

U N I V E R S I D A D  
**CIENTÍFICA**  
DEL SUR



**Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas  
Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**“EL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR Y DE ENFERMEDAD DE  
NEWCASTLE EN AVES SILVESTRES Y DOMESTICAS TIPO  
TRASPATIO COMERCIALIZADAS EN 11 MERCADOS DE LIMA  
METROPOLITANA”**

**Tesis para optar el Título Profesional de:**

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**RODRIGO RAMON ANTONIO ORTIZ ESPINOZA**

**BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**LIMA – PERU**

**2016**

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
ÍNDICE GENERAL .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE CUADROS .....	viii
ÍNDICE DE GRAFICOS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS .....	x
RESUMEN .....	11
ABSTRACT .....	9
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	5
2.1. Influenza Aviar .....	6
2.1.1. Etiología .....	6
2.1.2. Clasificación .....	6
2.1.3. Estructura .....	8
2.1.4. Variación antigénica de las Cepas .....	10
2.1.4.1. La Deriva Antigénica (antigenic drift) .....	10
2.1.4.2. Cambio antigénico (antigenic shift) .....	11
2.1.5. Hospedero.....	12
2.1.6. Epidemiología.....	13
2.1.7. Rutas migratorias de la Influenza Aviar .....	17
2.1.7.1. El acuerdo de Aves acuáticas migratorias de África y Eurasia (AEWA) .....	18
2.1.7.2 Ruta Central Asiática.....	18

2.1.7.3. Ruta del Este Asiático y Australia .....	18
2.1.7.4. Ruta del Pacífico .....	18
2.1.7.5 Ruta de las Américas .....	19
2.1.7.5.1. Ruta del Atlántico o del Este: .....	19
2.1.7.5.2. Ruta Central: .....	19
2.1.7.5.3. Ruta Oeste (Corredor del Pacífico): .....	20
2.1.8. Transmisión .....	21
2.1.9. Patogenia .....	21
2.1.10. Inmunidad .....	22
2.1.11. Signos Clínicos .....	23
2.1.11.1. Lesiones macroscópicas .....	24
2.1.11.2. Lesiones microscópicas .....	25
2.1.12. Importancia en Salud Pública .....	25
2.1.13. Control .....	26
2.1.14. Susceptibilidad a los agentes Químicos y Físicos .....	28
2.1.15. Diagnóstico .....	28
2.2. Enfermedad de Newcastle .....	29
2.2.1. Etiología .....	29
2.2.2. Clasificación .....	29
2.2.3. Estructura .....	30
2.2.4. Hospedero .....	32
2.2.5. Epidemiología .....	33
2.2.6. Transmisión .....	40
2.2.7. Patogenia .....	41
2.2.8. Inmunidad .....	42
2.2.9. Signos Clínicos .....	42
2.2.9.1 Lesiones Macroscópicas .....	44
2.2.9.2. Lesiones Microscópicas .....	45

2.2.10. Importancia en Salud Pública.....	45
2.2.11. Control.....	46
2.2.12. Susceptibilidad a agentes Químicos y Físicos .....	48
2.2.13. Diagnóstico.....	49
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.1. Lugar del Estudio .....	51
3.2. Población en Estudio .....	53
3.3. Tamaño de Muestra .....	53
3.4. Toma de Muestra .....	54
3.5. Equipos y Materiales.....	55
3.6. Recolección de las muestras .....	55
3.7. Procesamiento de las muestras.....	56
3.7.1. Aislamiento del virus – Inoculación en Huevos Embrionados (STF) 57	
3.7.2. Identificación del Virus Influenza .....	59
3.7.2.1. RT-PCR.....	60
3.7.3. Identificación del virus del Newcastle.....	65
3.7.3.2 Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación .....	65
3.8. