determinando así su grado de virulencia. Los embriones son observados durante un tiempo máximo de ocho días (ICA, 2009).

2.1.6. Período de Incubación

El período de incubación en las aves de corral varía de 2 a 15 días dependiendo de la virulencia de la cepa y la susceptibilidad de la población. En pollos infectados con cepas velogénicas, un período de incubación de 2 a 6 días. Se han registrado periodos de incubación de hasta 25 días en algunas especies de aves (ICA, 2009).

2.1.7. Transmisión del VNC

El contacto directo o indirecto con el material contaminado (fómites) está asociado con deficiencias en bioseguridad; Pájaros de compañía (aves de jaula), aves de traspatio y aves de pelea sirven como reservorios (Shane, S. 2005).

2.1.7.1. Formas de Transmisión

H. Transmisión Horizontal

Se produce a través del contacto directo con secreciones respiratorias y heces de animales infectados. La EN puede ser diseminada por aves silvestres, mascotas, aves de combate, alimento contaminado y fómites contaminados movidos por gente (Cué, G. 2011)

I. Transmisión Vertical

La transmisión vertical es rara ya que el virus de Newcastle tiene la propiedad de matar los embriones antes de la eclosión. Los huevos fecundados infectados son vehículo de transmisión a otras zonas (reproductoras - incubadoras) (ICA, 2009).

2.1.8. Signos Clínicos

En general los signos son dependientes del virus actuante y pueden variar desde signos respiratorios leves como tos, estornudos y blefaritis hasta signos neurológicos como, tortícolis, desplazamientos en círculos y parálisis completa. De igual manera, se pueden presentar signos digestivos como diarrea verde y en la fase de postura disminución o interrupción de la producción de huevos, huevos deformados, de cáscara rugosa y fina y que contienen albúmina acuosa (ICA, 2009).

Signos clínicos de acuerdo a las cepas del virus:

2.1.8.1. Newcastle velogénico viscerotrópico

Esta forma se caracteriza por un ataque agudo con 100% de morbilidad en la población y alta mortalidad de rápido ascenso (20% en 2 días, 50% en 3 días, 80% en 5 días) acompañada por signos Se observa conjuntivitis, disnea, inflamación alrededor de los ojos, diarrea, depresión severa y muerte. Es posible observar signos nerviosos en los estadios finales de la enfermedad (Villegas, P. 2015).

2.1.8.2. Newcastle velogénico neurotrópico

Se observan temblores nerviosos de la cabeza, tortícolis, parálisis de las alas o de las patas, en ocasiones se puede observar conjuntivitis y disnea. Las aves mueren debido a su incapacidad de alcanzar el agua y el alimento. La infección

produce el 100% de morbilidad, pero sólo el 50% de mortalidad en los pollos adultos, la mortalidad es mayor en las aves jóvenes (Villegas, P. 2015).

2.1.8.3. Newcastle mesogénico.

Se presenta como afección respiratoria que puede ser de ligera a moderada. En general se observa tos, jadeo, así como caída en la producción de huevo, y problemas en la calidad de la cáscara. Puede presentarse mortalidad elevada en aves jóvenes susceptibles (Calnek, B. 1995).

2.1.8.4. Newcastle lentogénico

Se presenta de aparición aguda con moderada a alta morbilidad. Se observan signos respiratorios de leves a inaparentes pero la mortalidad mínima ocurre en casos sin complicación. La enfermedad de Newcastle lentogénica puede ser responsable de caídas asintomáticas en la producción de huevos, de líneas comerciales deficientemente inmunizadas y en aves reproductoras. Las cepas lentogénicas por lo general no causan la enfermedad si no van acompañados por infecciones bacterianas secundarias que dan lugar a síntomas respiratorios (Shane, 2005).

2.1.9. Lesiones Macroscópicas

No existen lesiones patognomónicas, pero existen algunas bastante orientadas, aunque el diagnóstico final debe basarse en el aislamiento e identificación viral. Las lesiones que se pueden encontrar son:

- Edema en tejidos intestinales y peritraqueales, especialmente en la entrada torácica.
- Congestión, y a veces hemorragia de la mucosa traqueal.
- Petequias y equimosis de la mucosa del proventrículo, especialmente localizado en las glándulas de la mucosa.
- Edema, hemorragias, necrosis o ulceración del tejido linfoide en la mucosa de la pared intestinal.
- Hemorragias o degeneración en ovarios (Calnek, B. 1995).

2.1.10. Diagnóstico

En la EN el objetivo del diagnóstico es llegar a la decisión de si es necesario o no tomar medidas de control para evitar la diseminación de la enfermedad. Ninguno de los signos clínicos o lesiones producidos por el VEN son considerados patognomónicos y la amplia variación en las manifestaciones de la enfermedad solo sirven para sugerir que estamos en presencia de la misma. El diagnóstico es muy difícil de realizar aun presuntivamente, sobre todo cuando la enfermedad es producida por cepas de virus que sólo afectan al aparato respiratorio, sin producir lesiones nerviosas ni digestivas (Cuello, S., Noda, J., & Vega, A., 2011).

2.1.10.1. Pruebas de laboratorio

El diagnóstico de la enfermedad de Newcastle debe ser confirmado por aislamiento viral. El virus puede ser aislado del bazo, cerebro o pulmones de las aves muertas, o por hisopados traqueales y cloacales de aves muertas o vivas, por inoculación en el saco alantoideo de huevos embrionados de 9 a 10 días de edad (Maclachlan & Dubovi, 2011)

Dentro de las pruebas serológicas utilizadas para Newcastle se encuentran: Inhibición de la hemaglutinación (HI) y ELISA, y las pruebas de diagnóstico directas son aquellas que tienen como finalidad la identificación del virus o parte de sus componentes se encuentran las pruebas de aislamiento viral, pruebas moleculares como la RT-PCR, pruebas de inmunoprecipitación y las pruebas biológicas que más allá de identificar el agente pueden predecir la patogenicidad del mismo (ICA, 2009)

J. RT-PCR

Esta técnica es implementada para detectar y amplificar el ARN viral. Permite amplificar la región del gen F el cual traduce la proteína fusión (F) que contiene el punto de escisión F0 y valorar su virulencia, la cual debe escindirse en F1 y

F2 para que las partículas sean infectivas. La proteína F se sintetiza como un precursor inactivo que es posteriormente clivado proteolíticamente para ser activo, este clivaje se realiza en el péptido entre los aminoácidos 116 y 117. La secuenciación de aminoácidos de esta glicoproteína difiere entre las cepas de alta y baja virulencia, en los residuos de aminoácidos donde se da el clivaje donde las cepas altamente virulentas tienen mayor capacidad de clivaje por mayor número de proteasas celulares. En la mayoría de los PMVA-1 que son de alta virulencia presentan una secuencia 112R/K-R-Q-K/R-R 116 en el extremo C-terminal (carboxílico) de la proteína F2 y F (felilalanina) en el residuo 117 y en el extremo N-terminal (amino) de la proteína F1, en cambio los virus de baja virulencia tienen secuencias en la misma región 112G/E-K/R-Q-G/E-R116 y L (leucina) en el residuo 117. El virus se considera virulento si presenta por lo menos tres residuos de arginina o lisina entre los residuos 113 y 116 en el terminal C de la proteína F2 y fenilalanina en el residuo 117, el cual es el terminal amino de la proteína F1 (Velásquez F. y Gil López R., 2016).

K. 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 rRT-PCR 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 EN en 2002–2003, cuando se aplicó la prueba descrita por Wise et al 2004, 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 PPMV-1) y un conjunto de cebadores/sondas diseñados para detectar cepas de virus de baja virulencia. 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. Los cebadores y las sondas del mencionado informe fueron validadas en cepas lentogénicas, mesogénicas y velogénicas que se encuentran habitualmente en los Estados Unidos de América. En el momento álgido del brote, se ensayaron entre 1.000 y 1.500 muestras cada día mediante rRT-PCR. La desventaja de la rRT-PCR es que, actualmente, los termocicladores especiales que se precisan son demasiado caros, lo que obliga a muchos laboratorios a descartar el empleo de este sistema (OIE, 2008).

L. Secuenciación del virus de NC

Es el procedimiento que permite conocer base a base el contenido genético de un fragmento de ADN que se ha obtenido por PCR. En el proceso de secuenciación los productos de PCR son purificados, las dos hebras de ADN de cada producto son secuenciadas, siempre y cuando cumplan con los requisitos de calidad y concentración, luego las secuencias son analizadas y depuradas para posteriormente compararlas y alinearlas entre sí, de esta forma se analizan detalladamente en su región de clivaje y se determina si son cepas de alta o baja virulencia. Para visualizar los resultados obtenidos mediante la secuenciación se construyen arboles filogenéticos que serán un reflejo gráfico de los datos arrojados genéticamente por una secuencia. Esta metodología se usa para definir orígenes de los virus y relaciones filogenéticas de los mismos. Para la realización de esta prueba es determinante la calidad y concentración del producto que se va a secuenciar (ICA, 2009).

