



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS

NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y

ZOOTECNIA

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

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

AUTOR:

Luis Fabricio Salazar Zambrano

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Galo Vinicio Escudero Sánchez Mg. Sc.

Loja – Ecuador

2017

1859

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

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS


Dr. Galo Vinicio Escudero Sánchez Mg. Sc.

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Haber revisado el trabajo de tesis titulado “**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO DE LA PROVINCIA DE EL ORO**”, realizado por el Sr. Egresado **LUIS FABRICIO SALAZAR ZAMBRANO**, 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, 3 de Enero de 2017


.....
Dr. Galo Vinicio Escudero Sánchez Mg. Sc.
DIRECTOR DE TESIS

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

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

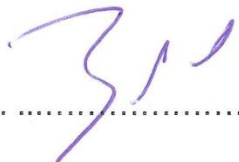
“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO DE LA PROVINCIA DE EL ORO” Tesis presentada al Tribunal de Grado como requisito, previo a la obtención del título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA:

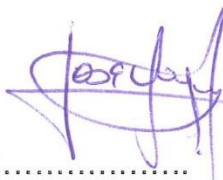
Loja, 30 Mayo del 2017

Dr. Segundo Germán Barragán Fierro Mg. Sc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



.....

Dr. José Stalin Yaguana Jimenez Mg. Sc.
VOCAL DEL TRIBUNAL



.....

Mvz. Jhuliana Katherine Luna Herrera Mg. Sc.
VOCAL DEL TRIBUNAL



.....

AUTORÍA

Yo, Luís Fabricio Salazar Zambrano, 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: Luis Fabricio Salazar Zambrano

Firma:



Cedula: 0706793833

Fecha: Loja, 29 de junio 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, Luis Fabricio Salazar Zambrano, declaro ser autor de la tesis titulada: "DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR EN AVES DE TRASPATIO DE LA PROVINCIA DE EL ORO", 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 29 días del mes de junio del dos mil diecisiete, firma el autor.

Firma:


.....

Autor:

Luis Fabricio Salazar Zambrano

Número de cédula:

0706793833

Dirección de domicilio:

El Oro, Balsas

Correo Electrónico:

fabricio93_@hotmail.com

Celular:

0991408100

DATOS COMPLEMENTARIOS

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

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

Dr. José Stalin Yaguana Jimenez Mg. Sc

MVZ. Jhuliana Katherine Luna Herrera Mg. Sc

AGRADECIMIENTO

A la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Loja por haberme formado como profesional y permitirme disfrutar de esta carrera que tanto me apasiona; agradezco a todo el personal que conforma U.N.L por todo lo brindado en mi vida como alumno.

A mis padres por siempre brindarme su apoyo en cada reto de mi vida y ser un gran ejemplo de superación, a mi esposa por ser un pilar fundamental dentro de mi carrera universitaria y a mis hermanos por formar parte de este logro.

De una manera muy especial a mi tutor de tesis Dr. Galo Escudero por el apoyo en todo momento de la realización y culminación del presente trabajo de investigación.

A todos los docentes que impartieron sus conocimientos y experiencias, mi gratitud porque han sido la base fundamental para formarme como profesional, y a mis amigos que fueron parte importante en toda la etapa de mi vida universitaria.

Luís Fabricio

DEDICATORIA

A Dios, por guiarme en cada momento darme fortaleza y sabiduría para culminar con éxito mis estudios; a mis padres Luis y Ligia por ser ejemplo de perseverancia, por sus enseñanzas y su apoyo incondicional; a mi esposa por luchar juntos en cada situación difícil por brindarme la confianza de realizarme profesionalmente y por haberme regalado lo más hermoso de la vida mi hijo Maverick; a mis hermanos, amigos y familiares que de una u otra manera siempre hicieron todo lo posible para lograr este objetivo.

Luis Fabricio

ÍNDICE GENERAL

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS	ii
CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iii
AUTORÍA.....	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÌNDICE DE TABLAS	xii
ÌNDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÒN DE LITERATURA	3
2.1. AVICULTURA DE TRASPATIO.....	3
2.1.1. Características de este Tipo de Explotaciòn	3
2.1.2. Importancia Epidemiològica.....	4
2.1.3. Necesidad de la Compartimentalizaciòn	5
2.2. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE.....	5
2.2.1. Importancia Econòmica de la Enfermedad de Newcastle.....	5
2.2.2. Etiología.....	6
2.2.2.1 Propiedades Biològicas.....	8
2.2.2.3 Resistencia a los agentes físicos químicos.....	10
2.2.3. Alteraciones Patològicas.....	11
2.2.4. Epidemiología	12
2.2.5. Patogenicidad y Periodo de Incubaciòn.....	13

2.2.6. Transmisión	13
2.2.7. Signos Clínicos	14
2.2.8. Patología.....	15
2.2.8.1 Histopatología.....	15
2.2.9. Diagnóstico.....	16
2.2.9.1. Diagnóstico clínico.....	16
2.2.9.2. Diagnóstico de laboratorio.....	16
2.2.9.3. Diagnóstico Indirecto	16
2.2.9.3.1. ELISA (Enzime-Linked Inmunosorbent Assay).....	16
2.2.9.3.2. Inhibición de la hemaglutinación (HI).....	17
2.2.9.3.3. Diagnostico directo	17
2.2.9.3.4. Aislamiento del virus de Newcastle en embrión de pollo SPF (Libres de patógenos específicos).....	17
2.2.9.3.5. Pruebas moleculares para la determinación de la virulencia	18
2.2.9.3.6. Pruebas biológicas para la evaluación de la patogenicidad.....	18
2.2.9.3.7. Índice de patogenicidad intracerebral en pollitos de 1 día (IPIC)	19
2.2.9.3.8. Índice de patogenicidad intravenosa en pollos de 6 semanas (IPIV)	19
2.2.9.4. Diagnóstico diferencial.....	20
2.2.10. Tratamiento.....	20
2.2.11. Prevención y Control	20
2.2.12. Vacunación	21
2.3. INFLUENZA AVIAR	21
2.3.1. Importancia Económica de Influenza Aviar.....	21
2.3.2. Etiología.....	21
2.3.2.1. Propiedades biológicas	22
2.3.2.1.1. Resistencia a la acción física y química.....	22
2.3.2.2. Clasificación del virus.....	22
2.3.2.3. Características del Virus.....	23
2.3.2.3.1. Proteínas víricas.....	23
2.3.2.3.2. La hemaglutinina	24

2.3.2.3.3. La neuraminidasa	24
2.3.2.3.4. El genoma vírico y el ciclo de replicación del virus	25
2.3.2.3.5. Respuesta inmune.....	27
2.3.3. Patogenicidad y Periodo de Incubación	27
2.3.4. Epidemiología.....	28
2.3.5. Transmisión.....	30
2.3.6. Signos Clínicos.....	32
2.3.7. Alteraciones Patológicas.....	32
2.3.8. Diagnóstico.....	33
2.3.8.1. Diagnóstico clínico.....	33
2.3.8.2. Diagnóstico diferencial.....	34
2.3.9. Prevención y Control.....	35
2.3.10. Vacunación	36
2.4. OTROS TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN RELACIONADOS CON EL TEMA.....	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.4. VARIABLES	40
3.5. RECOPIACIÓN DE LA INFORMACIÓN.....	41
3.5.1 Método para obtener puntos de muestreo.....	41
3.5.2. Ubicación espacial de los humedales para muestreo.....	41
3.5.3. Aves Muestreadas	41
3.5.4. Colección y procesamiento de las muestras	41
3.5.5. Técnica de recolección de las muestras de heces	42
3.5.6. Análisis de Laboratorio.....	42
3.5.6.1. Procedimiento de aislamiento del virus de newcastle e Influenza Aviar en huevos embrionados de gallina SPF.	42
3.5.6.2. Evaluación de la actividad hemoaglutinante del fluido alantoideo	43
3.6. ANALISIS ESTADÍSTICO	45
4. RESULTADOS	46

4.1. MUESTRAS RECOLECTADAS POR ESPECIE	46
4.2. AISLAMIENTO VIRAL DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR	46
4.3. Presencia de NC e IA en la Parte Norte	47
4.3.1.Presencia de NC e IA en la Zona Centro.....	47
4.3.2.Presencia de NC e IA en la Zona Sur.....	48
4.4.PREVALENCIA TOTAL POR ESPECIES DE TRASPATIO.....	49
4.5.EVALUAR LA PATOGENICIDAD DE LOS VIRUS	49
4.6.SECUENCIAR LAS CEPAS AISLADAS PARA EVALUAR SUS RELACIONES GENÉTICAS	49
5. DISCUSIÓN.....	50
6. CONCLUSIONES.....	52
7. RECOMENDACIONES	53
8. BIBLIOGRAFÍA.....	54
9. ANEXOS.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS	PÁG.
Tabla 1. Especies muestreadas en la provincia de El Oro para determinar la presencia de Newcastle e Influenza Aviar.	46
Tabla 2 . Prevalencia total y por zonas de Newcastle e Influenza Aviar en la provincia de El Oro.....	46
Tabla 4. Prevalencia de la zona centro, por especies muestreadas de Newcastle e Influenza Aviar en la provincia de El Oro.....	47
Tabla 5. Prevalencia de la zona sur, por especies muestreadas de Newcastle e Influenza Aviar en la provincia de El Oro	48
Tabla 6. Prevalencia total y por especies de Newcastle e Influenza Aviar en la provincia de El Oro.....	49

ÌNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁG.
Figura 1. Replicación del virus de Influenza Aviar.....	26
Figura 2. Cronograma de distribución de las aves migratorias	29
Figura 3. Esquema de las vías de trasmisión directas e indirecta.....	30
Figura 4. Mapa Gobierno Autónomo Descentralizado Provincial de El Oro.....	39

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

RESUMEN

El Newcastle y la Influenza Aviar constituyen peligros latentes en la avicultura comercial a los cuales se debe estar atentos mediante monitoreos para impedir que ocasiones perdidas en la industria; el objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de los virus de Newcastle (NC) e Influenza Aviar (IA) en aves de traspatio que se encuentren cerca de humedales e hídricos con avicultura comercial en la provincia de El Oro. Se muestrearon 300 aves de traspatio mediante hisopados cloacales en diferentes zonas de acuerdo a la prevalencia límite descrita por González (1986), tomando como máximo tres a cuatro muestras por punto de muestreo en los meses enero-abril 2016, para esto se utilizó sistemas de información geográfica mediante el software ArcMap. Luego mediante aislamiento viral en huevos embrionados de pollo SPF, se determinó por la actividad hemaglutinante del fluido alantoideo, y confirmada mediante pruebas de hemoaglutinación (HA) que el 100% 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 nivel de confiabilidad 95 % y un intervalo de confianza de la prevalencia de 0 - 1,19%. Con lo que se concluye que en el periodo de estudio no se encontró evidencia de la presencia del virus de estas dos enfermedades, por lo que es necesario realizar monitoreos periódicos y procesar las muestras en forma directa con técnicas moleculares que permitan identificar pequeñas cantidades de concentración de ARN material genético de estos dos virus, que solo RT-qPCR es capaz de detectar.

Palabras claves: aves de traspatio, Newcastle, Influenza Aviar, aislamiento

ABSTRACT

The Newcastle and Avian Influenza are hidden hazards in commercial poultry which ones must be observed by monitoring in order to prevent losses in this industry. The main objective of this research was to determine the presence of Newcastle (NC) and Avian Influenza (AI) viruses in birds in backyard that are near wetlands and hydrological systems in commercial poultry in El Oro province. Also, 300 backyard -birds were sampled by swab sewage in different areas according to the formula of prevalence limit 1% described by González (1986), taking into account three to four samples per sampling during the period from January to April 2016, with the use of GIS using ArcMap software. Then, through viral isolation in embryonated SPF chicken eggs, was determined by the hemagglutinating allantoic fluid activity, and confirmed by tests of hemagglutination (HA) that 100% of the specimens tested were negative to the virus of Avian Influenza and Newcastle. The technique of evaluation of risk through "epiR" version 09-79 showed that the prevalence of NC and AI virus in backyard poultry and cockfight birds with a prevalence of 0% and a confidence interval of 0 to 1.19%, with a novel of reliability of 95%; so it is concluded that during the period of this research these two diseases virus did not flow, so it is necessary to carry out periodic monitoring, and process samples directly with molecular techniques that enable the identification of small amounts of genetic material RNA concentration of these two virus, and that only RT-qPCR is capable of detecting it (Kubista et al., 2006).

Key words: backyard poultry, Newcastle and Avian Influenza, isolation.

1. INTRODUCCIÓN

La avicultura de traspatio, también llamada avicultura rural, criolla, doméstica, autóctona o de solar, se define como un sistema tradicional de producción pecuaria, dónde las familias del medio rural y algunas en la ciudad, crían un pequeño número de aves de corral en el patio de su viviendas, y las alimentan con desperdicios de la unidad familiar, más lo que las aves encuentren en campo alrededor de la vivienda (Rodríguez et al. 1996). Una de las características de este tipo de explotación es su pobre estructura y organización tanto en la parte de manejo, nutrición y sobre todo la sanitaria con escaso control de enfermedades, uso de vacunas y pobre bioseguridad, provocando altas mortalidades con la presencia de enfermedades letales como Newcastle y siendo vector importante en la propagación de las mismas (Bello & Exposito, 2003).

Newcastle e Influenza Aviar son enfermedades altamente patógenas para la industria avícola, debido a las grandes pérdidas económicas que estas representan por su elevada mortalidad y morbilidad. Estas enfermedades constan en la lista de enfermedades de la Organización Mundial de la Salud (OIE, 2016). La enfermedad de Newcastle causada por un virus del género Avulavirus, serotipo Paramixovirus aviar tipo 1 (APMV - 1) (Alexander, 2000). Por su parte el virus de Influenza Aviar que pertenece a la familia de los Ortomixovirus, un grupo de virus ARN de sentido negativo, ha sido aislado en una amplia variedad de especies de aves alrededor del mundo, se han descrito hasta 16 subtipos de hemaglutininas (HA) y 9 neurominidasas (NA) (Karen et al, 2013). Los virus pertenecientes a los subtipos antígenos H5 y H7 pueden volverse altamente patógenos cuando son transmitidos por parte de aves silvestres a las domésticas (Karen et al., 2013).

El virus de influenza aviar de alta patogenicidad, especialmente del subtipo H5N1 linaje asiático, ha cambiado la ecología y epidemiología de la enfermedad, requiriendo la generación inmediata de nuevos conocimientos en temas relacionados a su epidemiología y dinámica de transmisión (Karen et al., 2013). La enfermedad de Newcastle por su parte dejó de ser un problema serio a mediados de los 90, pero en los últimos años se ha observado un incremento de aislamientos virales, principalmente a partir de brotes ocurridos en aves de riña.

Para lograr la erradicación de las formas velogénicas de la ENC se requiere identificar las épocas de concentración viral y eliminar las fuentes de contaminación (Iglesias, 2011).

En el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos:

- Determinar la presencia del virus de Newcastle e Influenza Aviar en aves de traspatio incluyendo las de riña, criadas cerca de humedales en la provincia de El Oro.
- Aislar el virus causante de la enfermedad de Newcastle en aves de traspatio incluyendo las de riña, criadas cerca de humedales en la provincia de El Oro.
- Aislar el virus de Influenza Aviar en aves de traspatio incluyendo las de riña, criadas cerca de humedales en la provincia de El Oro.