M. Prueba de Inhibición de la hemaglutinación HA

El procedimiento para las prueba HA se emplea placas de microtitulación de plástico y fondo en V en las que el volumen final para ambos tipos de prueba es de 0,075 ml. Los reactivos necesarios para esta prueba son PBS isotónico (0,1 M), pH 7,0–7,2, y RBC procedentes de un mínimo de tres pollos SPF y agrupados en un volumen igual de solución de Alsever. (Si no se dispone de pollos SPF, se puede emplear sangre procedente de aves no vacunadas que se controlen regularmente y muestren estar libres de anticuerpos frente al virus de NC). Las células se deberían lavar tres veces en PBS antes de usarlas como suspensión al 1% (células empacadas v/v). Debería realizarse en cada prueba, de modo apropiado, un control positivo y negativo de los antígenos y de los antisueros (OIE, 2008).

N. Prueba de Inhibición de la hemaglutinación HI

Es una prueba rápida, sencilla y cuantitativa que puede medir los niveles de anticuerpos en la muestra al realizar diluciones dobles seriadas; los anticuerpos detectados son IgG e IgM, es decir permite una detección temprana de respuesta inmune, requiere para su ejecución de glóbulos rojos de aves que contengan el antígeno inactivado. El Paramixovirus se caracteriza por poseer proteínas de membrana o hemaglutininas, las cuales reaccionan con los glóbulos rojos del pollo hemaglutinándolos, esta característica es usada en la prueba como un método indicador de las reacciones Antígeno- Anticuerpo (ICA, 2009).

Es una técnica que se realiza en tres pasos: el primero consiste en la titulación del Antígeno de Newcastle; el segundo en el control de unidades hemaglutinantes (la OIE recomienda 4 UHA u 8UHA; cuando se utilizan 8UHA la prueba se hace más sensible y específica) y el tercer paso es la realización de la Inhibición de la Hemaglutinación con los sueros remitidos para el diagnóstico (ICA, 2009).

2.1.11. Diagnóstico Diferencial.

Tanto el virus como la enfermedad de Newcastle deben diferenciarse de la influenza aviar, pues este virus también hemoaglutina los glóbulos rojos de pollo y causa signos clínicos similares a los observados en la enfermedad de Newcastle. La forma lentogénica del Newcastle puede confundirse con otras enfermedades de tipo respiratorio como bronquitis infecciosa, micoplasmosis, pneumovirus, cólera aviar, laringotraqueitis (Villegas, P. 2015).

2.1.12. Prevención y Control

La prevención de la enfermedad se fundamenta en dos aspectos básicos: la bioseguridad y la vacunación. El control primario de la enfermedad se basa en evitar el ingreso de la infección a la granja, mediante la aplicación de medidas estrictas de bioseguridad (ICA, 2009).

2.1.12.1. Medidas Sanitarias

Ante la presencia de un brote de Newcastle, las medidas sanitarias a tomar son:

- Aislamiento estricto de brotes.
- Implementación de vacunas vivas y/o emulsionadas en futuros lotes.
- Destrucción de todas las aves infectadas o expuestas
- Limpieza a fondo y desinfección de las instalaciones.
- Desecho adecuado de cadáveres.
- Control de plagas que puedan diseminar la enfermedad.
- Despoblar instalaciones y dejarlas libres por 21 días.
- Evitar contacto con aves de procedencia desconocida.
- Control del tráfico humano.

(Hein, R. 1986; Dufour, L. 1994; Blaha, T. 1995;)

2.1.13. Profilaxis.

2.1.13.1. Vacunas de virus vivos.

En general las vacunas vivas contra la enfermedad de Newcastle provienen de cepas de virus lentogénicos y mesogénicos. Entre los diversos tipos de vacunas vivas, las más utilizadas son las que poseen las cepas Hitchner B1 o La Sota. Estas son utilizadas en áreas donde el virus de Newcastle de alta patogenicidad está altamente difundido, por lo que se hace necesario mantener niveles elevados de anticuerpos como acción preventiva (Briseño, 2011).

O. Cepas Lentogénicas

- **Cepas F**

Las vacunas de las cepas F tienen la más baja virulencia de las lentogénicas comunes. Son más efectivas cuando una parvada se vacuna individualmente (Briseño, 2011).

- **Cepa B1 (Hitchner).**

Es ligeramente más efectiva que la cepa F. Por lo general, se da en el agua de bebida o por el método de aerosol. Puede proporcionarse al día de edad pero después debe ser seguida por una vacuna del tipo La Sota a los 10 ó 14 días de edad (Briseño, 2011).

- **Cepa La Sota**

Es la más utilizada. El método del aerosol es la vía usual de la administración temprana, la cepa es particularmente adaptable a la primera vacunación o la revacunación, pero se debe tener cuidado porque estas vacunas varían en su virulencia. También puede aplicarse al agua, los pollitos pueden ser vacunados entre el día 1 y 4, pero al retrasar la vacunación hasta la segunda o tercer semana incrementa su eficiencia. Las vacunas mesogénicas pueden producir serios efectos clínicos sí se en aves que no han sido previamente inmunizadas (Briseño, 2011).

P. Cepas Mesogénicas

- **Cepa Mukteswar**

Esta cepa es particularmente patógena y debe usarse en aves que fueron vacunadas con lentogénicas (Briseño, 2011).

- **Cepas Roakin**

Son aislamientos que se han atenuado pero todavía muy virulentos. Se administra en el pliegue del ala. No puede aplicarse a pollitos jóvenes que llevan algún grado de inmunidad pasiva, es decir no antes de tres semanas, por lo que es mejor retrasar su uso hasta la octava semana (Hein, R. 1986; Villegas, P. 1990; Dufour, L. 1994; Ebako, G. 2003)

2.1.13.2. Vacunas Inactivadas

En muchos países se utilizan vacunas inactivadas para la inmunización de pollos de engorde al día de edad o en el control de la forma velogénica viscerotrópica. Son particularmente útiles especialmente en aves positivas a la infección con Micoplasmas, en las cuales las reacciones postvacunales pueden convertirse en un problema ante la administración de vacunas con virus respiratorios activos. Las vacunas inactivadas son parte ordinaria de los programas de vacunación para ponedoras comerciales y reproductoras. (Briseño, 2011).

2.2. Influenza Aviar

La influenza aviar es la enfermedad causada por la infección del virus de la influenza (gripe) aviar (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, 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, I. & Grimm, F. 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, A., Roth, J., Lofstedf, J., & Lenardón, M. V. 2010).

2.2.1. Sinonimia

- Peste aviar
- Gripe aviar

2.2.2. 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, 2016)

2.2.3. 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 (Alexander, D. J. 2000; Lupiani, B y Reddy, S. 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, D. 1998).

2.2.4. Etiología.

La influenza aviar se produce como resultado de virus que pertenecen a la especie influenzavirus A, género influenzavirus A y familia Ortomixoviridae. Estos virus también se denominan "virus de gripe tipo A"(CFSPH, 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, (β -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, F. 1992; Gylstorff, I. & Grimm, F. 1987)

2.2.4.1. 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, A., et al., 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, 2008).

2.2.4.2. 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, R. A. 1989)

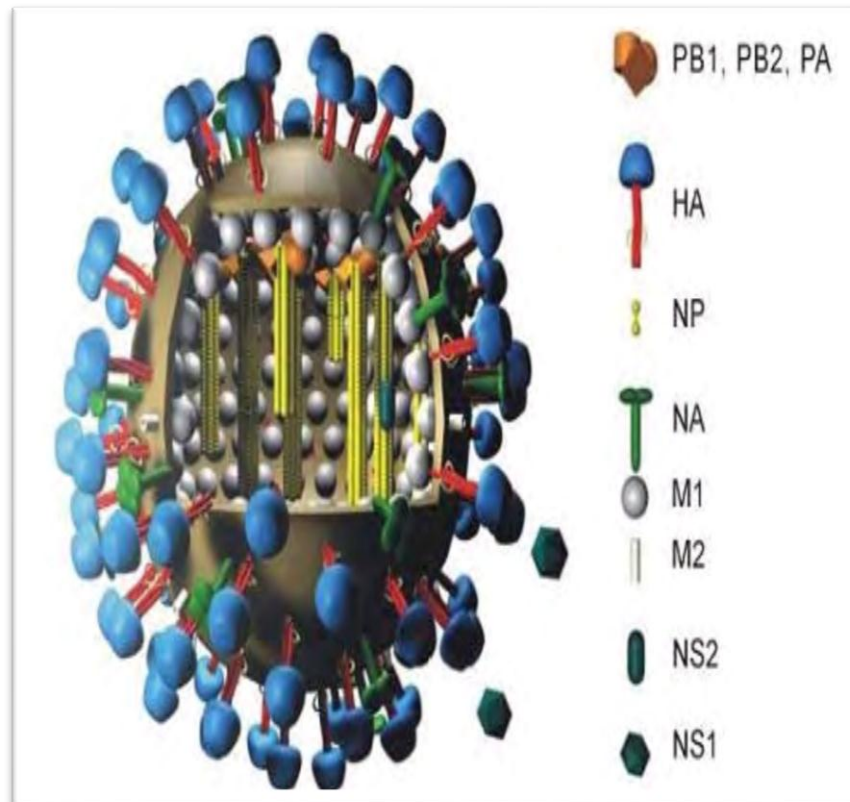


Figura 2. Estructura de un virus influenza tipo A¹. Imagen con copyright del Dr. Markus Eickmann, Institute for Virology, Marburg, Germany

- **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, M. 2010).

¹ <http://www.influenzareport.com/ir/virol.htm>

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, M. 2010).

- **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 et al., 1994)

2.2.5. Composición molecular del virus de Influenza.

Tabla 1. Composición molecular del virus de Influenza.

Segmento		
Génico	Polipéptido	Función
PB1, PB2 y PA	Componentes de la RNA polimerasa	Transcripción.
HA	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.
NP		Se asocia al RNA genómico.
NA	Neuraminidasa	Degrada el ácido siálico de las glicoproteínas y glicolípidos usados como receptores para la infección viral.
M	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.
NS		Desconocida

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

2.2.6. 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 (Martinez, I. L. 2014).

2.2.6.1. Patogenicidad del virus de IA

El gen HA es el principal determinante del cambio en la patogenicidad de los virus IA (Bosch et al., 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, et al., 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 y Halvorson, 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).

2.2.7. 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, 2016).

2.2.8. 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, 2016).

2.2.9. 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, B. 1995; Blaha, T. 1995; Altman, R 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 y Spacman, 1981; Sturm-Ramirez et al., 2005).

2.2.10. 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)

2.2.11. Diagnóstico

Son las mismas pruebas realizadas para detectar el virus de Newcastle, 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, 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, 2015).

2.2.11.1. 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 (ver el próximo párrafo) que funcionan mejor para la secuenciación completa del genoma (CDC, 2015).

En los últimos cinco años, los 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, 2015).

2.2.12. Diagnóstico 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).

2.2.13. 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, 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, 2015).

2.2.14. 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, 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 las vacunas basadas en el tipo A específico de la nucleoproteína no provee protección contra la enfermedad y mortalidad (Swayne, D. 1998).

Existen tres tipos de tecnologías disponibles en la actualidad:

- 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, D. 1998).

2.2.15. 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).

2.2.16. 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).

2.2.16.1. 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).

2.2.17. 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.

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).

2.2.18. Trabajos relacionados sobre el tema

Buendia E. R. (2014). Cuyo objetivo fue determinar la presencia del virus de la Enfermedad de Newcastle (PMAV-1) en patos de traspatio en dos provincias del departamento de Lima (Huaral y Huaura). Seiscientas muestras de hisopado cloacal de patos de traspatio fueron colectadas desde febrero hasta julio del 2012. Dichas muestras se analizaron mediante aislamiento viral en huevos embrionados SPF. La presencia del virus de Newcastle fue determinada por la actividad hemaglutinante del fluido alantoideo, y confirmada mediante la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación utilizando anticuerpos específicos. El total de las muestras analizadas en este estudio fueron negativas a la presencia del virus de la Enfermedad de Newcastle. La técnica de evaluación de riesgo mediante simulación de Monte Carlo (programa @Risk) indico que la probabilidad de encontrar el vENC en patos de traspatio fue de 0.1% con un intervalo de confianza de 0.004 a 0.6%. La prevalencia encontrada fue muy baja para considerar a estas aves como posible fuente de infección hacia las aves domésticas.

Valladares G. J. (2014). Cuyo objetivo de estudio fue evaluar la presencia del virus de Influenza Aviar en patos domésticos de crianza familiar en las provincias de Huaral y Huaura. Donde se colectaron 600 muestras de hisopado cloacal de patos domésticos de traspatio sin distinción de sexo o edad, las cuales fueron analizadas mediante aislamiento viral en huevos embrionados de pollo SPF. La presencia del virus de la Influenza Aviar fue determinada por la actividad hemaglutinante del fluido alantoideo, y confirmada mediante un kit de diagnóstico rápido, que utiliza anticuerpos monoclonales. El 100% (600/600) de las muestras analizadas fueron negativas al virus de Influenza Aviar en este estudio con una prevalencia determinística de 0%. Se concluyó que las aves incluidas en el muestreo no se encuentran infectadas con el virus de Influenza Aviar.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Materiales de Campo

- Mapa SIG
- 300 muestras de hisopado cloacales o heces aves traspatio incluido de riña
- Tubos UTM (medio de transporte universal)
- Hisopos
- Jeringas
- Guantes de látex descartables
- Cooler
- Libreta de campo

3.1.2. Materiales de Laboratorio

- Cajas Petri
- Tubos de ensayo
- Reactivos
- Mandil
- Guantes
- Muestras fecales
- Huevos embrionados SPF
- Gradillas
- Solución de Antibióticos
- Mechero
- Portaobjetos
- Placa de 96 wells fondo en U limpias
- Cubetas descartables
- Cabina de bioseguridad
- Cámara de flujo laminar tipo II
- Congeladora menos 80°C
- Kits para pruebas rápida de influenza

- Micropipeta hasta 200 μ l (tolerancia máxima admitida: 5 μ l)
- Micropipeta hasta 40 μ l (tolerancia máxima admitida: 0.4 μ l)
- Micropipeta hasta 1000 μ l (tolerancia máxima admitida: 10 μ l)
- Tips amarillos (hasta 200 μ l)
- Tips azules (hasta 1000 μ l)
- Pipeta pasteur plástica
- Agujas hipodérmicas
- Jeringas de 5 ml
- Centrifuga
- Ovoscopio
- Microscopio
- Incubadora
- Registros de laboratorio

3.1.3. Materiales de Oficina

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

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Delimitación del Área de Estudio

La provincia de Zamora Chinchipe está ubicada en la zona sur de la Región Amazónica Ecuatoriana, la capital de la provincia es Zamora. Su territorio es muy irregular debido a que en esta zona se estrechan las cordilleras Occidental y la oriental y se confunden con la cordillera del cóndor, se divide en los siguientes; Zamora, Chinchipe, Palanda, Yacuambi, Yantzaza, El Pangui, Nangaritza, Paquisha, Centinela del Cóndor (EcuRed. 2014).

Las características meteorológicas de la provincia de Zamora son las siguientes: **Altitud:** 1000 y 3000 msnm; **Temperatura:** 18° y 22°C; **Clima:** Tropical; **Humedad relativa:** 90 % (EcuRed. 2014).



Figura 3. Cantones de la provincia de Zamora Chinchipe²

² https://en.wikipedia.org/wiki/Zamora-Chinchipe_Province

3.2.2. Tamaño y Selección de la Muestra

Para el presente proyecto se trabajó con un total de 300 muestras de heces de aves de traspatio incluidas las de riña.

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 1% para influenza aviar, toda vez que la prevalencia de NC en la zona es igual a 9,85 % Villacís et al. (2015). Se determinó un tamaño muestral mínimo para una unidad muestral de al menos 298 muestras ($n = 298$). La fórmula usada fue:

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

$$n = \frac{\log 0,05}{\log (0,99)} = 298 (300)$$

Dónde:

n = número de muestras

p =prevalencia límite (1%)

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

α = confianza (0.05)

3.2.3. Variables

- Determinar la presencia del virus mediante aislamiento en huevos embrionados SPF de la enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar.
- Evaluar la patogenicidad de los virus
- Secuenciar las cepas aisladas para evaluar sus relaciones genéticas

3.2.4. Recopilación de la Información

En el presente estudio se desarrolló un trabajo de campo apoyado en un mapa de la provincia de Zamora Chinchipe donde se detalla los sitios de muestreo, junto con la aplicación de técnicas de laboratorio.

3.2.5. Establecimiento de Muestreo

Para el muestreo se obtuvo información del censo avícola del 2015 en el cual constan registros del lugar en donde existe avicultura. Esta información se subió a un programa para generar información especializada que trabaja con un software académico **ARCGIS** el cual es un Sistema de Información Geográfico. ArcMap es el programa de ArcGIS que se usó para crear y editar el mapa.

Una vez obtenido el mapa de toda la zona con humedales se realizó el cruzamiento con la capa de puntos o sitios de muestreo que para la zona 7 fueron 6150 sitios de muestreo. Empleando la opción de Spatial Join Location dentro del software ArcGIS quedaron alrededor de 816 puntos posibles que cumplen esta condición dentro de las tres provincias para lo cual en la provincia de Zamora Chinchipe se obtuvo un total de 78 puntos de muestreo y que dio como resultado el siguiente mapa.