2. REVISIÒN DE LITERATURA

2.1. AVICULTURA DE TRASPATIO

La “avicultura familiar”, rústica o de traspatio, se puede conceptualizar como la cría doméstica tradicional que utiliza pocos insumos e incluye diversas especies de aves como: gallinas, patos, pavos, gansos, gallinas de guinea, pichones, faisanes, codornices y aves de riña, (Molina, 2013).

La avicultura de traspatio se distingue por su escaso uso de la tecnología pecuaria disponible; por lo regular, las aves no tienen un alojamiento propio o se alojan en instalaciones rústicas, carecen de un control sanitario y su alimentación tiene como base diversos productos o subproductos generados en su mayoría en la misma unidad de producción (Jerez et. al, 1994).

Los estímulos del comercio y el desarrollo de nuevas tecnologías de producción han favorecido que la avicultura industrial se desarrolle de manera dinámica y creciente en los últimos años. Esta circunstancia también ha ocasionado que en un mismo territorio se alojen sistemas con diferencias incompatibles en cuanto a bioseguridad que por circunstancias de proximidad deberían manejarse como un mismo compartimiento epidemiológico (Cisneros, 2002).

2.1.1. Características de este Tipo de Explotaciòn

Según el censo agropecuario SICA 2002 en el Ecuador existía 42'000.118 aves domesticas incluidas gallinas, patos, pavos, codornices y avestruces. De este total el 76.9% pertenecen a avicultura industrial y el 23.1% al traspatio. Por otro lado se inventariaron 1'098.326 UPAs (Unidades productivas agropecuarias) que se dedicaban a la avicultura, de estas el 99.5% corresponden a sistemas de traspatio, frente a un 0.5% correspondiente a avicultura industrial.

2.1.2. Importancia Epidemiológica

Recientes sucesos epidemiológicos presentados a nivel mundial en torno al virus de Influenza Aviar, nos demuestran que los brotes de enfermedad pueden presentarse burlando los sistemas de bioseguridad al interior de un mismo ambiente geográfico pasando de los sistemas de producción avícola de traspatio al industrial y viceversa. Los casos registrados en Camboya, Tailandia, China e Indonesia se iniciaron en sistemas de producción de traspatio y se expandieron rápidamente afectando a los industriales (Molina, 2013).

En British Columbia Canadá se presentó un brote de virus de alta patogenicidad que se diseminó al mismo tiempo en avicultura de traspatio e industrial con alta bioseguridad; este hecho pone en evidencia la existencia de mecanismos de dispersión de la enfermedad que pueden franquear las barreras de bioseguridad e introducirse al interior de la granja generando nuevos brotes. Los casos de influenza presentados en Inglaterra y Francia se produjeron en explotaciones con sistemas de producción tecnificados cuya bioseguridad se creía invulnerable. (Vinuesa, 2007)

En nuestro país aún no se ha evaluado la contaminación por diseminación de enfermedades entre plantales avícolas o la influencia de la avicultura de traspatio en el estatus epidemiológico de una zona, y en cierta manera hemos aprendido a convivir con esta circunstancia que aún permanece oculta pues no hemos tenido una enfermedad con los niveles epidémicos y la letalidad de la Influenza Aviar. En el Ecuador se conoce aunque de forma intuitiva, que existen zonas territoriales donde conviven estrechamente estos sistemas de producción avícola (Buendía, 2014).

Por otro lado la expansión del sector avícola industrial y la falta de estándares de Bioseguridad también han vuelto vulnerable al sistema, por tanto requiere mayor rigurosidad en los controles y normas de instalación más drástica. Factores como, la proximidad con los centros de consumo, humedales donde llegan aves migratorias, el comercio informal o la densidad de granjas con niveles diversos de

bioseguridad pueden poner en riesgo a todo el aparato de producción avícola, más aún si se consideran las nuevas reglamentaciones del comercio internacional que sancionan el ingreso de productos de países donde ha existido antecedentes de enfermedades de la lista A de la OIE. (Vinueza, 2007)

2.1.3. Necesidad de la Compartimentalización

La persistencia de enfermedades como el caso de newcastle, salmonella o Influenza Aviar en otros países y la dificultad que representa eliminarlas de un territorio nacional, hace pensar en la necesidad de crear compartimentos, regionalizar y definir zonas de riesgo para implementar en ellas planes y programas con miras a asegurar nuestra industria avícola. En el manejo de la sanidad en un territorio es necesario remplazar el empirismo, la intuición, tradición y concepciones quizás incompletas o erróneas sobre las medidas a adoptar para disminuir el riesgo sanitario o epidemiológico. Todo plan de control debe pasar por el conocimiento de lo que acontece en un territorio. La representación de los eventos en un área geográfica permite analizar diversos escenarios e intentar responder preguntas como: - ¿Qué está ocurriendo con las enfermedades en un territorio?. ¿Qué características de asocian al fenómeno de brotes?. ¿Las enfermedades que tenemos son territoriales, regionales o se presentan con mayor frecuencia en algún sector?. ¿Qué nivel de riesgo tiene una zona?. ¿Por donde debemos empezar con un plan de prevención. Que zonas podrían considerarse de alta o baja prevalencia? (Vinueza, 2007).

2.2. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

2.2.1. Importancia Económica de la Enfermedad de Newcastle

La emergencia de la ENC en un territorio trae consigo de manera inmediata enormes pérdidas como consecuencia de la elevada mortalidad en las aves afectadas, el sacrificio de las aves enfermas o expuestas a la enfermedad. Incrementándose las pérdidas por las medidas de control, indemnización a los avicultores; los programas de vigilancia y las restricciones comerciales internacionales. Entre los gastos de los programas de vigilancia, destaca el

elevado número de controles serológicos que se han de realizar en las zonas afectadas y en riesgo (Alexander, 2001).

Entre los gastos derivados del control de la enfermedad están considerados, el sacrificio preventivo de granjas no afectadas, la mejora de los niveles de bioseguridad, la destrucción de cadáveres y del material potencialmente infectado, la limpieza y desinfección de granjas, el control de movimiento de aves y/o productos avícolas y la vacunación. Las restricciones comerciales impuestas por la OMC (Organización Mundial del Comercio) y la OIE en los países que sufren algún brote, consiste en la prohibición de exportar aves vivas y productos avícolas desde estos países (Buendía, 2014).

2.2.2. Etiología

La enfermedad de Newcastle (ENC) está causada por cepas virulentas del paramixovirus aviar tipo 1 (PMAV-1), que es un serotipo del género Avulavirus perteneciente a la subfamilia Paramyxovirinae, familia Paramyxoviridae y orden mononegavirales (Alexander, 2003).

Los paramixovirus procedentes de diferentes especies aviares se han clasificado mediante pruebas serológicas y análisis filogenéticos en diez subtipos, denominados PMAV-1 a PMAV-10; el vENC se ha denominado PMAV-1. (Miller et al., 2010)

Análisis filogenéticos recientes, basados en el tamaño del genoma y en la secuencia del gen F y de la polimerasa, han señalado dos clases dentro del serotipo 1 del virus de Newcastle (Czegledi, y otros, 2006). La mayoría de los virus notificados perteneces a la clase I, mientras que la clase II incluye reportes de virus en aves acuáticas y en mercados de aves vivas en los Estados Unidos (Kim, King, Suarez, Wong, & Afonso, 2007).

Además el paramixovirus tipo I que afecta a las palomas (PPMV) se diferencia antigénicamente de los PMAV-1 clásicos por tener un patrón característico de

reacción frente a Anticuerpos Monoclonales (MABs), lo que identifica como variante antigénica de PMAV-1 (Alexander, 2003).

Los vENC 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).

Embebidas en la envoltura se encuentran dos glucoproteínas diferentes, la hemaglutinina - neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F), que aparecen como pequeñas espículas proyectadas desde la superficie de la membrana cuando son observadas con microscopio electrónico. La cápsida tiene simetría helicoidal y el genoma es ácido ribonucleico (ARN), no segmentado, de simple cadena y polaridad negativa (Pedersen et al., 2004).

La longitud del genoma del vENC es de aproximadamente 15,186 nucleótidos (De Leeuw & Peeters, 1999). Se trata de un virus con un genoma no segmentado que codifica para 6 proteínas estructurales: hemaglutinina - neuraminidasa (HN), proteína de fusión (F), nucleocápside (NP), matriz (M) y fosfoproteína (P) y polimerasa (L), la proteína v relacionada con la inhibición de la respuesta antiviral se genera a partir del gen P mediante edición del ARN y se considera no estructural. Las glicoproteínas HN y F son las inmunológicamente más importantes pues contiene los determinantes antigénicos responsables del desarrollo de la inmunidad protectora (Villegas & Perozo., 2012).

Las proteínas HN y F están expuestas como protuberancias en la superficie de la envoltura del virión y son esenciales para iniciar la infección viral. La glucoproteína HN es la grande de la moléculas glucoproteicas y posee actividad de hemaglutinina (HA) y de Neuraminidasa (NA) (Murphy, Gibbs, Horzinek, & Studdert, 1999). La actividad hemaglutinante de HN permite su unión a receptores específicos de membrana de las células huésped, incluidos glóbulos rojos (Kimball, 1990). Mediante su actividad neuraminidasa la HN hidroliza el ácido salicílico terminal de glucoproteínas y glucolípidos permitiendo liberar las

partículas virales de los receptores de las células hospedadoras, facilitando así la difusión del virus (Huang et al, 2004). La proteína F es responsable de la fusión de las membranas celulares y virales y por ello se da la entrada del virus al interior de la célula hospedadora (Morrison, 2003).

Esta proteína es la principal determinante de patogenicidad del vENC (Collin et al, 1993; Peeters et al, 1999; Shengging et al, 2002 citado por Buendia, 2014), su actividad es independiente del pH y como resultado de ello las células infectadas que expresan esta proteína viral en su superficie se fusionan con las células adyacentes formando células gigantes multinucleadas, efecto característico de este virus cuando se multiplica en cultivos celulares (Morrison, 2003).

La nucleoproteína (NP), codificada por el gen NP, es esencial para la replicación viral y las diferencias encontradas entre las proteínas NP de distintos aislados del virus pudieran tener un papel importante en la virulencia individual de las cepas (Seal, Crawford, Seller, Locke, & King, 2002). Este gen es el primero y que más se transcribe durante el ciclo de multiplicación viral. Su proteína es la que se encuentra en mayor cantidad en la partícula viral y está estrechamente asociada con el ARN genómico formando la nucleocápsida (Seal et al., 2002; Wise et al., 2004).

El gen L tiene 6 regiones altamente conservadas consideradas esenciales para la actividad enzimática de la polimerasa. Su producto, la proteína L es la menos abundante en la partícula viral y en asociación con la proteína P constituyen la polimerasa viral activa (Wise et al., 2004).

2.2.2.1 Propiedades Biológicas

a. Actividad hemaglutinante

La capacidad de aglutinar glóbulos rojos se debe a la unión de la proteína Hemaglutinina-Neurominidasa (HN) con los receptores de los eritrocitos. Esta propiedad y la inhibición específica de la aglutinación por medio de antisueros han

demostrado ser importantes herramientas para diagnóstico de la enfermedad (Alexander, 2003).

El vENC aglutina células de anfibios, reptiles y aves en general; células rojas humanas, de ratones y de cuyes; pero la capacidad de aglutinar células de bovinos, caprinos, ovinos, porcinos y equinos depende de la cepa del vENC. Para pruebas de hemaglutinación (HA), por lo general se utilizan eritrocitos de pollos; siendo los de pavos los que trabajan mejor en la prueba de hemaglutinación en aislamientos ocasionales, como el caso de los cormoranes (King, 1999 citado por Buendía, 2014).

b. Actividad de la Neuraminidasa

La presencia de esta enzima en la superficie de la envoltura del virión, provoca la elusión gradual de los glóbulos rojos aglutinados. Su función en la replicación es desconocida pero al parecer ésta tiene como función remover los receptores virales de la célula huésped, previniendo la adhesión de las partículas virales liberadas y el agrupamiento viral (Alexander, 2003).

c. Fusión celular y hemolisis

La adhesión a los receptores durante la replicación es seguida por la fusión de la membrana viral con la membrana celular, lo cual podría resultar en la fusión de una o más células (similar a la formación de sincitios que ocurre cuando las partículas virales salen por gemación de las células). Al momento de la fusión de la membrana viral con los eritrocitos, usualmente se produce lisis de la membrana rígida de los glóbulos rojos (Alexander, 2003).

d. Replicación del Virus

La replicación intracelular se realiza por completo en el citoplasma. Debido a que el ARN viral tiene sentido negativo, la ARN-polimerasa dirigida por el ARN viral debe producir transcriptasas complementarias de sentido positivo para que puedan actuar como ARN mensajeros y así puedan utilizar el mecanismo celular,

habilitando la traducción a proteínas y genomas virales. La proteína F es sintetizada como un precursor no funcional, F0, que requiere ser cortada en F1 y F2 por medio de proteasas de la célula huésped (Alexander, 2003).

2.2.2.2 Inmunidad frente al virus

Se ha demostrado que tanto la inmunidad celular como la humoral juegan un papel predominante en la respuesta del ave a la infección con el virus de la enfermedad de Newcastle (Al-Gariba, Gielkensa, Gruysa, & Kochi, 2003). La mayor parte de las vacunas lentogénicas son capaces de inducir anticuerpos que se correlacionan positivamente con protección (Abad & Pizarro, 2006; Reynolds. & Maraqa, 2000).

Sin embargo, la respuesta inmune humoral sistémica no es suficiente para una completa protección (Reynolds & Maraqa, 2000). La inmunidad mucosal representada por la producción local de inmunoglobulina A (IgA) en el epitelio respiratorio y digestivo, así como la estimulación de la inmunidad mediada por células (que solo se genera luego de la replicación tisular del virus), son indispensables y sin duda el objetivo de la vacunación con virus vivo en aves jóvenes en presencia de anticuerpos maternos (Perozo et al, 2008; Villegas & Perozo, 2012).

2.2.2.3 Resistencia a los agentes físicos químicos

La estabilidad del virus de Newcastle, puede evaluarse considerando el grado de alteración que sufre algunas de sus propiedades como la habilidad de infectar, aglutinar glóbulos rojos de diferentes especies de animales o de su inmunogenicidad, específicamente cuando estos son expuestos a un sinnúmero de agentes físicos químicos: el calor, luz ultravioleta, rayos X y los procesos de oxidación y cambios de pH, por sustancias acidas o básicas. La proporción en que se afectan las propiedades virales, varía con la cepa del virus, el tiempo de exposición a los agentes físicos y químicos, la cantidad de virus expuesto, la naturaleza química del medio de suspensión y también, de la interacción resultante entre las variables del tratamiento (Alexander, 2001).

El calor, dependiendo de su intensidad y tiempo de acción, parece afectar en tiempos variables, las propiedades de infectividad, de hemoaglutinación y de antigenicidad del virus del virus. Así, estas propiedades pueden ser destruidas a 100 °C en un minuto y a 56°C entre 5 minutos a 6 horas; mientras que a 37° C se requieren de horas y aun de días para que se afecten las propiedades mencionadas (Acosta, 2014).

Por otra parte, el efecto inactivante de algunas sustancias químicas sobre el virus, dependerá mucho de la naturaleza de las sustancias en el medio de suspensión. Así, cantidades de proteínas en el medio, reducen el efecto inactivante de las sustancias químicas. La formalina, la Betapropiolactona y el Fenol, se han usado para destruir la infectividad del virus, sin afectar su inmunogenicidad. Según estudios realizados se ha demostrado que los desinfectantes químicos bien utilizados en los establecimientos avícolas, inactivan al virus de Newcastle con cierta rapidez (Álvarez et al., 1992).