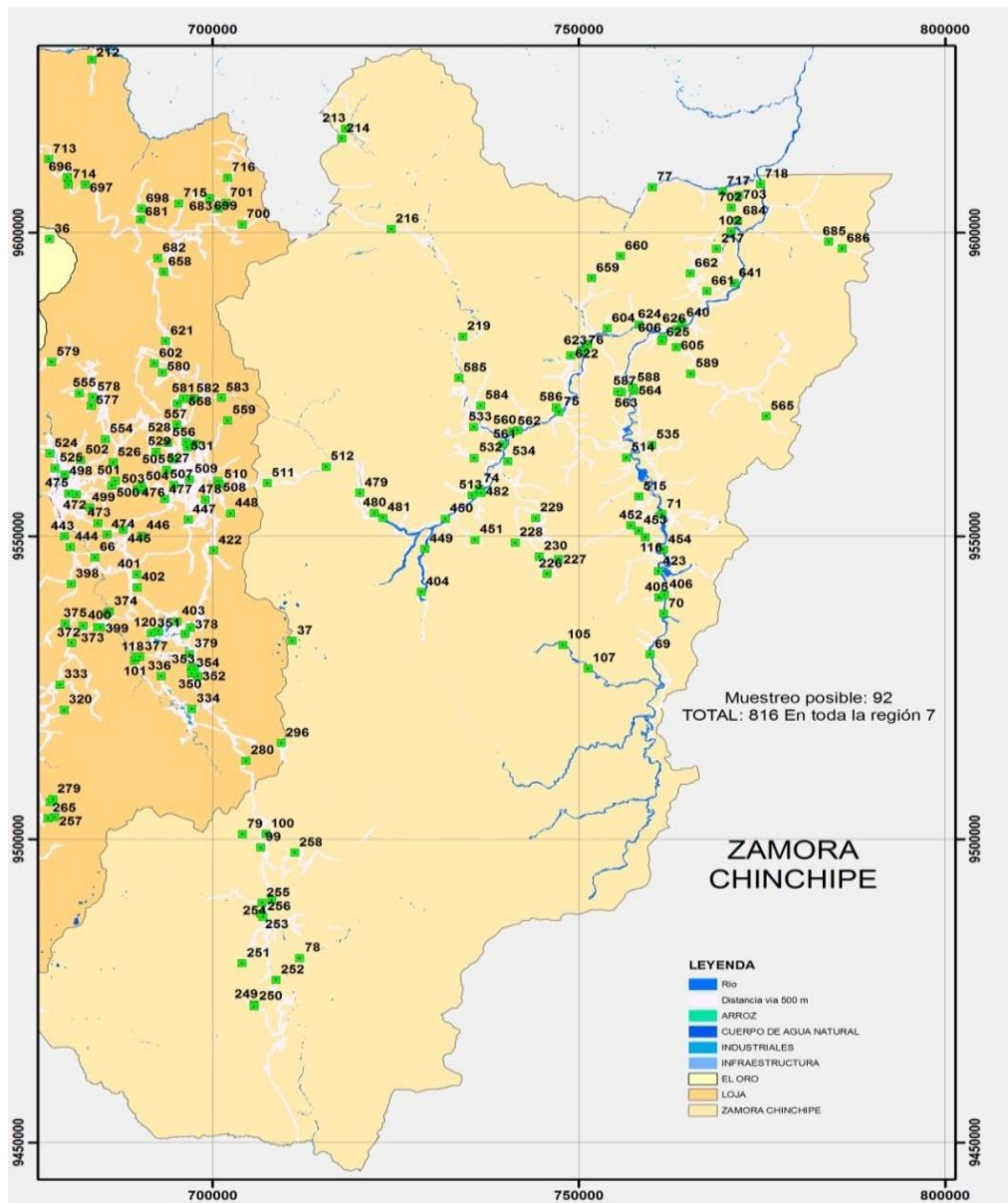


Figura 4. Mapa de distribución de sitios de muestreo en la Provincia de Zamora Chinchipe

Del mapa actual de la provincia se visto conveniente dividirlo en tres partes para facilitar la recolección de las muestras; zona norte, centro y sur, se descartaron puntos que se encuentran ubicados en zonas donde no hay población, para lo que se obtuvo el siguiente resultado.

Tabla 2. Zona norte de la provincia de Zamora Chinchipe

ZONA NORTE DE LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE			
N°	Cuadrante	Sitio de Muestreo	Lugar
1	747	585	Centro Shuara
2	828	219	Curiaca
3	948	216	La Hacienda
4	1104	213	Bastión
5	1073	214	Chucar Grande
6	790	622, 623, 603	Pita
7	832	604	la Yona
8	912	659	Guambime
9	913	660	El Oso
10	1039	77	La Argelia
11	833	624, 606, 625	Muchime, El Carmen, Correntada Larga
12	834	640,626	Pandi Bajo, La Zentza
13	793	605	Santa Lucia
14	751	587,563	El Triunfo
15	752	588,564	Los Almendros, Nueva Esperanza
16	876	661,641	El Pincho, Achuntza
17	915	662	Buena Fe
18	957	217	Machinaza Bajo, Recta del Panguí
19	999	702,703,717	La Palmira, La Troncal, Guisme
20	1042	718	Centro Shuar dePakit

Fuente: Investigación de Campo (Enero 2016)

Elaborado por: El Autor

Tabla 3. Zona centro de la provincia de Zamora Chinchipe

ZONA CENTRO DE LA PROVINCIA ZAMORA CHINCHIPE			
N°	Cuadrante	Sitio de Muestreo	Lugar
1	627	512	Sabanilla
2	628	479	Velo de Novia
3	586	480	Soñaderos, Fragancia
4	587	450	Pueblo Viejo
5	543	449	Jambue Bajo
6	557	404	Numbami Bajo
7	588	513	La Quebrada
8	544	451	Tzunantza Alto
9	631	74, 482	El Arenal
10	671	532	Namires Alto
11	672	534, 561	Namires Bajo, Chamico
12	590	229	Campanillas
13	545	228	Campamento Viejo
14	503	226, 230, 227	Via a Nambija
15	710	560,562	La Saquea
16	709	584	Guaguayme, El Progreso
17	712	75, 586	Zumbi
18	675	514	El Dorado
19	593	535	Paquisha
20	676	515, 71	Conhuime, sisan
21	549	452, 453, 116, 454,	Santa Elena
22	506	423	Pachicutza
23	463	406, 405, 70	La Guantza
24	378	69	Maycu

Fuente: Investigación de Campo (Enero 2016)

Elaborado por: El Autor

Tabla 4. Zona sur de la provincia de Zamora Chinchipe

ZONA SUR DE LA PROVINCIA ZAMORA CHINCHIPE			
N°	Cuadrante	Sitio de Muestreo	Lugar
1	143	79, 99	Barrio Central, Tambo Viejo
2	144	100, 258	Tápala
3	103	255, 253, 256	San Vicente, San Francisco
4	104	254	Valladolid
5	74	78	Las Juntas
6	59	249, 250	Guarimisal
7	60	252	Canadá, Tambo Viejo

Fuente: Investigación de Campo (Enero 2015)

Elaborado por: El Autor

Tabla 5. Resultado general de los tres sectores a muestrear

DIVISIÓN DEL MAPA DE MUESTREO	NÚMERO SITIOS DE MUESTREO	PORCENTAJE	NÚMERO DE MUESTRAS POR SECTOR
Norte	30	38,46	115
Centro	36	46,15	138
Sur	12	15,38	46
TOTAL	78	100%	299.99 MUESTRAS

Fuente: Investigación de Campo (Febrero 2016)

Elaborado por: El Autor

Se recolectaron entre tres y cuatro muestras por sector a muestrear.

3.2.6. Técnicas de Recolección de las Muestras de Heces

Las visitas a las viviendas donde se encontraban las aves de traspatio se realizaron a partir de las 8 am hasta las 3pm, con el fin de poder muestrear la mayor cantidad de viviendas. Una vez que se nos permitía el ingreso al predio, se procedía a la captura al azar del ave e inmediatamente se tomaba la muestra.

Las muestras fueron obtenidas por hisopado cloacal y en algunos casos muestras de heces frescas del suelo, estas fueron depositadas en tubos UTM. Las muestras fueron posteriormente homogenizadas, rotuladas adecuadamente e introducidas en una caja térmica con gel refrigerante para su conservación a 4°C para luego ser llevadas al laboratorio de la Universidad Nacional de Loja, una vez finalizado el muestreo todas las muestras fueron transportadas utilizando el procedimiento de conservación para luego ser analizadas en la Universidad Mayor de San Marcos de Lima en el laboratorio de Patología Aviar.

3.2.7. Análisis de Laboratorio

Los análisis de laboratorio se realizaron utilizando las siguientes técnicas:

3.2.7.1. Preparación de las Muestras

Se homogenizan las muestras individualmente por 15 segundos. Se colecta 500 ul de cada muestra para formar grupos de 10 muestras, haciendo un volumen total de 5 ml aproximadamente por grupo, rotulándose cada uno con el código correspondiente se centrifuga los tubos conteniendo las muestras a 1000 g por 10 minutos los tubos retiran de la centrífuga cuidadosamente y se colecta el sobrenadante en otro correctamente rotulado. Una vez colectado el sobrenadante se aplica una solución de antibiótico en un volumen de 0.05 ml de penicilina - estreptomina al 20 % por ml de muestra se incubaron las muestras de 2 a 3 horas a 4 °C. Se procede a recolectar las muestras en jeringas individuales estériles para posteriormente ser filtradas, para lo cual se

utilizaron filtros millipore de 0.22 μm , 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.