2.2.2.4 Cepas de virus

Alexander, (1997) cita 5 tipos patogénicos del virus de Newcastle

- Cepas velogénicas viscerotrópicas: Milano, Hertz 33, N. Y., Parrot 70181, Essex 70, Querétaro
- Cepas velogénicas neurotrópicas: Texas GB
- Cepas mesogénicas: Roakin, komarov, Meekteswar, H
- Cepas lentogénicas: Hitchner BI, Clone 30, la sota
- Cepas entéricas asintomáticas: Ulster 2C, MCIIO, V 4

2.2.3. Alteraciones Patológicas

Moreno (1994) y Cuello et al. (2011) señalan las alteraciones patológicas que se presentan de acuerdo al tipo cepa, las mismas que se citan a continuación

- Cepas velogénicas viscerotrópicas: Hemorragias petequiales y equimóticas en el proventrículo, el intestino y las tonsilas cecales, que caracterizan a la infección aguda y fatal por estas cepas.
- Cepas velogénicas neurotrópicas: Congestión de la mucosa traqueal, traqueítis catarral con exudado mucoso tanto en el lumen de la tráquea como en los pasajes nasales. Los signos neurológicos e historia de alta mortalidad, pero sin lesiones intestinales, es un cuadro patológico bastante común. Cuando hay infecciones de cepas Velogénicas Neurotrópicas.
- Cepas mesogénicas: Traqueítis catarral aguda asociada a signos nerviosos con baja mortalidad.
- Cepas lentogénicas: Las cepas lentogénicas producen solo una débil inflamación catarral de la mucosa traqueal, o causan una infección respiratoria inaparente.
- Cepas entéricas avirulentas: las cepas entéricas que parecen ser apatogénicas, se replican primariamente en las células del epitelio intestinal

2.2.4. Epidemiología

La presencia de la enfermedad de Newcastle en las aves domésticas se estima que se encuentra en cerca de 241 especies de 27 de un total de 50 órdenes que son susceptibles a este virus. La epidemiología del PMAV-1 está comprendida de forma incompleta, todas las aves son susceptibles a la infección, aunque el grado de la enfermedad varía de una especie a otra y en función de la cepa viral. Siendo las aves acuáticas (Orden Anseriformes) las más resistentes, y posible reservorios de virus lentogénicas (Kim et al., 2007), que podrían volverse más virulentos después de establecerse en aves de corral.

Se ha mencionado que este virus posee la capacidad de adaptarse a nuevos huéspedes a los que no solo infecta, sino que puede causar mortalidades considerables (Estudillo, 2000; Buendía, 2014).

Aves acuáticas muestran pocos o ningún signo clínico, incluso tras la infección con cepas virulentas del vENC (Hanson et al., 2005).

2.2.5. Patogenicidad y Periodo de Incubación

La introducción e implantación primaria del virus en las vías respiratorias, en seguida por la replicación del virus en las células del epitelio mucoso del tracto respiratorio, desde donde alcanza la circulación sanguínea, para un segundo ciclo de replicación en los órganos viscerales y una nueva liberación del virus en la corriente sanguínea pasando en algunos casos al sistema nervioso central (Moreno, 1994).

Los signos clínicos de la enfermedad y la eliminación del virus al medio, se asocian a la segunda liberación del virus a la sangre y el curso clínico de la enfermedad estará determinado por los mecanismos de defensa que pueden desarrollarse en esta fase. En manifestaciones naturales se ha observado un periodo de incubación que varía de 2 a 15 días con un promedio de 5 a 6 días (Moreno, 1994).

2.2.6. Transmisión

La forma más importante de transmisión del virus de Newcastle de ave a ave en una parvada, mediante aerosol expirados por animales infectados, que a dos días después de la exposición del virus y a un día después de mostrar los signos clínicos, empiezan a eliminar el virus durante varios días. En este periodo, con las secreciones nasales contienen altas concentraciones de virus, el agua de bebederos comunales es un medio eficaz de transmisión del virus dentro de la parvada (Molina, 2013).

Por otra parte, existen varias formas de importación y diseminación del virus a otras granjas, como son las vacunas contaminadas con cepas virulentas de campo, aves importadas portadoras y eliminadoras asintomáticas del virus, alimentos contaminados con órganos o tejidos de pollos infectados, como las

vísceras crudas, contaminación del agua y equipo avícola como las criadoras y la introducción del virus a una granja mediante el tránsito de pájaros, perros, personas y vehículos no controlados sanitariamente (Alexander, 2001).

Según investigaciones se ha descartado que el virus de Newcastle pueda ser transmitido a través del huevo y durante la incubación y es fácil de comprender, que cualquier embrión que resultara infectado verticalmente con un virus Velogénico, moriría antes de su nacimiento, por lo que teóricamente se podría pensar en la posibilidad de producir pollitos libres de la infección, aun con huevos de parvadas con la infección activa (Buendía, 2014).

2.2.7. Signos Clínicos

Alexander (2001) menciona las cepas del virus atacan el sistema nervioso; otras, el sistema respiratorio o digestivo. Los signos clínicos incluyen:

- Signos respiratorios: jadeo, tos, estornudos y ruidos al respirar
- Signos nerviosos: tembladera, parálisis de las alas y las patas, cuello torcido, desplazamiento en círculos, espasmos y parálisis
- Signos digestivos: diarrea
- Puede haber una interrupción parcial o completa de la producción de huevos.
- Los huevos pueden presentar anomalías de color, forma o superficie, y pueden tener una albúmina acuosa.
- La mortalidad es variable pero puede alcanzar el 100%

Las características clínicas de la ENC estarán determinadas por la interacción entre la susceptibilidad del hospedero y la patogenicidad de la cepa del virus infectante. Así, en el pollo de engorda o en la polla y gallina de postura, la ENC que puede ser causa por diferentes tipos patogénicos de virus, puede manifestarse con un cuadro clínico de muerte repentina, con un 80-90% de mortalidad, o con un cuadro de gravedad media y hasta de enfermedad subclínica. La especie de hospedero involucrado, tiene un efecto determinante frente a la patogenicidad de una cepa de virus, habiéndose observado que virus que causan

enfermedad severa en pollos, gallina y solo producen enfermedad inaparente en patos y gansos (Moreno, 1994).

2.2.8. Patología

2.2.8.1. Histopatología

Alexander (2003) señala las alteraciones histopatológicas que pueden presentarse con la aparición de este virus son:

- En el bazo y el hígado, se produce hiperemia, hemorragias y cambios vasculares como degeneración hidrópica de la media, hialinización de capilares y arteriolas, con trombosis en los capilares y también necrosis de células endoteliales. Además, puede encontrarse necrosis focal en el hígado.
- En los tejidos del aparato respiratorio, los cambios microscópicos en el epitelio mucoso traqueal, se manifiestan por congestión, edema e infiltración abundante de las células linfoides. Los cambios histológicos en el pulmón son proliferativos y exudativos y las membranas de los sacos aéreos pueden experimentar engrosamiento y opacidad, debido a la proliferación del tejido conectivo a consecuencia de la infección por el VNC.
- En el sistema nervioso central, generalmente se detecta degeneración neuronal, infiltración linfocitaria perivascular e hipertrofia de las células endoteliales. Estas lesiones parecen estar bien distribuidas en la medula, cerebro medio, y el cerebelo. En el aparato digestivo se pueden encontrarse lesiones necróticas y hemorrágicas en la mucosa intestinal y en el proventrículo, hemorragias que se asocian a procesos ulcerativos.

2.2.9. Diagnóstico

2.2.9.1. Diagnóstico clínico

Un diagnóstico es difícil de realizar y mucho más si es presuntivamente, especialmente si la enfermedad es producida por cepas de virus que afecten al aparato respiratorio, sin producir lesiones nerviosas ni digestivas (Moreno, 1994).

2.2.9.2. Diagnóstico de laboratorio

Para realizar el aislamiento viral en casos de enfermedad severa con alta mortalidad se utilizan muestras procedentes de aves muertas o recientemente eutinizadas que incluyen exudado oronasal y muestras de órganos como, tráquea, pulmones, intestino (con material fecal), cerebro, bazo, hígado, riñones y corazón. En el caso de aves vivas se utilizan exudados traqueales y cloacales (con restos de heces) (Moreno, 1994).

2.2.9.3. Diagnóstico Indirecto

2.2.9.3.1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

La técnica de ELISA es un buen instrumento para la investigación del estado de inmunidad humoral de grandes poblaciones de aves, sin embargo no está diseñada para diferenciar a los diferentes serotipos del virus. Por ello una alternativa es la producción de anticuerpos monoclonales específicos, de cada uno de los diferentes tipos patológicos de VNC, que empleados en las técnicas convencionales de ELISA y IH, sirven como un gran auxiliar para el diagnóstico rápido e identificación específica, de las distintas cepas de campo, sean velogénicas, mesogénicas o lentogénicas del virus de la enfermedad de Newcastle (Moreno, 1994).

2.2.9.3.2. Inhibición de la hemaglutinación (HI)

La prueba de HI es una prueba que detecta tanto IgG e IgM, es decir permite una detección temprana de respuesta inmune, requiere para su ejecución de glóbulos rojos de aves así como de 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 es 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 (ICA, 2009).

2.2.9.3.3. Diagnostico directo

2.2.9.3.4. Aislamiento del virus de Newcastle en embrión de pollo SPF (Libres de patógenos específicos).

El aislamiento viral se hace mediante la inoculación de tejidos o hisopos en huevos embrionados de 9 a 11 días de incubación. Para esta prueba suspensión de tejidos o hisopados filtrados con antibiótico, cuyo sobrenadante será inoculado vía cavidad alantoidea; usando 5 huevos embrionados por caso. Los huevos son incubados por un periodo de 5 a 7 días a 37° C y son revisados diariamente en el ovoscopio con el fin de determinar la muerte de los embriones. El líquido alantoideo de los huevos muertos o que sobrevivan a la inoculación se enfrenta a glóbulos rojos de pollos SPF preparados en una dilución del 10% para detectar la presencia de un virus hemaglutinante (Abad, 2006)

Los aislamientos virales siempre deben estar respaldados por pruebas biológicas, tales como el Índice de Mortalidad Media Embrionaria (IMME), el Índice de Patogenicidad Intracerebral (IPIC), o por pruebas moleculares, como el RT-PCR

o secuenciación, para definir si el virus aislado corresponde a una cepa de alta o de baja virulencia (ICA, 2009).

2.2.9.3.5. Pruebas moleculares para la determinación de la virulencia

La RT-PCR semi-anidada empleada para la detección del NC está diseñada para la amplificación de una región del gen F, el cual codifica para la glicoproteína de fusión (F), responsable de la unión entre la membrana celular y viral, y la subsiguiente penetración del genoma del virus. 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 (Alexander, 1997).

La secuencia de aminoácidos de esta glicoproteína difiere entre las cepas de alta y baja virulencia, en los residuos de aminoácidos donde sucede el clivaje, brindándoles a las cepas de alta virulencia una mayor capacidad de ser clivadas por mayor número de proteasas celulares que las de baja virulencia (Abad, 2006).

El PCR está diseñado para que los primers se anillen justo sobre la región de la proteína de fusión donde varían en secuencia las cepas de alta y las de baja virulencia, y que corresponden en términos de aminoácidos a la región contenida entre los residuos 111 a 119 (ICA,2009).

2.2.9.3.6. Pruebas biológicas para la evaluación de la patogenicidad

Debido a la presencia diseminada de cepas lentogénicas del virus de NC en aves comerciales junto con la amplia utilización de cepas lentogénicas en la elaboración de vacunas vivas, se hace necesario hacer una mayor caracterización del virus a través de pruebas de laboratorio in vivo. Para este propósito, se cuenta con tres pruebas en la actualidad.

2.2.9.3.7. Índice de patogenicidad intracerebral en pollitos de 1 día (IPIC)

Se inoculan 10 pollitos SPF de un día de edad con 0.05 ml de 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 (Chen, 2002).

El valor máximo que se puede obtener es de 2.0. $IPIC > 0.7$ indica virus de alta patogenicidad y son de notificación obligatoria a la OIE. $IPIC < 0.7$ indica virus de baja patogenicidad (Chen, 2002).

2.2.9.3.8. Índice de patogenicidad intravenosa en pollos de 6 semanas (IPIV)

Se inoculan 10 pollos SPF de 6 semanas de edad a nivel de la vena braquial con 0.1 ml de 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 del aislamiento estudiado (ICA, 2009).

El valor máximo de esta prueba es de 3.0. 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. Se inocula 0.1ml de una dilución entre 10^{-5} a 10^{-10} del líquido alantoideo en la cámara de aire. Los embriones son observados durante un tiempo máximo de ocho días (ICA, 2009).

Para determinar el patotipo del aislamiento viral se compara de acuerdo a lo siguiente:

- Aislamiento Velogénico: menos de 60 horas.
- Aislamiento Mesogénico: entre 60-90 horas.

- Aislamiento Lentogénico: más de 90 horas.
- Aislamiento Asintomático: más de 90 horas (ICA, 2009).

2.2.9.4. Diagnóstico diferencial

Específicamente con infecciones virales tales como: Bronquitis infecciosa, Laringotraqueítis, enfermedad respiratoria crónica y coriza infecciosa principalmente Metaneumovirus (Acosta, 2014).

2.2.10. Tratamiento

No hay un tratamiento específico sin embargo puede lograrse la recuperación de las aves realizando prácticas zootécnicas que eviten periodos de estrés en la parvada (Moreno 1994).

2.2.11. Prevención y Control

Los principales factores a tener en cuenta en el control es la diseminación de la enfermedad así como las condiciones bajo las cuales las aves son criadas y el grado de bioseguridad practicado en las explotaciones avícolas (Alexander, 1997).

La bioseguridad es la mejor defensa contra las enfermedades. De no cumplirse con las mismas de nada valdrían las técnicas de diagnóstico avanzadas y la producción de vacunas. La sola prevención permite lograr que el ave manifieste su potencial biológico productivo (Cuello et al., 2011).

Las fuentes y vías de transmisión son los factores que esencialmente facilitan que los agentes se transmitan de una unidad a otra. En esto influyen los animales infectados, los fómites, el agua y el alimento contaminado, la yacija y otros desechos de la crianza. Además, el hombre es otro factor en la transmisión de esta enfermedad ya que las visitas a las granjas por personal especializado son inevitables, lo que implica un reforzamiento en las medidas de higiene y desinfección (Cuello et al., 2011).

2.2.12. Vacunación

La vacunación constituye la herramienta profiláctica más efectiva y menos costosa para el control de las enfermedades infecciosas (Huang, Elankumaran, Panda, & Samal, 2003) y el uso combinado de vacunas vivas atenuadas e inactivadas induce en las aves una mayor protección frente a los agentes infecciosos. La inmunización de las reproductoras reviste una especial importancia pues estas le confieren a la progenie una inmunidad pasiva que puede protegerla durante las primeras semanas de vida (Cuello et al., 2011).

2.3. INFLUENZA AVIAR

2.3.1. Importancia Económica de Influenza Aviar

Las pérdidas económicas por IA han variado dependiendo de la cepa viral, especie del ave infectada, número de granjas involucradas, métodos de control usados y rapidez de implementación del control o estrategias de erradicación. Las cifras, por ejemplo, varían desde 1 millón de dólares durante 1924-1925 en US a 63 millones en 1983-84 también en US y en el brote de Italia de 1999-2000 las pérdidas indirectas fueron de 500 millones de dólares (Swayne & Halvorson, 2003).

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) confirmó que un pato silvestre de Montana había muerto por la cepa H5N2, una cepa altamente patógena que en 2015 afectó a granjas en 15 estados y llevó a la eliminación de más de 43 millones de aves, Con unas pérdidas económicas estimadas en 3.300 millones de dólares (Soucheray, 2017).