3.2.7.2. Aislamiento del virus de NC e IA en huevos SPF

- Se requiere huevos embrionados de 9-11 días
- 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 al 70% en la parte donde se va a inocular).
- Agujerear el cascarón con un taladro (dependiendo de dónde se vaya a inocular).
- Inoculamos 0,8ml del sobrenadante de la muestra.
- Tapamos el agujero con parafina (o cera de vela).
- Incubar los huevos inoculados a 33-34°C por 2-3 días.
- Controlar, observar dos veces al día, para percatarse si están vivos o muertos.
- Evaluación de la actividad hemo- aglutinante del fluido alantoideo

3.2.7.3. Cosecha de los líquidos amniótico y alantoideo

- Colocar los huevos inoculados a 4°C durante toda la noche.
- Rotular un tubo de 15 ml por cada huevo con el número de la muestra inoculada.
- Desinfectar los huevos con alcohol de 70%
- Romper y remover la cáscara del huevo en la cámara de aire usando pinzas estériles.
- Remover la membrana alantoidea.

- Aspirar el líquido alantoideo usando una pipeta de 10 ml y transferirlo al tubo de 15 ml previamente rotulado.
- Centrifugar los líquidos cosechados a 3.000 rpm por 5 minutos para remover exceso de sangre o tejido
- Evaluar el crecimiento viral usando la técnica de hemaglutinación (HA)

3.2.8. Prueba serológicas para los virus de NC e IA

3.2.8.1. Prueba de Hemaglutinación (HA)

- Se distribuyen 25 ul de PBS en todos los pocillos de una placa de microtitulación de plástico y fondo en U.
- A la primera fila de los pocillos se añaden 25 ul de la suspensión vírica (es decir, líquido alantoideo infectivo o inactivado).
- A lo largo de toda la placa se practican diluciones (96 pocillos)
- Luego en cada pocillo se dispensan 25 ul de solución de glóbulos rojos.
- La solución se mezcla golpeando suavemente la placa. Se dejan reposar los eritrocitos durante unos 40 minutos 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 HA completa, esto representa 1 unidad HA (HAU) y puede calcularse de forma precisa a partir del rango inicial de diluciones.

3.2.8.2. Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI)

- Se dispensan 0,025 ml de PBS en cada pocillo de una placa de microtitulación de plástico y fondo en V.
- Se adicionan 0,025 ml de suero en el primer pocillo de la placa.
- A lo largo de la placa se realizan diluciones dobles del suero en volúmenes de 0,025 ml.
- A cada pocillo se añaden 4 HAU de virus/antígeno en 0,025 ml y la placa se deja durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente, p. ej. en torno a 20°C, o 60 minutos a 4°C.

- A cada pocillo se añaden 0,025 ml de RBC de pollo al 1% (v/v) y, después de mezclar suavemente, los RBC se dejan estáticos unos 40 minutos a temperatura ambiente, p. ej. en torno a 20°C, o durante unos 60 minutos a 4°C si las temperaturas del ambiente son altas, considerando que los RBC control deberían sedimentar de una forma distinta.
- El título de HI es la dilución mayor de suero que causa la inhibición completa de 4 HAU de antígeno. La aglutinación se valora inclinando las placas. Debería considerarse que muestran inhibición solo aquellos pocillos en los que la corriente de RBC se produce a la misma velocidad que los pocillos control (que contienen 0,025 ml de RBC y 0,05 ml de PBS).
- La validez de los resultados debería evaluarse frente a un suero control negativo, que no debería presentar un título $>1/4$ (>22 o $>\log_2 2$ cuando se expresa como el recíproco), y un suero control positivo para el cual el título debería encontrarse entre una de las diluciones del título conocido.

3.2.9. Pruebas de patogenicidad para los virus de NC e IA

3.2.9.1. Tiempo medio de muerte en huevos para el virus de NC e IA

- 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).
- El virus de Newcastle causa la muerte del embrión y ocasiona lesiones hemorrágicas en cabeza y membranas.
- El virus de la influenza provoca la muerte del embrión y ocasiona hemorragias en los líquidos y membranas corioalantoidea o tejidos embrionarios

3.2.9.2. Índice de patogenicidad intracerebral para el virus de NC

- 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.

3.2.9.3. Índice de patogenicidad intravenosa para los virus de NC e IA

- 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.

3.3. Procesamiento de la Información

3.3.1. Tabulación

Se procedió a ordenar y clasificar los resultados obtenidos mediante la elaboración de tablas y cuadros estadísticos utilizando “epiR”.

3.3.2. Análisis e Interpretación

Las prevalencias se expresaron con intervalos de confianza del 95%. Los intervalos de confianza se calcularon utilizando el programa estadístico “R” aplicando el paquete “epiR” versión 09-79.

3.3.3. Presentación de resultados

Los resultados de este trabajo los mismos que se presentaran de acuerdo a los objetivos y variables planteadas.

4. RESULTADOS

Se determinó la presencia o ausencia del virus de Newcastle e Influenza Aviar, en aves de traspatio mediante el aislamiento viral en huevos embrionados SPF y confirmada mediante pruebas de hemoaglutinación, a partir de 300 muestras de hisopado cloacal colectadas en la provincia de Zamora Chinchipe se obtuvo los siguientes resultados.

4.1. Prevalencia de los virus de Newcastle e Influenza Aviar

Tabla 6. Prevalencia de los virus de NC e IA en aves de traspatio en la provincia de Zamora Chinchipe

Prevalencia del virus de NC e IA en aves de traspatio en la provincia de Zamora Chinchipe			
ZONAS	NÚMERO TOTAL DE MUESTRAS	POSITIVAS	PREVALENCIA (IC 95% \Rightarrow)
Norte	115	0	0 (0 - 3.10)
Centro	139	0	0(0-2,57)
Sur	46	0	0(0-6,91)
Total	300	0	0 (0 - 1,19)

Fuente: “epiR” versión 09-79.

Elaborado por: El Autor

En el zona norte todas las muestras (**tabla seis**) fueron negativas con un intervalo de confianza del 95% con un rango de prevalencia del (0-3,10%). En la zona centro todas las muestras resultaron negativas con un intervalo de confianza 95% con un rango de prevalencia del (0-2,57%). En el zona sur todas las muestras son negativas con un intervalo de confianza del 95% con un rango de prevalencia del (0-6,91%).

4.2. Presencia de los virus de Newcastle e Influenza Aviar mediante aislamiento en huevos embrionados SPF y confirmada mediante hemaglutinación (HA).

4.2.1. Aislamiento de los virus de Newcastle e Influenza Aviar en aves de traspatio en la provincia de Zamora Chinchipe.

Tabla 7. Aislamiento de los virus de NC e IA en aves de traspatio, por zonas en la provincia de Zamora Chinchipe

ZONAS	TOTAL DE MUESTRAS	POOLS	HUEVOS INOCULADOS	HA+
Norte	115	11	33	0
Centro	139	14	42	0
Sur	46	5	15	0
Total	300	30	90	0

Elaborado por: El Autor

En la **tabla siete** se presentan el número de muestras por cada zona de estudio, pools analizados y el número de huevos embrionados SPF que se utilizaron. En la zona norte se colectaron 115 muestras de aves en las cuales se analizaron 11 pools utilizando 33 huevos SPF. En zona centro se presenta el mayor número de muestras colectadas con una cantidad de 139, de las cuales se analizaron 14 pools y se utilizaron 42 huevos SPF. En la zona sur se colectaron 46 muestras y se analizaron cinco pools e utilizando 15 huevos SPF.

4.2.2. Presencia de los virus de Newcastle e Influenza Aviar en la zona norte de la provincia de Zamora Chinchipe

Tabla 8. Resultados del aislamiento viral en huevos SPF y prueba de HA en la zona norte de la provincia de Zamora Chinchipe

AISLAMIENTO VIRAL EN HUEVOS SPF Y PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN HA				
Cantón	Sector o sitio de Muestreo	Muestras Analizadas	Positivos ENC/IA	Tipo de Aves
Zamora	Centro Shuara	4	0/0	Gallinas Criollas
Yacuambi	Curiaca	4	0/0	Gallos de Pelea
Yacuambi	LaHacienda	4	0/0	Gallos criollos
Yacuambi	Bastión	4	0/0	Gallinas Criollas
Yacuambi	Chucar Grande	4	0/0	Pollos Broiler
Yantzaza	Pita	12	0/0	Gallos de Pelea
Yantzaza	la Yona	4	0/0	Pollos Broiler
Yantzaza	Guambime	4	0/0	Gallinas Criollas
Yantzaza	El Oso	4	0/0	Gallinas Criollas
El Pangui	La Argelia	4	0/0	Gallinas Criollas
Yantzaza	Muchime, El Carmen, Correntada Larga	12	0/0	Gallinas Criollas
Yantzaza	Pandi Bajo, La Zentza	8	0/0	Gallinas Criollas
Yantzaza	Santa Lucia	4	0/0	Gallinas Criollas
Centinela del Condor	El Triunfo	8	0/0	Gallos de Pelea
Yantzaza	Los Almendros, Nueva Esperanza	8	0/0	Pollos Broiler
Yantzaza	El Pincho, Achuntza	8	0/0	Pollos Broiler
El Pangui	Buena Fe	4	0/0	Gallinas Criollas
El Pangui	Machinaza Bajo, Recta del Pangui	4	0/0	Gallinas Criollas
El Pangui	La Palmira, La Troncal, Guisme	8	0/0	Gallinas Criollas
El Pangui	Centro Shuar de Pakit	3	0/0	Gallinas Criollas
TOTAL		115	0/0	

Elaborado por: El Autor

En tabla ocho la mayoría de las muestras colectadas fueron de pollos broiler criados a traspatio, aves criollas, animales de lidia, no se colectaron en esta zona otras especies de aves como pavos, gansos y patos siendo un total de 115 muestras recolectadas en los distintos cantones y sitios de muestreo de la zona norte de la provincia de Zamora Chinchipe, se realizó la inoculación en

embriones de huevos SPF embrionados de 9 a 11 y se analizaron mediante la prueba de hemoaglutinación HA siendo todas negativas al virus de NC e IA al no aglutinar, por lo que no se realizó la prueba de HI.

4.2.3. Presencia de los virus de Newcastle e Influenza Aviar en la zona centro de la provincia de Zamora Chinchipe

Tabla 9. Resultados del aislamiento viral en huevos SPF y prueba de HA en la zona centro de la provincia de Zamora Chinchipe

RAISLAMIENTO VIRAL EN HUEVOS SPF Y PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN HA				
Cantón	Sector o sitio de Muestreo	Muestras Analizadas	Positivos ENC/IA	Tipo de Aves
Zamora	Sabanilla	4	0/0	Gallinas Criollas
Zamora	Velo de Novia	4	0/0	Gallinas Criollas
Zamora	Soñaderos, Fragancia	4	0/0	Gallinas Criollas
Zamora	Pueblo Viejo	4	0/0	Gallinas Criollas
Zamora	Jambue Bajo	4	0/0	Gallos Criollos
Zamora	Numbami Bajo	4	0/0	Gallinas Criollas
Zamora	La Quebrada	4	0/0	Pollos Criollos
Zamora	Tzunantza Alto	4	0/0	Gallinas Criollas
Zamora	El Arenal	8	0/0	Gallos de Pelea
Zamora	Namires Alto	4	0/0	Pollos Criollos
Zamora	Namires Bajo, Chamico	8	0/0	Gallos de Pelea
Zamora	Campanillas	4	0/0	Gallos Criollos
Zamora	Campamento Viejo	4	0/0	Gallos de Pelea
Zamora	Via a Nambija	12	0/0	Pollos Broiler
Zamora	La Saquea	8	0/0	Gallinas Criollas
Zamora	Guaguayme, El Progreso	4	0/0	Gallos Criollos
Centinela del Condor	Zumbi	8	0/0	Pollos Criollos
Paquisha	El Dorado	3	0/0	Gallinas Criollas
Zamora	Paquisha	4	0/0	Gansos
Paquisha	Conhuime, sisan	8	0/0	Patos
Paquisha	Santa Elena	12	0/0	Gallinas Criollas
Paquisha	Pachicutza	4	0/0	Gallos Criollos
Paquisha	La Guantza	12	0/0	Pollos Criollos
Paquisha	Maycu	4	0/0	Gallinas Criollas
	TOTAL	139	0/0	

Elaborado por: El Autor

Según las muestras colectadas la mayoría (tabla nueve) son de aves criollas, animales de lidia, pollos broiler, patos y gansos siendo un total de las 139 muestras recolectadas en los distintos cantones y sitios de muestreo de la zona centro de la provincia de Zamora Chinchipe, se realizó el aislamiento de los virus en huevos SPF embrionados de 9 a 11 y se analizaron mediante la prueba de hemoaglutinación HA siendo todas negativas al virus de NC e IA al no aglutinar, por lo que no se realizó la prueba de HI.

4.2.4. Presencia del virus de NC e IA en la zona sur de la provincia de Zamora Chinchipe

Tabla 10. Resultados del aislamiento viral en huevos SPF y prueba de HA en la zona sur de la provincia de Zamora Chinchipe

RESULTADO DE LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN HA				
Cantón	Sector o sitio de Muestreo	Muestras Analizadas	Positivos ENC/IA	Tipo de Aves
Palanda	Barrio Central, Tambo Viejo	8	0/0	Gallinas Criollas
Palanda	Tápala	7	0/0	Pollos broiler
Palanda	San Vicente, San Francisco	12	0/0	Gallos de Pelea
Palanda	Valladolid	4	0/0	Gallos de Pelea
Palanda	Las Juntas	4	0/0	Gallos de Pelea
Chinchipe	Guarimisal	7	0/0	Gallinas Criollas
Chinchipe	Canadá, Tambo Viejo	4	0/0	Gallos de Pelea
TOTAL		46	0/0	

Elaborado por: El Autor

Como se observa en la tabla anterior (**tabla diez**) la mayoría son de pollos broiler criados en traspatio, aves criollas, animales de lidia, no se colectaron en esta zona otras especies de aves como pavos, gansos y patos siendo un total de 46 muestras recolectadas en los distintos cantones y sitios de muestreo de la zona sur de la provincia de Zamora Chinchipe, se realizó la inoculación en embriones de huevos SPF embrionados de 9 a 11 y se analizaron mediante

la prueba de hemoaglutinación HA siendo todas negativas al virus de NC e IA al no aglutinar, por lo que no se realizó la prueba de HI.

4.3. Determinación de la patogenicidad de los virus

No se la realizó debido a que ninguna muestra fue positiva a la presencia de estos virus.

4.4. Secuenciación de las cepas aisladas para evaluar sus relaciones genéticas

No se pudo realizar debido a que ninguna muestra analizada dio resultado positivo a los virus de NC e IA.

5. DISCUSIÓN

5.1. Presencia del virus mediante aislamiento en huevos embrionados SPF de la enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar.

El 100% de las muestras analizadas mediante huevos embrionados SPF y confirmadas con pruebas de hemoaglutinación HA, provenientes de hisopados cloacales de aves de traspatio en la provincia de Zamora Chinchipe, fueron negativas al virus de Influenza Aviar y Newcastle dando una prevalencia del 0% con intervalos de (0 - 1,19)%. Durante el aislamiento viral, tampoco se detectaron muerte o lesiones en los embriones inoculados con las muestras de hisopados cloacales estos resultados están de acuerdo con lo que indican Buendía E. R., (2014) y Valladares J., (2015) que la prevalencia de los dos virus puede estar presente en menos del 1% en aves de crianza de traspatio.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que los virus no estuvieron presentes en aves de traspatio en la provincia de Zamora Chinchipe. Sin embargo Valladares J., (2015) señala que es posible que exista la posibilidad de que no coincidiera el tiempo de la historia natural de la enfermedad y no hubo presencia viral en el periodo en el que se realizó la toma de muestras o que no se haya logrado aislar el virus debido a una baja carga de eliminación viral.

Igualmente en un estudio realizado por Buendía E. R., (2014) donde se evalúa la presencia del virus den NC en patos de traspatio donde algunas muestras fueron positivas para HA; sin embargo, posteriormente a la prueba de HI fueron negativas. Si bien es cierto que el estudio realizado no demostró la presencia del virus en patos de traspatio, se obtuvieron muestras positivas a la hemaglutinación. En patos existen otros virus con propiedades hemaglutinantes, habiéndose descrito algunos (PMAV-4,-6 y -9) y también es común la infección subclínica con el adenovirus causante del Síndrome de Baja de Postura.

Durante el muestreo todas las aves analizadas fueron aparentemente sanas y algunas manifestaron signos clínicos compatibles con las enfermedades pero al realizar el análisis de laboratorio no se demostró que haya existido la presencia de estos virus.

Aunque las muestras analizadas en el presente estudio fueron negativas a la presencia del virus de Influenza Aviar y Newcastle, esta zona debe ser monitoreada mediante serología para determinar si existe pasaje viral y orientar de mejor manera la búsqueda de estos virus.

5.2. Determinación de la patogenicidad de los virus

No se la realizó debido a que ninguna muestra fue positiva a la presencia de los virus de NC e IA.

5.3. Secuenciación las cepas aisladas para evaluar sus relaciones genéticas

La técnica RT-PCR permite secuenciar las cepas de los virus de NC e IA y así determinar si son de alta patogenicidad o baja patogenicidad, pero no se realizó debido a que ninguna muestra analizada fue positiva.