2.3.2. Etiología

El virus de influenza pertenece a la familia Orthomyxoviridae y se clasifica en tres tipos A, B y C basándose en las diferencias antigénicas de las proteínas de la matriz y del núcleo. Son virus esféricos o pleomórficos (a veces se presentan

algunas formas filamentosas) de hasta 120 nm de diámetro; presentan una envoltura derivada de la célula huésped (Swayne & Halvorson, 2003).

2.3.2.1. Propiedades biológicas

2.3.2.1.1. Resistencia a la acción física y química

• **Temperatura:** Inactivación 56°C/3 horas; 60°C/30 min
pH: Inactivado a pH ácido

• **Productos químicos:** Inactivado por agentes oxidantes, dodecil sulfato de sodio, disolventes de lípidos, β-propiolactona

• **Desinfectantes:** Inactivado por formalina y compuestos de yodo
Supervivencia: Sigue siendo viable durante mucho tiempo en los tejidos, las heces y el agua. Se ha demostrado que las aves infectadas por el virus de influenza H5N1, pueden eliminarlo en grandes cantidades en las heces, y el virus puede sobrevivir por lo menos 35 días a 4°C en las heces. El virus sobrevive indefinidamente en congelación (Swayne & Halvorson, 2003) .

2.3.2.2. Clasificación del virus

Todos los virus de Influenza Aviar pertenecen al tipo A, los cuales se dividen en varios subtipos dependiendo de la estructura de dos proteínas de superficie, la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N). Se han descrito hasta 16 diferentes subtipos dependiendo de la Hemaglutinina (H1... H16) y 9 subtipos diferentes en función de la proteína Neuraminidasa (N1... N9), (Cuello et al., 2011).

El genoma del virus influenza está compuesto por 8 segmentos de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa, y para que un virus sea infectivo necesita una copia completa de cada uno de estos ocho segmentos de RNA. Cuando una misma célula es infectada por dos virus de influenza distintos, los segmentos de RNA

pueden reagruparse al azar resultando un subtipo de virus influenza diferente (Acosta, 2014).

El virus también se clasifica dependiendo del proceso patológico; así, se dividen en virus de baja, media y alta patogenicidad. El de baja o media pueden tener uno de los 16 subtipos de hemaglutinina y suelen cursar con procesos respiratorios y entéricos de mayor o menor gravedad dependiendo del virus, mientras que los de alta cursan con procesos sistémicos produciendo alta mortalidad. Desde 1955 hasta la actualidad los subtipos que pueden producir el cuadro de “Influenza Aviar de Alta Patogenicidad” (IAAP) son el H5 y el H7 (Abad & Pizarro, 2006).

2.3.2.3. Características del Virus

La superficie vírica, es decir la envoltura, está recubierta por proyecciones o espículas de glucoproteína. Es precisamente esta envoltura la que alberga la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA), y la proteína M2. Estas moléculas son la que se encuentran muy dispersas en la envoltura. La HA se encuentra en una proporción de 4-5 a 1 con respecto a la NA, tiene de 4 a 6 nm de diámetro y se proyecta por encima de la envoltura hasta 10 a 14 nm (Abad & Pizarro, 2006).

El espacio entre la envoltura y la cápside viral es ocupado por la proteína matriz (M1). El centro mismo de la partícula viral lo conforman el complejo de ribonucleoproteína (RNP), que está compuesto por los 8 segmentos de RNA del genoma viral (Influenza A), las proteínas polimerasa (PB1, PB2 y PA: polimerasa básica 1, polimerasa básica 2 y polimerasa ácida, respectivamente) y la nucleoproteína (NP). La composición global de la partícula viral es 1% de RNA, 5-8% de carbohidratos, 20% de lípidos y cerca de 70% de proteína (Talledo & Zumaeta, 2010).

2.3.2.3.1. Proteínas víricas

La hemaglutinina (HA) es el componente más importante, que representa el 25% del total de las proteínas de virus. Se dispone como un trímero en forma de bastón, formado por tres polipeptidos de 500 aminoácidos, cuya forma nativa (HA₀) es

escindida en dos fragmentos (HA₁ y HA₂) que permanecen unidos por puentes de disulfuro, siendo esta circunstancia esencial para la infección y condicionante del poder patógeno del virus (Abad & Pizarro, 2006).

La HA facilita tanto la unión como la penetración del virus a la célula hospedadora. La porción HA₂ es la responsable de la función de la envoltura vírica y la membrana celular (o la del endosoma), mientras que la HA₁ contiene los sitios de unión a los receptores de la célula hospedadora y, varios dominios antigénicos principales (Rodríguez, 2015).

2.3.2.3.2. La hemaglutinina

La HA es el antígeno más importante del virus y uno de los condicionantes de su infecciosidad y patogenicidad (Rodríguez, 2015). Es el que reconoce los residuos de ácido siálico en la membrana celular y son los receptores para que el virus pueda hacer el primer contacto con la célula e iniciar la infección; además, es responsable de la penetración del virus, de su patogenicidad y de su virulencia (Herrero, 2008).

2.3.2.3.3. La neuraminidasa

La Neuraminidasa (NA) es una glucoproteína de membrana de tipo II, en conjunto presenta forma de hongo o champiñón y está anclada a la membrana externa o envoltura vírica por sus aminoácidos terminales. La NA representa alrededor del 5% del total de proteínas del virus, funcionalmente es una enzima (N-acetil-neuraminilhidrolasa), juega un papel esencial en la liberación del virus desde las células infectadas y en su difusión por el sistema respiratorio (Rodríguez, 2015).

Es una enzima que elimina residuos de ácido siálico de la membrana celular y tiene la función de liberar el virus de las células, y los anticuerpos también son importantes en el control de la infección. Estas dos glicoproteínas son las que más sufren de variación antigénica, ya que los anticuerpos producidos contra las variantes anteriores no son tan específicos ni ávidos para las nuevas (Herrero, 2008).

2.3.2.3.4. El genoma vírico y el ciclo de replicación del virus

El genoma vírico está constituido por varios fragmentos de ARN mc y de sentido negativo, los virus influenza A presentan 8 fragmentos de ácido nucleico y cada uno de ellos codifica para una o varias proteínas (estructurales y no estructurales): los tres fragmentos mayores (fragmentos 1,2 y 3) codifican para el complejo ARN polimerasa o transcriptasa (el segmento 1 para la PB2, el segmento 2 para la PB1 y el segmento 3 para la PA, respectivamente) (Rodríguez, 2015)

La hemaglutinina (HA) esta codificada por el segmento 4 y el 5 lo hace para la nucleoproteína (NP). El segmento 6 codifica para la neuraminidasa (NA) y el 7 lo hace para las proteínas M1 y M2, de la matriz. Finalmente, el segmento 8 expresa las proteínas no estructurales NS1 Y NS2 (Herrero, 2008).

La infección se inicia con la adherencia de los viriones a las células susceptibles, en la que intervienen las espículas de HA que se unen a receptores mucoproteicos específicos (glicoproteínas y glicolípidos de la membrana celular), que contienen ácido siálico terminal (Talledo & Zumaeta, 2010).

Después de las partículas víricas se engloban mediante endocitosis en endosomas en cuyo interior los virus están sometidos a un pH 5, como consecuencia de la entrada de iones por el canal formado por la proteína M2, este pH, juntamente con las proteasas, induce cambios drásticos en la conformación de la HA que origina la fusión de las membranas y termina por originar el desprendimiento y pérdida de la cubierta vírica, con lo que la nucleocapsida se libera en el citoplasma celular (Flint, et al, 2000).

Las ribonucleoproteina se digieren al núcleo de la célula, mientras que se inicia el proceso que tiene como final la réplica del material vírico (Flint et al., 2000).

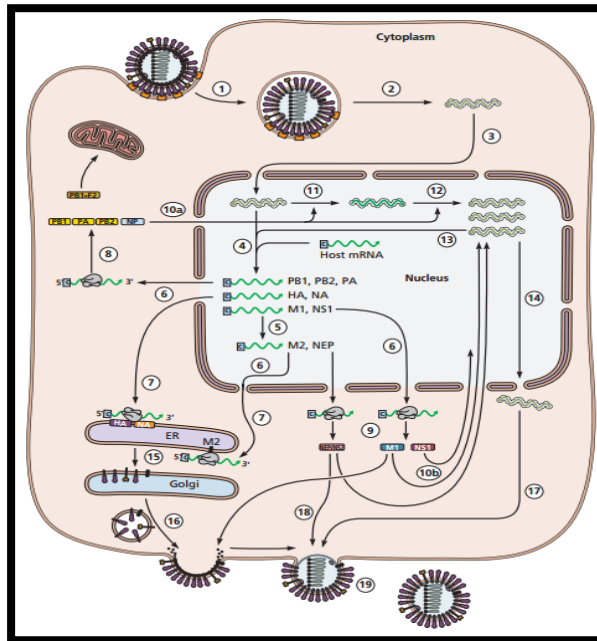


Figura 1. Replicación del virus de Influenza Aviar (Stroud et al, 2006).

La condición de ARNmc(-) del material genético vírico obliga a la síntesis de ácido nucleico complementario (+) que será utilizado como mensajero para la transcripción de nuevo material genético vírico, proceso que tiene lugar en el núcleo de la célula, funcionando las proteínas PB1, PB2 Y PA como ARN polimerasas (ARN transcriptasas). La replicación de cada uno de los 8 fragmentos genómicos del virus es independiente, lo que en caso de coinfección permite la mezcla en la progenie (Rodríguez, 2015).

La nucleoproteína se sintetiza en el citoplasma y después se transporta al núcleo, donde se une al ácido nucleico para formar la RNP. El ensamblaje de las nucleocapsidas se produce en el citoplasma y los viriones recién formados migran hacia la membrana celular, en cuya superficie interna se asocia la proteína M1 y las HA y NA se incorporan, como la envoltura lipídica, en el curso de la gemación por la que se libera el virus, la liberación vírica, supone la muerte de la célula (Flint, 2000).

2.3.2.3.5. Respuesta inmune

La respuesta celular se dirige fundamentalmente frente a la nucleoproteína y la proteína de la matriz mayoritaria (M2) contribuyendo a la eliminación del virus y a la recuperación de la infección. Después de la infección el primer isotipo en aparecer es IgM seguido de IgA y de IgG. Los IgM son muy eficientes en la agregación de partículas víricas y para facilitar la lisis de las células infectadas mediante la concurrencia con el sistema del complemento (Herrero, 2008).

La participación de células Th (linfocitos T auxiliares CD4+) en la respuesta celular contribuyen a la eliminación de la infección en sus primeras etapas estimulando la producción de anticuerpos y citoquinas y la proliferación de Tcitotóxicas habiéndose descrito que Th específicas para la nucleoproteína o la M2 pueden estimular células B específicas para la HA. El Tc (CD8) matan las células infectadas por virus cuando reconocen los péptidos víricos vía MHC-1 colaborando en la eliminación de virus del tracto respiratorio y facilitando la recuperación (Rodríguez, 2015).

2.3.3. Patogenicidad y Periodo de Incubación

La Influenza Aviar (IA) Altamente Patógena adoptada por la Unión Europea y por Argentina, es infección de las aves, producida por cualquier virus de la Influenza Aviar tipo A, cuyo índice de patogenicidad intravenosa (IPIV) sea superior a 1,2 en pollitos de seis semanas de edad, o cualquier infección provocada por virus del subtipo H5 o H7 de la Influenza A cuya secuenciación de nucleótidos haya demostrado la presencia de múltiples aminoácidos básicos en el punto de corte de la hemoaglutinina” (Swayne & Suarez, 2000).

En estudios experimentales, virus de IA altamente patógenos para pollitos, generalmente son no patógenos para patos y gansos (Alexander, 1997; Swayne & Suarez, 2000).

De todos modos este virus va a ser altamente patógeno para otras aves dentro del orden Galliformes, familia Phasianidae, como pavos o codornices. El periodo

de incubación es variable (desde horas a 7 días, de ordinario entre 3 y 4 días) la enfermedad hace su aparición de forma súbita, con elevada mortalidad (superior al 90%, incluso del 100%) (Alexander,1997).

Descripción de la IA AP según (Swayne & Halvorson, 2003; Swayne & Suárez, 2000).

- Cualquier virus de influenza que es letal para seis, siete u ocho de ocho (≥ 75 %) aves susceptibles de cuatro- a seis semanas de edad dentro de los diez días a partir de la inoculación intravenosa con 0.2 ml de una dilución de 1:10 de fluido alantoides infeccioso libre de bacterias.
- Cualquier virus H5 o H7 cuya dosis no reúne el criterio a), pero tiene una secuencia de aminoácidos en el sitio de clivaje de la H que es compatible con los virus de IA AP.
- Cualquier virus de influenza que no sea un subtipo H5 o H7 y que mate de uno a cinco de las ocho aves inoculadas y crezca en cultivos celulares en ausencia de tripsina.

2.3.4. Epidemiología

El origen de la infección y su mantenimiento hay que buscarlo en las aves silvestres y migratorias, principalmente anseriformes (gansos, patos y afines) y charadriiformes (charranes, gaviotas y afines), que actúan como reservorios y, a la vez, vectores principales, excretando el virus por las heces y secreciones respiratorias, difundiéndolas en zonas libres y otras aves. Estas especies silvestres se pueden considerar los hospedadores naturales del virus y su reserva genética; perpetúan los virus de baja patogenicidad y se consideran recientes a los virus de alta patogenicidad (Rodríguez, 2015).

En definitiva pues, a partir de las aves silvestres acuáticas se infectan otras aves y mamíferos (terrestres y acuáticos, incluyendo al hombre) y las primeras pueden infectarse, igualmente a partir de las domesticas, transportando el virus en sus

migraciones. Una de estas aves infectadas puede eliminar virus en heces hasta 30 días lo que unido a las paradas en su camino de migración en las que permanecen alrededor de 1 semana, facilitan la diseminación del virus a largas distancias (Alexander, 1997).

Se ha producido en los últimos meses una cierta confusión acerca de la resistencia de las aves silvestres para los tipos hipervirulentos. Lo cierto es que desde los brotes asiáticos de 2002 el subtipo H5N1 de alta patogenicidad ha sido la causa de tasa altas de mortalidad en aves acuáticas en parques de recreo, domésticas y migratorias salvajes, rompiendo el estatus evolutivo con sus hospedadores naturales y planteando la cuestión de si las aves acuáticas podrían o no actuar como reservorios de patos salvajes replicaban mejor en el tracto respiratorio (en la tráquea) que en el digestivo (cloaca) observando además que la patogenicidad variaba desde virus completamente apatógenos hasta virus letales, correlacionando con los títulos traqueales (Rodríguez, 2015).