6. CONCLUSIONES

- Se analizaron 300 muestras de hisopados cloacales de varias especies aviarias de traspatio, la prevalencia estimada fue de 0% con un intervalo de confianza del 95% con un rango de 0 a 1.19%.
- Las aves incluidas en el muestreo no se encontraban infectadas con el virus de Influenza Aviar y Newcastle en el periodo de recolección de las muestras, (Enero-Febrero 2016) en base al aislamiento en huevos embrionados SPF y confirmadas con pruebas de hemoaglutinación (HA).
- Un factor importante para que no exista la presencia de estos virus en aves de traspatio en la provincia de Zamora Chinchipe, es que en la zona hay poca cantidad de avicultura comercial y los lugares donde existe se encuentran muchos de ellos en aislamiento, punto importante en el proceso de bioseguridad en el proceso de transmisión de agentes infecciosos.

7. RECOMENDACIONES

- Es necesario realizar monitoreos serológicos permanentes en las zonas de estudio y así verificar que exista la presencia del virus de Newcastle e Influenza Aviar ya que estas enfermedades causan grandes pérdidas en la producción avícola y en la salud pública.
- Para garantizar el éxito de diagnóstico de laboratorio se debe evitar las variaciones de temperatura durante el transporte y conservación de las muestras.

8. BIBLIOGRAFIA

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

Aguirre, M. (2010). Aislamiento del virus de Influenza aviar en pierna 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.

Alexander D, Morris H, Pollitt W; Sharpe C; Eckford R; Sainsbury R, Mansley L, Gough R, Parsons G. 1998. Newcastle disease outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997. *The Veterinary Record*, 143:209-212.

Alexander, D. J. (1997). Newcastle diseases and other avian Paramyxoviridae infections. *Diseases of Poultry*. 10 ed. Edited by B.W. Calnek with H. J. Barnes; C.W. Beard; L. R. Mc Dougald; Y. M. Saif. pp. 541-569

Alexander, D.J. & Spackman, D. (1981). Characterisation of influenza A viruses isolated from turkeys in England during March-May 1979. *Avian Pathology*, 10, 281-93.

Alexander, D.J. (2000). A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*, 74, 3-13.

Alexander, D.J. (2001). Newcastle disease. *British Poultry Science*, 42:5-22. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1080/713655022>

Alexander, D. J. (2003). Newcastle Disease. *Diseases of Poultry*. 11th edition, 64-87, ed. Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., Mc Dougald, L. R. y Swayne, D.E. Ames, Iowa: Iowa State Press

Altman, R.; Clubb, S.; Dorrestein, G.; Quesenberry, K.(1997). *Avian Medicine and Surgery*. Pennsylvania, EEUU, Saunders. 1070 p. (Serie veterinaria)

Arenas R. M. (2003). Determinación de anticuerpos séricos contra las enfermedades de Newcastle e Influenza Aviar en aves de traspatio circundantes a una granja avícola tecnificada en cuilapa, santa rosa, y la relación de ambas. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Medicina Veterinaria.

Blaha, T. (1995). Epidemiología Especial Veterinaria. Trad por Jaime Esaín Escobar. Zaragoza, España, Acribia. 529 p. (Serie Ciencias Veterinarias)

Bosch F, Orlich M, Klenk D, R Rott. (1979). The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology* .95: 197-207

Briseño, M.A. (2011). Newcastle – Prevención y Control [en línea] Recuperado el 3 marzo de 2012.

Buendía E. R. (2014). Detección del virus de la enfermedad de Newcastle en patos criollos (*Cairina moschata*) de traspatio. *cybertesis*.

Calnek, B. (1995). Enfermedades de las Aves. México, DF, El Manual Moderno. 1147 p. (Serie Veterinaria)

CDC. (27 de Abril de 2015). Virus de la influenza aviar A (H5N1) altamente patógena de origen asiático. Obtenido de <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/avianflu/h5n1-virus.htm>

CFSPH. (2008). Enfermedad de Newcastle. The Center for food security & public health. Iowa State University

CFSPH. (2016). Influenza aviar. The Center for food security & public health Iowa State University

Copan. (2004). Universal Transport Medium. Copan UTM-RT System. Disponible en http://www.copanusa.com/files/9214/2489/1963/UTM-RT_Flocked_Polyester_Swabs.pdf

Cué, G. S. (2011). Epidemiología y control de la enfermedad de Newcastle

Cuello, S., Armando, V., & Julia, N. (2011). Actualización sobre la enfermedad de Newcastle. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria, 1695, 7504.

Dufour, L. (1994). Control de la enfermedad de Newcastle en el Mundo. Quinto Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar (1994, Athens, GA). Seminario de actualización de patología y producción aviar.

Easterday B, Hinshaw V, Halvorson D. 1997. Influenza. En: Calnek B.W, eds. Diseases of Poultry, 10a ed. IowaState University Press: Ames, IA. p 583–605.

EcuRed. (2014). Provincia de Zamora Chinchipe.

Ebako, G. 2003. Exotic Newcastle Disease : Nebraska Poultry Producers Quick Reference. Nebraska University, Lincoln, NE (en línea). Consultado 4 de Junio 2003.

Fenner, F. (1992). Virología Veterinaria. Zaragoza, España, Acribia. 691 p. (Serie Veterinaria)

García-Barreno, B., Delgado, T., & Melero, J. A. (1996). Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. Journal of virology, 70(2), 801-808.

García-Sastre, A., Cabezas, J. A. y Villar, E. (1989). Proteins of Newcastle disease virus envelope: interaction between the outer hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein and the inner non-glycosylated matrix protein. Biochim. Biophys. Acta 999:171-175.

Gerlach H. (1994). Disease etiologies: Viruses. En Avian Medicine: Principles and applications. Section five. B.W. Ritchie; G. J. Harrison; L.R. Harrison (eds). Florida, Wingers Publishing Inc. 920-929 p.

Glickman, R.L., Syddall, R.J., Iorio, R.M., Sheehan, J.P., Bratt, M.A., (1988). Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the

fusión glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *J. Virol.* 62, 354-356.

González A. (1986). Presencia de anticuerpos de influenza en aves. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Univ Nac Mayor de San Marcos. 36 p

Gylstorff, I.; Grimm, F. (1987). Vogelkrankheiten. Stuttgart, Alemania, UTB Grosse Reihe. 609 p. (Serie Veterinaria)

Hein, R. (1986). Evaluación de Programas de Vacunación Contra la Enfermedad de Newcastle para Pollo de Engorde, Reproductoras y Ponedoras, en Areas Endémicas de la Enfermedad. In Segundo Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar (1986, Athens, GA). Seminario de actualización de patología y producción aviar. UGA. 1 disco compacto, 8 mm.

ICA. (2009). Guía para la prevención, control y erradicación de la enfermedad de Newcastle. Colombia: Produmedios.

Lamb, R.A. (1989). Genes and proteins of the influenza viruses. In Krug, R.M., Fraenkel-Conrat, H. & Wagner, R.R. (Eds.), *The influenza viruses* (pp. 1-88). Plenum Press, New York.

Lamb, R.A., D. Kolakofsky. (1996). Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley y col. (ed.). *Fields Virology*. Third ed. Lippincott- Raven Publishers, E.U.A.

Leyva, J. R., Espinosa, B., Santos, G., Zenteno, R., Hernández, J., Vallejo, V., & Zenteno, E. (1999). Purification and characterization of the hemagglutinin-neuraminidase of Porcine rubulavirus LPMV. *Glycoconjugate journal*, 16(9), 517-522.

Leyva, J. R., Santos, G., Hernández, J., Espinosa, B., del Tránsito Borraz, M., Ramírez, H., ... & Zenteno, E. (2002). Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el Rubulavirus Porcino. *Mensaje Bioquímico*, 26.

- López M. I. (2015).** Influenza, Influenza A (H1N1), Influenza A (H7N9). Laboratorio de Virus Respiratorios, InDRE. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México.
- Lupiani, B. & Reddy, S.M. (2009).** The history of avian influenza. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32, 311-323.
- Maclachlan, J. & Dubovi, E. (2011).** *Fenner's Veterinary Virology*. (4th Ed.). Londres: Editorial Elsevier
- Martinez, I. L. (2014).** 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.
- Murphy, F.A.; Gibbs, E.P.J.; Horzinek, M.C. y Studdert, M.J. (1999).** Paramyxoviridae. In: *Veterinary Virology*, Chapter 26, 3ra. Ed. Academic Press, Inc., pp 405-458.
- OIE, (2008).** Manual OIE sobre animales terrestres 2008. Enfermedad de Newcastle.
- OIE, (2012).** Enfermedad de Newcastle (Infección por el Virus de la Enfermedad de Newcastle). Manual Sobre Animales Terrestres 2012.
- OIE. (2004).** Newcastle disease. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 5ta ed.
- OIE. (2008).** Terrestrial Animal Health Code 2008. Chapter 10.4. Avian Influenza.
- Panda, A.; Huang, Z.; Elankumaran, S.; Rockemann, D.D. y Samal, S.K. (2004).** Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microbial Pathogenesis*, 36(1):

Rovid, A., Roth, J. A., Galyon, J., Lofstedt, J., & Lenardón, M. V. (2010). Enfermedades emergentes y exóticas de los animales . E.E.U.U.: Center for food security and public health.

Sánchez, L. (2006). Huevos fértiles SPF: Una Eficaz Herramienta para la Investigación de Enfermedades de las Aves. Noticias UACH.

Santos-López, G., Hernández, J., Borraz-Argüello, M. T., Ramírez-Mendoza, H., Vallejo, V., & Reyes-Leyva, J. (2004). Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del Rubulavirus porcino. Archivos de medicina veterinaria, 36(2), 119-136.

Serna, D. (29 de agosto 2011). Newcastle. Sanidad Avícola. Recuperado de <http://nutriserna.blogspot.com/2011/08/newcastle.html>

Shane, S. (2005). ASA Handbook on Poultry Disease. (2nd Ed.). St. Louis: Editorial American Soybean Association.

Sturm-Ramirez, K. M., Hulse-Post, D. J., Humberd, J., Seiler, P., Govorkova, E. A., Krauss, S., ... & Long, H. T. (2005). Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(30), 10682-10687.

Suarez G. (2006). Historia natural de la influenza aviar o gripe del pollo: análisis sanitario actual y prospectivo. En: Grisolia S, eds. La gripe aviaria: un reto de salud pública. España: Ed. de la Univ.de Castilla-La Mancha. p 23

Swayne, D. (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

Swayne D, Halvorson D. (2008). Influenza. En: Saif YM, eds. Diseases of Poultry, 12a ed. Estados Unidos, Iowa: Blackwell Publishing. p 153-174

Teng, M. N., & Collins, P. L. (1998). Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. *Journal of virology*, 72(7), 5707-5716.

Valladares J. (2015). Detección del virus de influenza aviar en patos domésticos de crianza familiar en las provincias de Huaral y Huaura. *cybertesis*.

Velásquez F. y Gil López R. (2016). Técnicas diagnósticas para la enfermedad de Newcastle en aves de producción. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia

Villacís R. G., Escudero S. G., Cueva C. F., Luzuriaga N. A. (2015). La prevalencia del virus de Newcastle en pollos nativos de las comunidades rurales en el sur de Ecuador. CEDAMAZ

Villegas, P. (2015). Enfermedad de Newcastle epidemiología & estrategias de control. *Avinews*.

Villegas, P. 1990. Control de la Enfermedad de Newcastle. In *Cuarto Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar (1990)*

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

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

“FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES”

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

TESIS: **DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE
NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN AVES DE
TRASPATIO EN LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE”**

ANEXO 1: Recolección de las muestras de campo en gallinas criollas



ANEXO 2: Recolección de las muestras de campo en patos



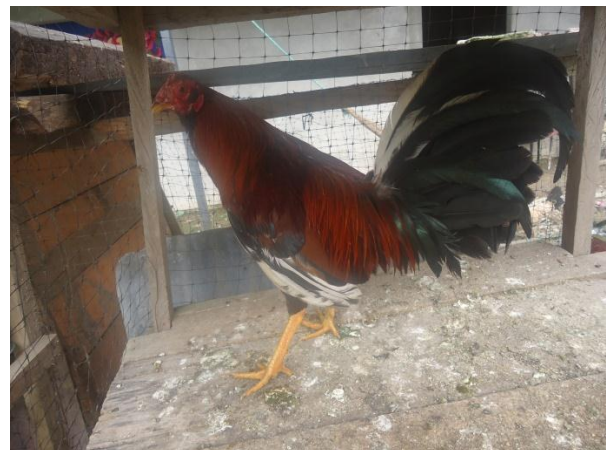
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

**“FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES”**

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**TESIS: DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE
NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO EN LA
PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE”**

ANEXO 3: Recolección de las muestras de campo en aves de pelea.



ANEXO 4: Recolección de las muestras de campo en pollos.



ANEXO 5: Registro de la recolección de muestras en el campo.

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO EN LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE												
RESPONSABLE:			EDUARDO AGUSTÍN CUEVA REÁTEGUI									
PROVINCIA EN ESTUDIO:			ZAMORA CHINCHIPE									
TIPO DE MUESTRA:			HECES									
N° de Muestr	Fecha de Colecta	Provincia	Cantón	Parroquia	Sector de Muestreo	Propietario	Cuadrante	Sitio de muestre	Coordenadas sitio de muestreo		Numero de fotografía	Vacunación
									Corrdenadas x	Coordenadas y		
1	22/01/2016	ZCH	PANGUI	GUISME	CENTRO SHUARA	MARICELA JUEP	1042	718	774835,01	9608040,08	DSC-00870	NO
2	22/01/2016	ZCH	PANGUI	GUISME	CENTRO SHUARA	MARICELA JUEP	1042	718	774835,01	9608040,08	DSC-00871	NO
3	22/01/2016	ZCH	PANGUI	GUISME	CENTRO SHUARA	MARICELA JUEP	1042	718	774835,01	9608040,08	DSC-00872	NO
4	23/01/2016	ZCH	YACUAMBI	LA PAZ	CURIACA	ROBERTO PINTO	828	219	734172,13	95829001,03	DSC-00926	NO
5	23/01/2016	ZCH	YACUAMBI	LA PAZ	CURIACA	ROBERTO PINTO	828	219	734172,13	95829001,03	DSC-00927	NO
6	23/01/2016	ZCH	YACUAMBI	LA PAZ	CURIACA	ROBERTO PINTO	828	219	734172,13	95829001,03	DSC-00928	NO
7	23/01/2016	ZCH	YACUAMBI	LA PAZ	CURIACA	ROBERTO PINTO	828	219	734172,13	95829001,03	DSC-00929	NO
8	23/01/2016	ZCH	YACUAMBI	28 DE MAYO	LA HACIENDA	NELSON ORTIZ	948	216	724365,33	9600647,84	DSC-00930	NO
9	23/01/2016	ZCH	YACUAMBI	28 DE MAYO	LA HACIENDA	NELSON ORTIZ	948	216	724365,33	9600647,84	DSC-00931	NO
10	23/01/2016	ZCH	YACUAMBI	28 DE MAYO	LA HACIENDA	NELSON ORTIZ	948	216	724365,33	9600647,84	DSC-00932	NO
11	23/01/2016	ZCH	YACUAMBI	28 DE MAYO	LA HACIENDA	NELSON ORTIZ	948	216	724365,33	9600647,84	DSC-00933	NO
12	23/01/2016	ZCH	YACUAMBI	TUTUPALI	BASTIÓN	DIANA JARAMILLO	1104	213	718147,87	9617177,4	DSC-00914	NO
13	23/01/2016	ZCH	YACUAMBI	TUTUPALI	BASTIÓN	DIANA JARAMILLO	1104	213	718147,87	9617177,4	DSC-00915	NO
14	23/01/2016	ZCH	YACUAMBI	TUTUPALI	BASTIÓN	DIANA JARAMILLO	1104	213	718147,87	9617177,4	DSC-00916	NO
15	23/01/2016	ZCH	YACUAMBI	TUTUPALI	BASTIÓN	DIANA JARAMILLO	1104	213	718147,87	9617177,4	DSC-00917	NO
16	23/01/2016	ZCH	YACUAMBI	TUTUPALI	CHUCAR GRANDE	CARMEN PRADA	1073	214	717647,25	9615532,3	DSC-00918	NO
17	23/01/2016	ZCH	YACUAMBI	TUTUPALI	CHUCAR GRANDE	CARMEN PRADA	1073	214	717647,25	9615532,3	DSC-00919	NO
18	23/01/2016	ZCH	YACUAMBI	TUTUPALI	CHUCAR GRANDE	CARMEN PRADA	1073	214	717647,25	9615532,3	DSC-00920	NO
19	23/01/2016	ZCH	YACUAMBI	TUTUPALI	CHUCAR GRANDE	CARMEN PRADA	1073	214	717647,25	9615532,3	DSC-00921	NO
20	16/01/2016	ZCH	YANTZAZA	YANTZAZA	PITÁ ALTO	VICTOR AGREDA	790	622	748901,36	9579770,45	DSC-0798	NO
21	16/01/2016	ZCH	YANTZAZA	YANTZAZA	PITÁ ALTO	VICTOR AGREDA	790	622	748901,36	9579770,45	DSC-0800	NO
22	17/01/2016	ZCH	YANTZAZA	YANTZAZA	PITÁ ALTO	VICTOR AGREDA	790	622	748901,36	9579770,45	DSC-0801	NO
23	16/01/2016	ZCH	YANTZAZA	YANTZAZA	PITÁ ALTO	VICTOR AGREDA	790	622	748901,36	9579770,45	DSC-0801	NO
24	16/01/2016	ZCH	YANTZAZA	YANTZAZA	PITÁ ALTO	BENILDO CARRIÓN	790	623	750309,26	9580533,34	DSC-0802	NO
25	16/01/2016	ZCH	YANTZAZA	YANTZAZA	PITÁ ALTO	BENILDO CARRIÓN	790	623	750309,26	9580533,34	DSC-0804	NO
26	17/01/2016	ZCH	YANTZAZA	YANTZAZA	PITÁ ALTO	BENILDO CARRIÓN	790	623	750309,26	9580533,34	DSC-0805	NO