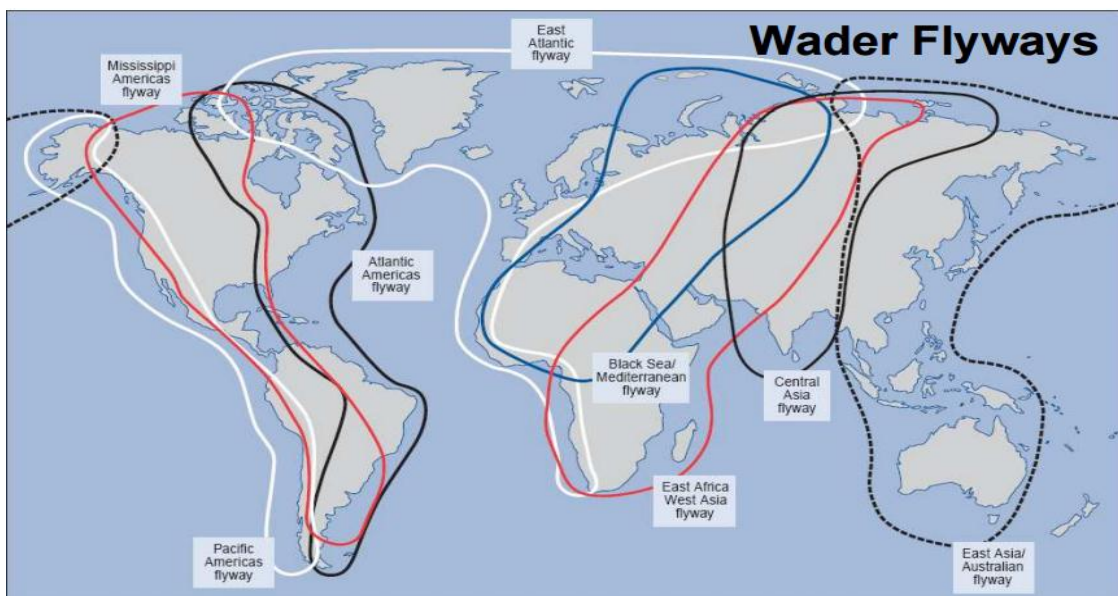


Figura 2. Cronograma de distribución de las aves migratorias (Stroud, Veen, & Diagana, 2006) .

Por otra parte, para tratar de comprobar la patogenicidad de virus aislados de distintos brotes, los aislados apatógenos se transmiten eficientemente a los contactos, sugiriendo que H5N1 altamente patógeno (HP) que causan signos mínimos en los patos pueden propagarse silenciosa y eficientemente entre los

patos salvajes y domésticos en Asia y pueden representar un riesgo grave para la salud pública humana y animal (Rodríguez, 2015).

2.3.5. Transmisión

La transmisión del virus de la IA entre las aves varía con la patogenicidad de la cepa, la susceptibilidad de la especie aviar, la edad del individuo afectado, el medio en el que se encuentran y la presencia de infecciones secundarias (Swayne & Suarez, 2000).

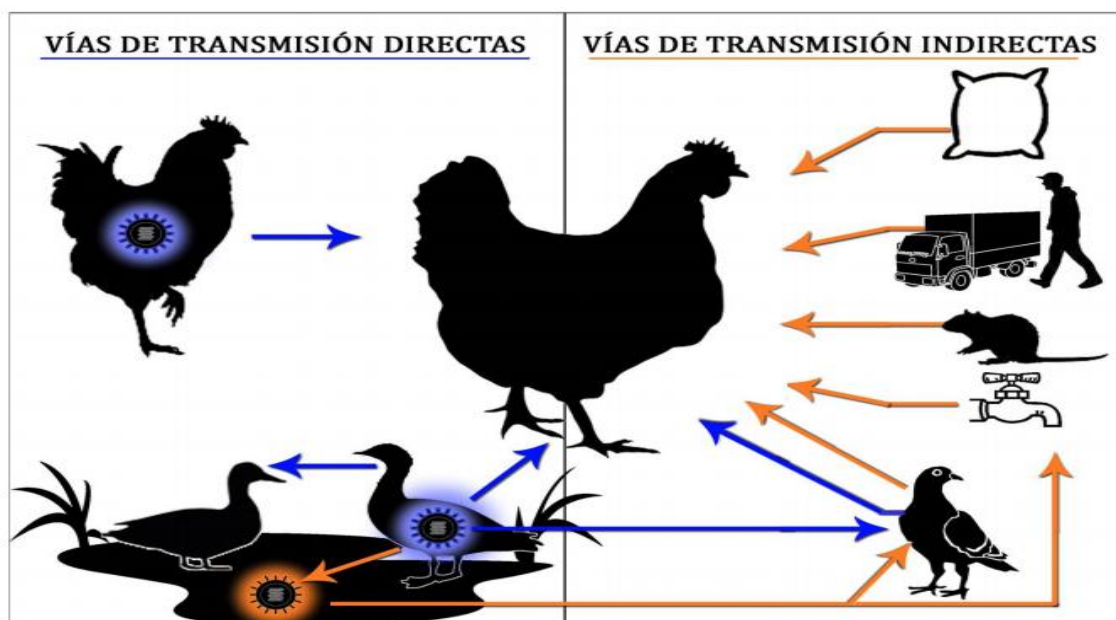


Figura 3. Esquema de las vías de transmisión directas vía (azul) e indirecta vía (naranja) (Iglesias, 2011)

Existen dos tipos de transmisión

- **La transmisión directa**, que tiene lugar a través del contacto directo con aves infectadas. Las vías de contagio más importantes son la fecal-oral y la vía respiratoria. La vía conjuntival también ha sido reconocida, aunque no es la habitual (EFSA, 2008).

La más común es la intra especies, ej. Humano a humano, porcino a porcino, aves a aves, etc. (Slemons, Shieldcastle, Heyman & Bedmarik, 1991). Ocasionalmente es inter especies e intra clases, ej. porcinos a humanos, patos silvestres a pavos domésticos, etc. y recientemente, pero muy raro se ha comprobado inter especies e intra clases, ej. aves a humanos, aves a porcinos, etc. (Buscaglia, 2004).

Las heces y secreciones respiratorias de aves infectadas (ej. aves acuáticas, en las dos primeras semanas de infección) pueden producir grandes cantidades de virus frecuentemente defecadas directamente en el agua. Por eso la contaminación del ambiente acuático parece ser el método más eficiente de transmisión del virus (Senne & Pearson, 1992).

- **La transmisión indirecta**, que también puede producirse e por:
 - Equipos (contaminados)
 - Calzados y ropa (mecánica)
 - Aire
 - Aves: en mercados, exhibiciones, traspatio (avicultura rural), diversión (gallos de riña)
 - Aves comerciales

Por eso la exposición de las aves comerciales a aves acuáticas migratorias y movimientos internacionales de aves, equipo de granja y personas incrementan el riesgo para la introducción de cepas de IA (Buscaglia, 2004).

Los mercados de aves vivas son un reservorio de infección porque sirven como un punto focal para juntar y alojar muchas especies de aves. En cuanto a los virus de IA AP no se les conoce reservorio alguno entre la fauna salvaje, pese a que de vez en cuando, en el curso de brotes entre aves de corral domésticas, han aparecido en muestras tomadas de aves salvajes (Senne & Pearson, 1992).

2.3.6. Signos Clínicos

Los signos de la enfermedad son en extremo variables y dependen de la especie afectada, edad, sexo, infecciones concomitantes, virus, factores ambientales, ubicación en el organismo, entre otros. Las infecciones pueden variar clínicamente en: subclínicas (no patogénicas), respiratoria aguda y/o urogenital (baja patogenicidad) y enfermedad sistémica severa (alta patogenicidad). Por lo tanto la IA puede manifestarse como una enfermedad respiratoria, entérica, reproductiva o neurológica (Hooper & Selleck, 2003).

Los signos clínicos descritos pueden incluir descenso en la producción de huevos, huevos en fáfara o deformados, hinchazón de la cabeza, párpados, cresta, barbillones y garrones; cianosis de los barbillones, crestas y patas; problemas respiratorios con descargas nasales claras, mucopurulentas o sanguinolentas; tos; trastornos nerviosos, incoordinación; plumaje erizado; inapetencia; depresión y diarrea. Cualquiera de estos signos se puede producir solo o en varias combinaciones (Kobayashi et al, 1996. y Mo et al., 1997).

En caso de explotaciones de aves a piso, aparición repentina de mortalidad elevada, transmisión rápida dentro del galpón y depresión severa sin consumo de alimento, mientras que aves en jaula, se observa una transmisión lenta dentro del galpón, mortalidad del 100% en 10 a 15 días y depresión colis, opistótonos, imposibilidad de pararse, temblor de cabeza y cuello, severa, en ambos casos existe presencia de signos nerviosos, edemas y hemorragias (Senne & Pearson, 1992).

2.3.7. Alteraciones Patológicas

El cuadro anatomopatológico puede presentarse incluso sin lesiones, pero en todo caso de septicemia hemorrágica se puede observar petequias en vías respiratorias, patas e intestinos y edema subcutáneo generalizado, no siendo raro observar focos de necrosis en hígado, riñones, bazo y pulmones y una apariencia general de animales desnutridos y deshidratados (Hooper & Selleck, 2003).

El virus produce alteraciones en la coagulación de la sangre que causa en los vasos sanguíneos y, consecuentemente, hemorragias. Se observa agregación plaquetarias y formación de trombos. Si se trata de patogenicidad baja o moderada se observa lesiones respiratorias leves traqueítis, bronquitis, neumonía y ocasionalmente conjuntivitis (Buscaglia, 2004).

2.3.8. Diagnóstico

2.3.8.1. Diagnóstico clínico

Se realiza mediante la detección de lesiones macroscópicas en comparación con diagnóstico en aves experimentalmente infectadas con IA y que de acuerdo a Swayne y Suarez, (2000) son las que se describen a continuación:

- Hemorragia y edema en el pulmón
- Severa hinchazón de cabeza, cresta y barbillones por edema subcutáneo
- Edema, necrosis y hemorragia de la cresta y barbillones
- Conjuntivitis con edema de cresta, barbillones y área periorbital y necrosis de las puntas de la cresta
- Severas hemorragias subcutáneas y edema de dedos y cañas
- Engrosamiento de dermis por edema de la pata
- Petequias en la grasa del epicardio.
- Hemorragias en tejidos linfoides de placas de Peyer y el divertículo de Meckel del yeyuno.
- Hemorragia subcutánea rodeando conductos y glándulas en proventrículo

Los procedimientos habituales de diagnóstico de laboratorio incluyen aislamiento e identificación del virus, la detección antigénica y procedimientos moleculares (PCR o RT –PCR).

Un protocolo de trabajo comienza con la toma de muestras a partir de animales enfermos o de cadáveres. Suele utilizarse escobillones o hisopos que se impregnan de material intestinal (cloaca), directamente heces o bien, como se ha señalado antes, a partir de la tráquea. En ocasiones se utilizan también, extracciones de sangre para el estudio de anticuerpos en el suero de aves

sospechosas. Todas estas operaciones deben llevarse a cabo con equipo protector adecuado, incluyendo botas, mascarillas y guantes, barreras primarias de protección elementales en el caso de cualquier tipo de enfermedad infecciosa y, mucho más, en caso como este, susceptibles de contagio al hombre. En el laboratorio, puede optarse por el aislamiento del virus, por la determinación del ácido nucleico (RT-PCR) o el estudio de la presencia de anticuerpos, caso de que haya obtenido muestras de sangre.

El aislamiento incluye inoculación de 9-11 embriones de pollo, preferentemente SPF, a los que se investiga por hemoaglutinación con anticuerpos específicos. Caso positivo se determina su título mediante inhibición de la aglutinación y RT-PCR. A partir de este momento se procede a subtipado HN mediante RT-PCR y pruebas de inhibición de la hemoaglutinación y de la neuraminidasa llevando a cabo complementariamente estudios del índice de patogenicidad intravenoso y de la secuencia del punto de escisión de la hemaglutinina, lo que permitirá el establecimiento del nivel de patogenicidad del virus. Las determinaciones iniciales por PCR y de la presencia de anticuerpos, proporcionan información complementaria de gran utilidad (Rodríguez, 2015).

a) Prueba de Inmunodifusión en agar gel

La prueba de inmunodifusión en agar gel se convirtió el standard internacional para el diagnóstico serológico y vigilancia al inicio de la década del 70 (Beard, 1970. Citado por Buscaglia, 2004). En 1972, se demostró que el principal reservorio y el huésped natural para virus de IA MP eran aves acuáticas silvestres del orden Anseriformes (Shortridge, 1999) y en 1979, el clivaje de la hemaglutinina se identificó como el mayor determinante de la virulencia de virus de IAAP (Bosch, 1979. Citado por Buscaglia, 2004).

2.3.8.2. Diagnóstico diferencial

Debe descartarse la presencia de otros procesos respiratorios y septicémicos que cursan con clínica similar o parecida, en particular la presencia la infección por el virus de la enfermedad de Newcastle.

El diagnóstico diferencial se lo realiza con:

- Newcastle
- Bronquitis infecciosa.
- Laringotraqueitis
- Cólera Aviar
- Clamidiasis
- Micoplasmas

2.3.9. Prevención y Control

Las medidas de bioseguridad son fundamentales para su control y se comparten para el control de todas las enfermedades. A pesar de que el virus puede recobrase de la yema, cáscara y albúmina de los huevos, la transmisión vertical no ha sido demostrada.

Buscaglia (2004) señala las prácticas apropiadas de bioseguridad son la llave para prevenir la infección con virus de IA entre las principales cita.

- El manejo de los lotes “todo adentro, todo afuera” prevendrá la difusión del virus de un lote a otro.
- No deben permitirse el contacto de lotes de aves con aves migratorias, silvestres y deben mantenerse lejos de fuentes de agua que puedan haber estado contaminadas con aves silvestres.
- El personal y los equipos que entran y salen de las instalaciones deben estar desinfectados en forma apropiada a la entrada y salida y no deben intercambiarse entre instalaciones.
- La prevención de la exposición al virus y la erradicación son dos métodos aceptables para hacer frente a la IA al igual que la educación de los avicultores y métodos de monitoreo.

- La aplicación de programas de control, cuya lógica admite la presencia de la infección a niveles bajos de incidencia, no constituye un método de gestión aceptable en este caso, aunque ello no ha impedido recurrir a programas de ese tipo ante algunos brotes de IA AP.

2.3.10. Vacunación

Capua y Marangon (2003) mencionan que para algunos programas de control y erradicación de la IA se ha utilizado la vacunación, de la misma manera Capua, et al, (2000) ratifica que una vacunación estratégica permite la detección de infecciones por influenza en aves.

2.4. OTROS TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN RELACIONADOS CON EL TEMA

Villacis et al. (2015) en su estudio de determinación de la prevalencia de Newcastle en la región sur del Ecuador, para la que se realizó un muestreo aleatorio de 304 aves entre hembra y machos. Por lo que aplicaron la técnica de Elisa para el estudio de la prevalencia del virus en los biotipos de gallina criollas estudiadas. Los resultados le demostraron una prevalencia de 9,85 del virus, a pesar de que estas aves no tenían antecedentes de vacunación contra la enfermedad en mención. Los datos que obtuvieron les evidencian circulación viral en ausencia de sintomatología clínica asociada a la enfermedad.

Kubista et al. (2006) al realizar la evaluación de la integridad del ARN es un primer paso crítico en la obtención de datos significativos de expresión génica. Trabajar con ARN de baja calidad puede comprometer fuertemente los resultados experimentales de las aplicaciones aguas abajo, que a menudo requieren mucha mano de obra, consumen mucho tiempo y son muy caras. El uso de ARN intacto es un elemento clave para la aplicación exitosa de los métodos biológicos moleculares modernos, como qRT-PCR o análisis de micro-array.

Para verificar la calidad del ARN en la actualidad se dispone de sistemas de electroforesis capilar automatizados comercialmente disponibles que están en camino de convertirse en el estándar en la evaluación de la calidad del ARN. Los perfiles generados producen información sobre la concentración de ARN, permiten una inspección visual de la integridad del ARN y generan relaciones aproximadas entre la masa de subunidades ribosómicas.

Sabarinath et al. (2011), la Vigilancia Viroológica y Serológica de Animales Virus de la gripe en las aves de Benigno Granada, determino que el potencial zoonótico de los subtipos de la influenza circulante en las especies aviares subraya la importancia de la vigilancia del virus de la gripe en la población aviar. Hasta el momento sólo hay un estudio publicado en la región del Caribe sobre la presencia del Virus de la Influenza Aviar (AIV) en Barbados. En 2009-2010 se llevó a cabo un método de cribado basado en muestras de sangre y cloacal y traqueal para

estudiar la prevalencia de la influenza A en la penetración aviaria de Granada. Se recogieron 230 muestras de sangre y 230 hisopos traqueales y cloacales mixtos de pollo trasero (143), patos (45), pavo (10), pintada (1) y paloma (31). Las muestras se seleccionaron mediante RT-PCR, inoculación de embriones y ELISA para AIV. Ni RNA AIV fue encontrado por RTPCR ni el virus se pudo aislar en huevos embrionados. 27 muestras de sangre de pollos traseros fueron positivas para anticuerpos AIV.

Madsen et al. (2013) en un estudio transversal sobre la seroprevalencia y la bioseguridad de la gripe aviar, factores de riesgo en el patio trasero de Maryland Aves de corral: el mundo, los organismos gubernamentales están vigilando e inspeccionando cuidadosamente los mercados de aves vivas, las bandadas comerciales y las poblaciones de aves migratorias. Sin embargo, sigue habiendo una vigilancia limitada de las aves de corral no comerciales. Por lo tanto, se realizó un estudio transversal en bandadas de aves de corral de patio trasero utilizando un método de muestreo de conveniencia en tres regiones de Maryland de julio de 2011 a agosto de 2011. El análisis indicó que la seroprevalencia de aves y rebaños era del 4,2% (11/262) y del 23,1% (9/39), respectivamente. Basado en el análisis de RT-qPCR, ninguna de las muestras resultó ser positiva para el ARN de AI y no se detectaron los subtipos de hemaglutinina H5, H7 o H9 de la IA.

Aunque no se identificaron asociaciones de bioseguridad estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), la seroprevalencia AI se asoció positivamente con la exposición a aves acuáticas, control de plagas y ubicación. Las parvadas seropositivas de IA expuestas a aves acuáticas tenían una probabilidad 3,14 veces mayor de ser positivas a la IA que aquellas no expuestas ($p = 0,15$). Las parvadas seropositivas de IA que no utilizaron el control de plagas fueron 2,5 veces más probabilidades de ser seropositivas a la IA en comparación con aquellas que lo hicieron y las parvadas seropositivas de IA localizadas en la región norte de Maryland tenían 2,8 veces más probabilidades de ser seropositivas que aquellas que estaban localizadas en otros lugares.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DELIMITACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó con muestras obtenidas de hisopado cloacal de gallinas, patos y gansos procedentes de crianza de traspatio, en la Provincia de El Oro. Esta provincia es de ubicación estratégica ya que cuenta con planteles industriales de aves en la zona de Balsas y concentración de aves de crianza casera en toda la provincia. La temperatura media anual en la zona costera es de 22 a 35°C y en altiplano de 22°C (Durán, 2014).



Figura 4. Mapa Provincial de El Oro (GAD, 2016)

3.2 TAMAÑO Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Se determinó que para obtener una muestra positiva al aislamiento viral, se tendría que recolectar al menos 298 muestras, este número se obtuvo asumiendo que la prevalencia en Influenza Aviar como una enfermedad exótica es de al menos 1%, toda vez que la prevalencia de ENC en la zona es igual a 8% (Villacis et al, 2014) por lo que se tomó la prevalencia más baja. Para determinar el tamaño de la muestra se aplicó el modelo teórico de la distribución binomial (Gonzales, 1987).

La fórmula usada fue:

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

Dónde:

n = número de muestras

p=prevalencia límite (1%)p=(0.01)

1-p = 1-0.01=0.99

α = (0.05)

(González A., 1986)

$$x = \frac{\log 0.05}{\log(1 - 0.01)}$$

$$x = \frac{\log 0.05}{\log 0.99}$$

$$x = \frac{-1.301030}{-0.004365}$$

$$x = 298 \text{ muestras}$$

3.3. LUGAR DE EJECUCIÓN Y PERIODO DE DURACIÓN

El estudio se realizó con la captura y toma de muestras de las aves: *Gallus gallus*, *Anas platyrhynchos* y *Anser anser* que se realizó en los alrededores de las granjas avícolas del altiplano orense donde se concentra la producción avícola comercial y la toma de muestras de aves cerca de los humedales de la provincia de El Oro. Las pruebas de aislamiento viral y detección de la actividad hemoaglutinante con eritrocitos de pollo al 0.7% se realizaron en el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de Lima - Perú. La duración para todo el estudio fue 12 meses.

3.4. VARIABLES

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

3.5. RECOPIACIÓN DE LA INFORMACIÓN

3.5.1 Método para obtener puntos de muestreo

Se empleo el software ARCGIS el cual es un Sistema de Información Geográfico, que permitio ingresar datos geo referenciados logrando representar el área de interés en forma de un mapa con su respectiva simbología.

3.5.2. Ubicación espacial de los humedales para muestreo

Como hábito de desarrollo de las aves migratorias y silvestres se determinó las zonas conocidas como humedales los cuales se los considera los siguientes:

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

3.5.3. Aves Muestreadas

Se muestrearon 300 aves de traspatio cercanas a humedales o sistemas hídricos de la provincia de El Oro, sin distinción de sexo ni edad, sin una posible vacunación a newcastle.

3.5.4. Colección y procesamiento de las muestras

Las visitas a los puntos de muestreo trazado fueron realizadas de 8 am hasta las 3 pm con el fin de recolectar la mayor cantidad de muestras. Se realizó la captura del ave al azar e inmediatamente se colecta. Las muestras obtenidas fueron de hisopado cloacal de aves utilizando hisopos estériles y luego se las colocó en viales estériles UTM, y fueron transportadas, hasta su procesamiento en el

laboratorio de Patología Aviar de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Mayor San Marcos de Lima – Perú.

3.5.5. Técnica de recolección de las muestras de heces

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

3.5.6. Análisis de Laboratorio

Los análisis de laboratorio se realizaron utilizando las siguientes técnicas:

Las suspensiones de hisopados obtenidos mediante clarificación por centrifugación a 1.000 rpm durante 20 minutos a una temperatura que no excedió los 25°C.

3.5.6.1. Procedimiento de aislamiento del virus de newcastle e Influenza Aviar en huevos embrionados de gallina SPF.

Se colectó 50 µl de cada muestra para formar grupos de 10 muestras cada uno, haciendo un volumen total de 2 ml aproximadamente por grupo, rotulándose cada uno con el código correspondiente. Una vez recolectado el sobrenadante se aplicó solución antibiótica en un volumen de 0.05 ml de penicilina-estreptomicina al 20% por ml de muestra.

Se incubaron las muestras de 6 a 8 horas a 4°C en embriones SPF de 9-11 días de edad. Se trabajaron pool (grupo) de 10 muestras por inóculo realizando tres repeticiones de cada uno de ellas. En 90 huevos embrionados, a los cuales se observó a través del ovoscopio si el huevo era fértil o infértil para su clasificación. Se localizó la cámara de aire y se la procedió a marcarla a 2 mm sobre la línea de la cámara de aire al lado contrario del embrión.

Se limpió la cáscara (con una torunda de alcohol yodado y sobre todo, la parte donde se va inocular), realizar un agujero con un punzón o taladro en el punto ya señalado anteriormente.

Se procedió a recolectar las muestras de campo de los UTM en jeringas individuales estériles se preparó el inóculo filtrando el contenido en filtro Millipore N° 0.22 μ , para posteriormente extraer 0.60 μ l de cada pool.

Luego el inóculo se introdujo 0.20 μ en cada huevo embrionado realizando las tres repeticiones. Se tapó el agujero con parafina y se colocó los huevos en la incubadora por 6 días en una temperatura de 37°C.

Se realizó el miraje de los huevos diariamente registrándose la mortalidad y el tiempo de muerte transcurrido tras la inoculación. Los huevos con embriones muertos fueron mantenidos en refrigeración hasta el día de la evaluación.

Aquellos embriones que sobrevivieron fueron sacrificados por refrigeración al sexto día (FAO, 2007^b).

3.5.6.2. Evaluación de la actividad hemoaglutinante del fluido alantoideo

Se evaluaron los huevos y sus respectivos embriones muertos después de la inoculación, los moribundos y todos los embriones que permanecieron vivos hasta el periodo final de la incubación se utilizaron para evaluar la actividad hemoaglutinante frente a eritrocitos de pavo o pollos al 0.7% (FAO, 2007^b).

Se hizo una incisión en la cáscara del huevo, por encima de la cámara de aire, con una tijera, se removió la cáscara que conforma la cámara de aire. Con la ayuda de una pipeta colectora y de una pinza estéril, se recolectó 50 µl del líquido alantoideo de cada embrión, colocándolo en una lámina porta objetos. Se enfrentó el líquido alantoideo con 50 µL de glóbulos rojos al 0.7% (FAO, 2007^b).

Se homogenizó la muestra esperando unos minutos para observar si la hemaglutinación (HA) era positiva. Las muestras con hemaglutinación negativa, se les realizó un segundo pasaje en huevos SPF repitiendo el mismo procedimiento mencionado anteriormente (FAO, 2007^b).

3.5.7. Factores de Riesgo del Virus de la Enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar

El conocimiento de los mecanismos de transmisión interespecies, como alternativa de mantenimiento de los microorganismos en la naturaleza y patogenicidad potencial para otros hospederos, es importante para identificar peligros y planificar estrategias de reducción de los riesgos asociados. De los virus influenza A se conocen 16 distintos subtipos de hemoaglutinas (H) y 9 de neuroaminidasas (N), de los cuales limitadas combinaciones han sido aisladas de los mamíferos y mucho menos ha establecido linaje. En cambio, todos los subtipos conocidos han sido identificados en las aves, en casi todas las combinaciones posibles, por lo cual se les considera el principal reservorio de virus influenza para otras especies, incluida la humana (Garcia & Ramos, 2006).

En Newcastle por ser endémico en la zona hay que identificar cuáles son los factores de riesgo para la presencia de esta enfermedad tomando en cuenta que se la tiene controlada aparentemente mediante la utilización de biológicos pero existen zonas que está en riesgo de contraer la enfermedad por la poca estructura y organización especialmente la avicultura de traspatio (Escudero et al., 2016).

3.6. ANALISIS ESTADÍSTICO

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

$$Pa = \frac{C+}{N} \quad (1)$$

Donde:

C+ = casos positivos

N = número total de muestras analizadas

$$IC95\% = p \pm Z_{\alpha/2} \times \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} \quad (2)$$

Donde:

p = prevalencia de Newcastle e Influenza Aviar

$Z_{\alpha/2}$ = valor z dado el nivel de confiabilidad del 95%, 1,96.

1 – p = individuos aparentemente sanos.

4. RESULTADOS

En el presente estudio se analizaron 300 muestras de hisopados de cloaca de *Gallus gallus*, *Anas platyrhynchos*, *Anser anser*, procedentes de crianza de traspatio en la provincia de El Oro. Para el análisis las muestras fueron agrupadas en pools considerando la especie y la zona que pertenece.

4.1. MUESTRAS RECOLECTADAS POR ESPECIE

Tabla 1. Especies muestreadas en la provincia de El Oro para determinar la presencia de NC e IA.

ESPECIE	MUESTRAS	%
<i>Gallus gallus</i>	265	88.33
<i>Anas platyrhynchos</i>	32	10.67
<i>Anser anser</i>	3	1
TOTAL	300	100

De las muestras colectadas de aves de traspatio del total de ellas el 88.3% fueron de la gallináceas (*Gallus gallus*), de patos (*Anas platyrhynchos*) 10.67 %, y el 1% de gansos (*Anser anser*).

4.2. AISLAMIENTO VIRAL DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR

Tabla 2 . Prevalencia total y por zonas de NC e IA en la provincia de El Oro

UBICACIÓN	NUMERO	PREVALENCIA	IC (95%)
Norte	56	0	0 - 5,84
Centro	78	0	0 - 4,57
Sur	166	0	0 - 2,15
TOTAL	300	0	0 - 1, 19

Fuente: El autor, 2017

En el cuadro anterior se evidencia los resultados de la prueba de HA (Hemoaglutinación), el número de muestras colectadas y la zona a la cual pertenecen, apreciando con claridad que las 300 muestras fueron negativas la hemoaglutinación con una prevalencia de 0%.

4.3. Presencia de NC e IA en la Parte Norte

Tabla 3. Prevalencia de la parte norte, por especies muestreadas de NC e IA en la provincia de El Oro

UBICACIÓN	ESPECIE	NUMERO	PREVALENCIA	IC (95%)
ZONA NORTE	<i>Gallus gallus</i>	36	0	0 - 8,84
	<i>Anas platyrhynchos</i>	20	0	0 - 16,0
	TOTAL	56	0	0 - 5,84

Fuente: El autor, 2017

En el presente cuadro 3 se muestra que de 56 muestras procesadas por aislamiento viral y realizado la hemoaglutinación, pertenecientes a la parte norte de la provincia de El Oro se determinó una prevalencia de 0 con un intervalo de confianza del (95%) que va de 0-5,84.

4.3.1. Presencia de NC e IA en la Zona Centro

Tabla 4. Prevalencia de la zona centro, por especies muestreadas de NC e IA en la provincia de El Oro

UBICACIÓN	ESPECIE	NUMERO	PREVALENCIA	IC (95%)
ZONA CENTRO	<i>Gallus gallus</i>	68	0	0 - 5,25
	<i>Anas platyrhynchos</i>	10	0	0 - 28,3
	TOTAL	78	0	0 - 4,57

Fuente: El autor, 2017

Según el muestreo presentado del cuadro 4 realizado en la parte centro de la provincia de El Oro se pudo establecer que el total de las muestras 78 nos resultó una prevalencia de 0 con un intervalo de confianza (95%) que va de 0 – 4,57.

4.3.2. Presencia de NC e IA en la Zona Sur

Tabla 5. Prevalencia de la zona Sur, por especies muestreadas de NC e IA en la provincia de El Oro

UBICACIÓN	ESPECIE	NÚMERO	PREVALENCIA	IC (95%)
ZONA SUR	<i>Gallus gallus</i>	161	0	0 - 2,22
	<i>Anas platyrhynchos</i>	2	0	0 - 77,6
	<i>Anser anser</i>	3	0	0 - 63,2
	TOTAL	166	0	0 - 2,15

Fuente: El autor, 2017

En el cuadro que antecede, las muestras recolectadas son 166 el parte sur de la provincia tomando el mayor número donde se concentra la mayor cantidad de producción avícola comercial que esta directamente ligado al tema de investigación se obtuvo prevalencia del 0% con un intervalo de confianza (95%) que va desde 0-2,15 %, siendo la gallina doméstica la especie más investigada o muestreada igualmente la gallina doméstica de traspatio.

4.4.PREVALENCIA TOTAL POR ESPECIES DE TRASPATIO

Tabla 6. Prevalencia total y por especies de NC e IA en la provincia de El Oro

ESPECIE	TOTAL DE MUESTRAS	PREVALENCIA %	IC (95%)
<i>Gallus gallus</i>	265	0	0 - 1,34
<i>Anas platyrhynchos</i>	32	0	0 - 9,95
<i>Anser anser</i>	3	0	0 - 63,2
TOTAL	300	0	0 - 1,19

De las especies analizadas *Gallus gallus* 265 muestras resultó una prevalencia del 0% con un intervalo de confianza (95%) que esta de 0-1,34. *Anas platyrhynchos* 32 con una prevalencia del 0% con un intervalos de confianza (95%) se estima 0-995. *Anser anser* del total de 3 muestras procesadas con prevalencia del 0% y un intervalo de confianza de 0- 1,19.Todas las muestras resultaron negativas a la hemoaglutinación, significando que no se pudo aislar Newcastle e Influenza Aviar de las aves de traspatio. Según los resultados de las pruebas de hemoaglutinación.

4.5.EVALUAR LA PATOGENICIDAD DE LOS VIRUS

Los resultados a la prueba de hemoaglutinación fueron negativos por lo que no fue posible aislar el virus de ninguna de las dos enfermedades

4.6.SECUENCIAR LAS CEPAS AISLADAS PARA EVALUAR SUS RELACIONES GENÉTICAS

No se logró aislar cepas de NC ni de IA por lo que no se pudo cumplir con esta variable

5. DISCUSIÓN

El presente estudio se llevó a cabo para determinar la presencia de los virus de Newcastle e Influenza Aviar en aves de traspatio. Los especímenes fueron negativos al aislamiento viral realizado por el método de inoculación en huevos embrionados de aves SPF, los fluidos alantoideos de huevos embrionados fueron negativos a las pruebas de hemoaglutinación realizadas en laboratorio.

Estos resultados se asemejan a los de Sabarinath et al. (2011) en el que los fluidos alantoideos de huevos embrionados fueron negativos a esta prueba de hemoaglutinación, pero al realizar la prueba de ELISA de los tejidos alantoideos e hisopados mixtos resultaron positivas y al realizar la prueba de confirmación de RT-PCR dieron negativo para ARN del AIV.

Los factores externos de la muestra pueden haber afectado la calidad del contenido de acuerdo a lo expuesto por EFSA, (2008) la mayor parte de las cepas de los virus de la Influenza Aviar son muy sensibles a las temperaturas altas, siendo la supervivencia del virus inversamente proporcional al aumento de temperatura. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la inactivación por calor puede estar disminuida por la presencia del material orgánico que protege al virus. Así mismo, Brown et al. (2009) relata que la mayoría de los virus alcanzan su mayor estabilidad en pH comprendidos entre 7,4 - 8,2. En el estudio realizado por Songserm et al. (2006) observaron la estabilidad del subtipo H5N1 altamente patógena (AP) en heces de pollo en diferentes condiciones ambientales, concluyendo que el virus se inactiva totalmente a los 30 minutos después de la exposición directa a la luz solar a una temperatura ambiental de 32-35°C, pero que conservaba su infecciosidad tras 4 días a la sombra a 25-32°C. Los virus Influenza se clasifican formalmente en tipos, subtipos y cepas. Debido a que en las aves acuáticas silvestres coexisten los 16 subtipos de hemaglutinina (HA) y 9 de neuraminidasa (NA), en ellas se pueden presentar cerca de 144 permutaciones. En los humanos hay 3 subtipos que están actualmente en circulación: H1N1, H3N2 y H5N1.

En la medición de la prevalencia de enfermedades Madsen et al. (2013) determinan que muchas variables contribuyen a las tasas de prevalencia de la

muestra tales como el método de prueba, la época del año, las diferencias climáticas, las tendencias migratorias, las especies y la edad de las aves acuáticas y las prácticas de manejo y exposición de la parvada; en el Ecuador se utilizan vacunas de virus vivo lentogénica en la crianza de tipo industrial y pocos la usan en la crianza familiar, lo que permite que las aves de traspatio estén expuestas a estas cepas vacunales (Ferrer et al., 2008).

Las cepas lentogénicas podrían estar creando ciclos de infección en aves de crianza no tecnificada e incluso puede incrementar la inmunidad de las aves expuestas. Según Samuel & Spradbrow, (1989) esta inmunidad es muy variable e insuficiente para resistir el desafío con una cepa velogénica. Pero estos datos difieren con los de Villacis et al. (2015) en el cual determinan que en ocho de nueve biotipos criollos estudiados en el sur del Ecuador se obtuvo seroprevalencia positiva con 9,85 % de 304 aves muestreadas sin haber recibido vacuna contra el virus de la enfermedad de Newcastle, pero que posteriormente estas cepas fueron secuenciadas por Muñoz et al. (2016) determinando que pertenecen a cepas lentogénicas o sea virus vacunal, sea esto por recibir vacuna o por exposición a este tipo de virus vacunal (Ferre et al., 2008).

La calidad de las muestras pudo verse afectado por la poca cantidad que pudo haber existido, ya que de acuerdo a Kubista et al. (2006) el realizar la evaluación de la integridad del ARN es un primer paso crítico en la obtención de datos significativos de expresión génica. Trabajar con ARN de baja calidad puede comprometer fuertemente los resultados experimentales que a menudo requieren mucha mano de obra, consumen mucho tiempo y son muy caras por lo que recomienda el uso de qRT-PCR que es capaz de detectar pequeñas cantidades de ARN.

6. CONCLUSIONES

- El análisis 300 muestras de hisopado cloacal y heces frescas procedentes de aves de traspatio de la Provincia de El Oro , y posterior inoculación en huevos embrionados SPF no se logró aislar el virus de las enfermedades de Newcastle e Influenza Aviar mediante la técnica de aislamiento viral, la prevalencia estimada fue de 0% con una confianza del 95% con un intervalo de 0 a 1.19%.
- El periodo de estudio estos virus no circularon en los puntos de muestreo de la provincia de El Oro, esto no indica que no exista la presencia de estos virus, ya que de acuerdo a la ecología del virus, zonas endémicas, cantidad de virus circulante, tipo de cepa viral, formas de colecta y transporte puede variar la prevalencia.
- La avicultura de traspatio especialmente la que esta en contacto con aves silvestres se considera un factor de riesgo para el ingreso de enfermedades entre ella Newcastle e Influenza Aviar.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar monitoreos serológicos permanentes en la Provincia de El Oro determinando puntos de muestreo cerca de explotaciones avícolas comerciales en diferentes épocas y así verificar la presencia del virus de Newcastle e Influenza Aviar.
- Realizar investigaciones de la capacidad de viabilidad de los virus ARN en los tubos de transporte, para garantizar el éxito de diagnóstico de laboratorio.
- Las muestras deben ser recolectadas de forma minuciosa evitando su contaminación.
- Para mantener un mayor control de Newcastle e Influenza Aviar se deben monitorear con más frecuencia todas las especies de aves incluidas aves silvestres, aves traspatio, aves de riña y las granjas avícolas comerciales, en especiales cuando estas aves presentas síntomas de enfermedad.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abad, C. & Pizarro, M. (2006). Influenza Aviar. Algunas consideraciones sobre el virus y la enfermedad. *Profesion veterinaria*, 16(63), 6-13.
2. Acosta, M. (2014). Enfermedad de Newcastle. *Amevea Ecuador*, 3(1), 1-6.
3. Alexander, D. (1997). Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae Infections. *Diseases of Poultry*, x, 541-570.
4. Alexander, D. (2000). Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, XIX(2), 443-455.
5. Alexander, D. (2001). Newcastle disease. *British Poultry Science*, 42, 5-22.
6. Alexander, D. (2003). Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviridae Infections. *Diseases of Poultry*, XI(2), 63-87.
7. Al-Gariba, S., Gielkensa, A., Gruysa, E., & Kochi, G. (2003). Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination. *World's Poultry Science Journal*, 59(2), 185-200.
8. Beard C. & Hanson R. (1981). Newcastle disease. In: *Diseases of Poultry*, Eighth Edition, Hofstad M.S.
9. Bello, A. P., & Expósito, G. P. (2003). La avicultura de traspatio en zonas campesinas de la provincia de Villa Clara, Cuba. *Livestock Research for Rural Development*, 15, 2.
9. Buendía, R. (2014). Detección del virus de la enfermedad de newcastle en patos criollos de traspatio., (págs. 4-8). Lima. Buscaglia, C. (2004). Influenza Aviar. *InVet*, 6(1), 1668-3498.
10. Brown, J., Goekjian, G., Poulson, R., Valeika, S., & Stallknecht, D. (2009). Avian influenza virus in Water: Infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. *Veterinary Microbiology*(136), 20-26.
11. Capua, I., & Marangon, S. (2003). Vaccination policy applied for the control of avian influenza in Italy. *Dev Biol. Basel*, 114, 213-219.
12. Capua, I., Mutinelli, F., Bozza, M. A., Terrigno, C., & G., C. (2000). Highly pathogenic avian influenza (H7N1) in ostriches (*Struthio camelus*). *Avian Pathol*, 29, 643-646.

13. Cisneros, M. (2002). Aves de traspatio modernas en Ecuador. Avicultura familiar. FAO, 62.
14. Cuello, S., Vega, A., & Julia, N. (6 de Junio de 2011). Actualizaciones sobre la enfermedad de Newcastle. *Redvet*, 12(6), 2.
15. Czeglédi, A., Ujvári, E., Somogyi, E., Wehmann, O., Werner, B., & Lomniczi, B. (2006). Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Research*, 120(1-2), 36-48.
16. Chen JP, Wang CH. 2002 Clinical epidemiologic and experimental evidence for the transmission of Newcastle disease virus through eggs. *Avian Diseases*;46:461-5.
17. De Leeuw, O., & Peeters, B. (1999). Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J Gen Virol.* , 80(1), 131-136.
18. Doyle, T. (1927). A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filterpassing virus. *J. of Comp*(40), 144-169.
19. Durán, L. E. (2014). unicef. Recuperado el 10 de Marzo de 2017, de https://www.unicef.org/ecuador/LIBRO_DE_EL_ORO_Parte1.pdf
20. EFSA.(2008).Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from The European Commission on Animal health and welfare aspects of avian influenza and the risk of its introduction into the EU poultry holdings. *The EFSA Journal*, págs. 1-161.
21. Erickson, G., Brugh, M., & Beard, C. (1980). Viscerotropic velogenic Newcastle disease in pigeons. *Avian Diseases* , 24, 257-267.
22. Estudillo., J. (2000). Algunas consideraciones sobre la enfermedad de Newcastle. *Enfermedades Emergentes: Enfermedad de Newcastle. mexico: Productores avipecuarios.*
23. Escudero-Sánchez, G., Yaguana-Jiménez, J., Herrera-Herrera, R., & Herrera-Yunga, V. (2017). Factores de riesgo para el ingreso y difusión del virus de la enfermedad de Newcastle en el Ecuador. *Centro de Biotecnología*, 5(1).
24. [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2007b. Guía para la vigilancia que permita la detección temprana de Influenza Aviar de alta patogenicidad en América Latina y el Caribe. Conceptos y directrices. Proyectos FAO de Cooperación Técnica. Informe Técnico. 23 p.

25. Ferrer, R., Icochea, E., Salas, A., & Alba., M. (2008). Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle en Gallus gallus de Lima. Estudio de caso-control. *Rev Inv Vet Perú*, 19(1).
26. Flint, J., Racaniello, V. R., Rall, G. F., & Skalka, A. M. (2000). Principle of virology (Cuarta ed.). Washington: Molecular Biology.
27. García-García, J., & Ramos, C. (2006). La influenza, un problema vigente de salud pública. *salud pública de México*, 48(3), 244-267.
28. Gonzales, A. (1987). Presencia de anticuerpos de Influenza A en aves. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 10-11.
29. Hanson., B., Swayne., D., Senne., D., Lobpries., D., & Hurst., J. S. (2005). Avian influenza viruses and paramyxoviruses in wintering and resident ducks in Texas. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(3), 624-628.
30. Herrero, L. (2008). El virus influenza y la gripe aviar. *Acta Médica Costarricense* 50(1).
31. Hooper, P., & Selleck, P. (2003). Pathology of Low and High Virulent Influenza Virus Infections. *Avian Diseases*, 47, 134-141.
32. Huang, Z., Elankumaran, S., Panda, A., & Samal, S. (2003). Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *Poultry Sci*, 82(6), 899-906.
33. Huang, Z., Panda, A., Elankumaran, S., Govindarajan, D., Rockemann, D., & Samal, S. (2004). The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines. *Journal of Virology*, 78(8), 4176-4184.
34. ICA. (2009). Guía para la prevención, control y erradicación de la enfermedad de Newcastle. En ICA (págs. 16-22). Bogotá: Produmedios.
35. Iglesias, I. (2011). Modelo epidemiológico de difusión de la influenza. Madrid: ISBN.
36. Jerez, P., Herrera, J., & Dávila, V. (1994). La Gallina Criolla en Los Valles Centrales de Oaxaca. Oaxaca: Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca.
37. Karen, S., Eliana, I., Rasa, G., & Ghersi, B. (2013). Presencia del Virus de Influenza Aviar en Aves Silvestres de los Humedales de Puerto Viejo, Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24(1), 98-103.
38. Kelland, K. (2017). Proliferation of bird flu outbreaks raises risk of human pandemic. London: Reuters.
39. Kim, L., King, D., Suarez, D., Wong, C., & Afonso, C. (2007). Characterization of Class I Newcastle disease Virus Isolates from Hong Kong Live Bird

Markets and detection using realtime. Reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(4), 1310-1314.

40. Kimball, J. (1990). *Introduction to immunology* (Tercera ed.). New York: Macmillan Publishing company.
41. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... & Ståhlberg, A. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27(2), 95-125.
42. Madsen, J. M., Zimmermann, N. G., Timmons, J., & Tablante, N. L. (20 de Febrero de 2013). Avian Influenza Seroprevalence and Biosecurity Risk Factors in Maryland Backyard Poultry: A Cross-Sectional Study. PLOS ONE group.
43. Miller, P., Afonso, C., Spackman, E., Scott, M., Pedersen, J., Senne, D., . . . Fuller, C. (2010). Evidence for a New Avian Paramyxovirus Serotype-10 Detected in Rockhopper Penguins from the Falkland Islands. *J. Virol.*(21), 11496–11504.
44. 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. Veracruz.
45. Moreno, R. (1994). La enfermedad de Newcastle y algunos avances recientes de diagnóstico. *Ciencia Veterinaria*, 6, 46-70.
46. Morrison, T. (2003). Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochimica et Biophysica Acta* , 1614(1), 73-84.
47. Murphy, F., Gibbs, E., Horzinek, M., & Studdert, M. (1999). Paramyxoviridae. *Veterinary Virology*, 3(26), 405-458.
48. Organización Mundial De La Salud Animal., (2016). Actualización sobre la influenza aviar en animales (tipos H5 y H7).
49. Pedersen, J., Senne, D., Woolcock, P., Kinde, H., King, D., Wise, M., . . . Seal, B. (2004). Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. *J Clin Microbiol.* , 42(5), 2329-2334.
50. Perozo., F., Villegas., P., Dolz., R., Afonso., C., & L.B., P. (2008). The VG/GA strain of Newcastle disease virus: mucosal immunity, protection against lethal challenge and molecular analysis. *avian pathology*.
51. Reynolds., D., & Maraga., A. (2000). Experiencias prácticas en el control de enfermedades de newcastle. Poultry Diagnostic and Research Center Experiencias prácticas en el control de enfermedades de newcastle. Poultry Diagnostic and Research Center. *Avian Diseases*, 44, 145-154.

53. Rodríguez, E. (2015). institutohuevo. Recuperado de http://www.institutohuevo.com/images/archivos/gripe_aviar._ferri06_13125226.pdf
54. Rodríguez J C, Allaway C E, Wassink G J, Segura J C y Rivera Teresa 1996 Estudio de la avicultura de traspatio en el municipio de Dzununcán, Yucatán. *Veterinaria de México*. 27(3):215-219.
55. Sabarinath, A., Sabarinath, G. P., Tiwari, K. P., Kumthekar, S. M., Thomas, D., & Sharma., R. N. (2011). Virological and Serological Surveillance of Avian Influenza Virus in the Birds of Grenada. *International Journal of Poultry Science*, VIII(10), 579-582.
56. Samuel, & Spradbrow. (1989). Persistence of the V4 strain of Newcastle disease virus in an open-range flock of chickens. *Vet Rec*, 8(124), 193-196.
57. Seal, B., Crawford, J., Seller, H., Locke, D., & King, D. (2002). Nucleotide sequence analysis of the Newcastle disease virus nucleocapsid protein gene and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Virus Res.*, 83(2), 119-129.
58. Senne, D. (2003). Exotic Newcastle disease virus characterization., (págs. 28-30). California.
59. Senne, D. A., Panigrahy, B., & Morgan, R. L. (1994). Effect of Composting Poultry Carcasses on Survival of Exotic Avian Viruses: Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) Virus and Adenovirus of Egg Drop Syndrome-76. *Avian Diseases*, 38(4), 733-737.
60. Senne, D. A., Pearson, J. E., & B., P. (1992). Proceedings of the third international symposium on avian influenza. Madison: B. C. Easterday.
61. Shortridge, K. (1999). Poultry and the influenza H5N1 outbreak in Hong Kong, 1997: abridged chronology and virus isolation. *Avian Diseases* , 17(1), 26-29.
62. Slemons, R. D., Sheldcastle, M. C., Heyman, L. D., Bedmarik, K. E., & A., S. D. (1991). Type A influenza viruses in waterfowl in Ohio and implications for domestic turkeys. *Avian Diseases*, 35, 165-173.
63. Slemons, R. D., Shieldcastle, M. C., Heyman, L. D., Bedmarik, K. E., & A., S. D. (1991). Type A influenza viruses in waterfowl in Ohio and implications for domestic turkeys. *Avian Diseases*, 35(1), 165-173.
64. Songserm, T., Jam-on, R., Sae-Heng, N., & Meemak, N. (2006). Survival and stability of HPAI H5N1 in . En A. Schudel (Ed.), *Developments in Biologicals* (pág. 254). Ames: Karger, Switzerland.

65. Soucheray, S. (2017). How prepared is the US for an avian flu redux. Minnesota: Cidrap.
66. Stroud, D., Veen, J., & Diagona, C. (2006). Migratory flyways in Europe, Africa and Asia and the spread of HPAI H5N1. Recuperado de www.fao.org/avianflu/conferences/rome_avian/documents/hagemeijer-mundkur.pdf
67. Swayne, D., & Halvorson, D. A. (2003). Influenza (Diseases of Poultry ed.). E.E.U.U.: Board for the American Association of Avian.
68. Swayne, D., & Suarez, D. (2000). Highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech*, 19(2), 463-482.
69. Talledo, M., & Zumaeta, K. (2010). Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1. *Peru biologia molecular*, 16(2), 227-238.
70. Thrusfield, M. 2007. Veterinary Epidemiology. Third ed. Blackwell Publishing. (Oxford). p232 - 234.
72. Villacis, G., Escudero, G., Cueva, F., & Luzuriaga, A. (2015). La Prevalencia del Virus de Newcastle en Pollos Nativos de las Comunidades rurales en el sur de Ecuador. *CEDAMAS*, 5(1), 109-113.
73. Villacrés, E., Caracterización molecular del virus de la enfermedad de. *Revista electrónica de Veterinaria*, 3. Obtenido de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090910/091008.pdf>
74. Villegas, P., & Perozo., F. (2012). Experiencias prácticas en el control de enfermedades de newcastle. *Poultry Diagnostic and Research Center*, 1, 1-6.
75. Vinueza, L.(2007) Análisis de riesgo e identificación de variables por medio de sistemas de Información Geográfica y compartimentación en Avicultura.notas para la conferencia amevea - amevea - ecuador
76. Wise, M., Seller, H., Alvarez, R., & Seal, B. (2004). RNA-dependent RNA polymerase gene. *Virus Research*, 104(1), 71-80.

9. ANEXOS

PARTE SUPERIOR

N #	Cuadrante	Sitio de muestreo	Lugar	
1	1216	91,103,104,184,189	San Francisco	5
2	1217	9,10,11,12,186,187,190		7
3	1218	815	San Francisco	1
4	1219	814		1
5	1208	183.81	Bocana	2
7	1210	809,812,813		3
8	1211	807	Rio Bonito	1
9	1199	179.18		2
10	1200	178,18,182	El Porvenir	3
11	1201	793,801,802,803,8034,806,811	Santa Cruz La Victoria San Francisco	7
12	1202	808	Panohana	1
13	1189	177.18		2
14	1190	790.791	La Primavera	2
15	1191	782,792,794	Palestina Parlamento La Rafael Santa Lucia	3
16	1192	797,798,800,805	La Loma Sabuluco El Placer	4
	1193	786	La Mina	1
18	1180	779,781,789	El Limón	3
19	1181	778,780,783,784,795	El Portón La Ibería	5
20	1182	795	El Vergel Boca toma	1
21	1183	769,789	Chaguana Rosa de oro	2
22	1184	774,787	El Mango	2
23	1185	776	Palo Mercado	1
24	1163	32,149,150	Puerto del Olvido P uero Roncador	3
25	1164	58,60,167,173		4
26	1165	172.768	Los Ceibales	2
27	1166	133	Nuevo pajonal Cañas Viejas	1
29	1168	759,771,773	Juana de Oro La peaña Caña Quemada	3
30	1169	764,765,772	Huisha Playa Guabo Playa El Chimbo Dos Carritos	3
31	1170	766	Huizho	1
32	1171	775,788	Gualayacu Centro de Gualayacu	2
33	1172	130,131,132	Muyuyacu Quera Limón	3
34	1173	767	Uzhcurrumi	1
			TOTAL DE MUESTRAS DE LA PARTE SUPERIOR	82

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 EL ORO”

ANEXO 1: Huevos codificados SPF embrionados e inoculados.



ANEXO 2: Camara de bioseguridad Flujo Laminar, tipo 2 para trabajar con virus departamento de Patología Aviar UNMSM- Perú



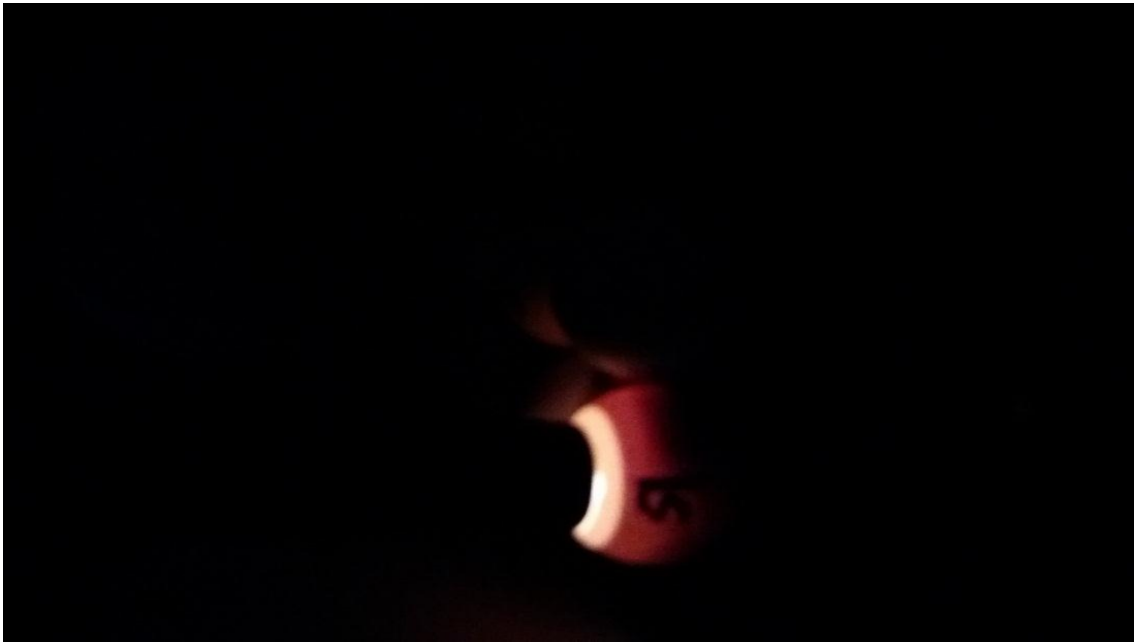
ANEXO 3: Refistros de laboratorio de las muestra y los pool que se procesaron

Laboratorio de Patología Aviar FMV - UNMSM Inoculación de embriones

Fecha inoculación CODIGO	Tipo de muestra		Enfermedad		Mortalidad embrionaria (horas)						Fecha lectura	HA		
	HC	FL	NC	IA	24	48	72	96	120	144			168	
09/09/18														
1-10 Laja Transporta						1								
11-20 Laja Transporta														
21-30 "														
31-40 "														
41-50 "														
51-60 "						1								
61-70 "														
71-80 "														
81-90 "														
91-100 "														
101-110 "														
111-120 "														
121-130 "														
131-140 "														
141-150 "										2				
151-160 "														

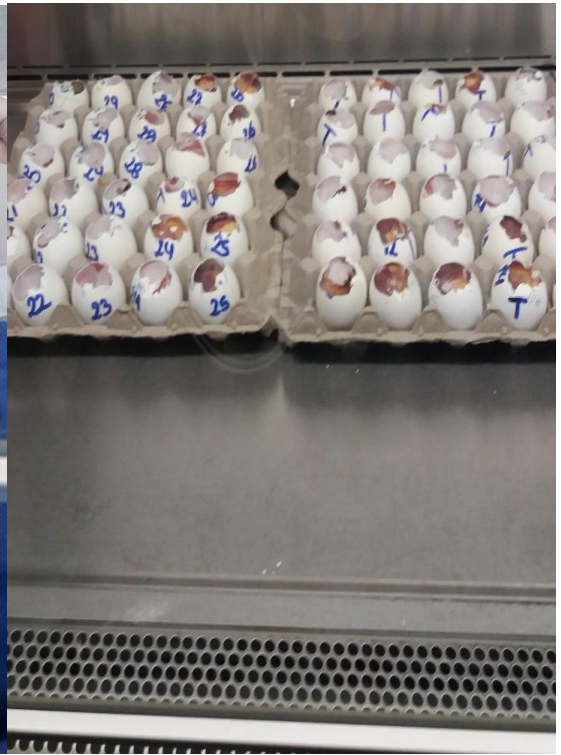
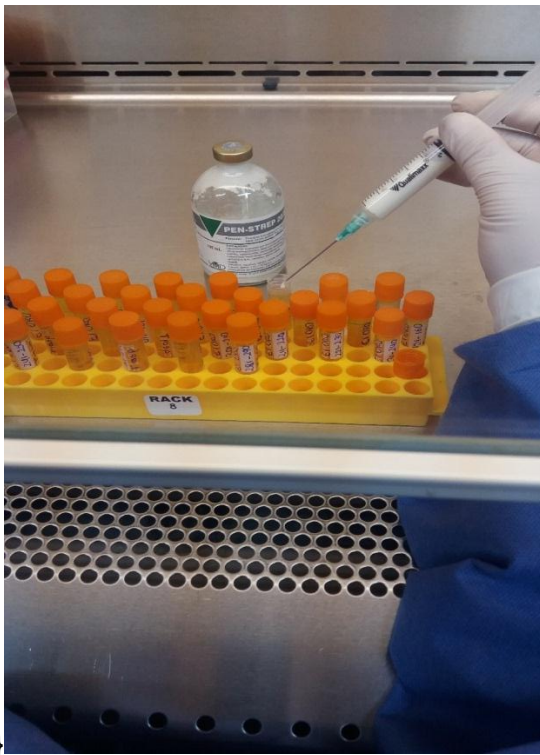
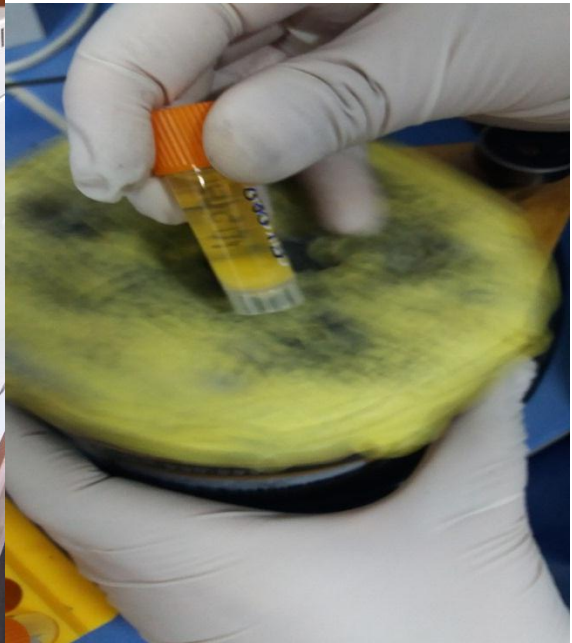
Comentario.

ANEXO 4: Ovoscopiado de los huevos para determinar mortalidad embrionaria

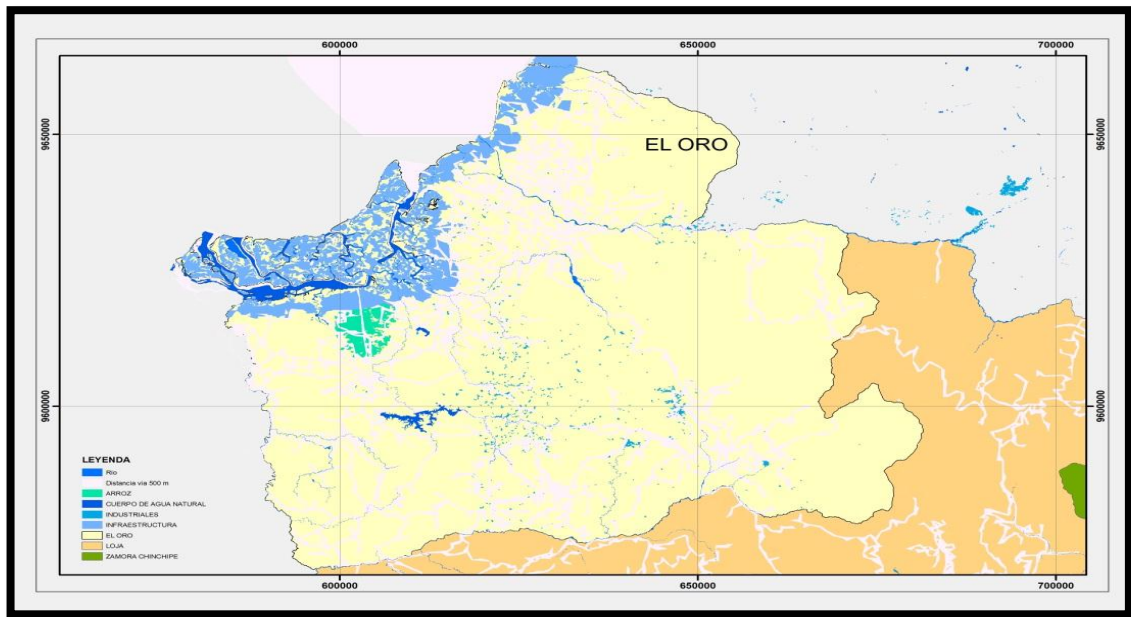


ANEXO 5: UTM Unidad de transporte Universal para virus con sus códigos y georeferenciados





ANEXO 6 : Ubicación espacial de los humadales para muestreo



ANEXO 7: Distribucion de puntos de muestreo en la provincia de El Oro

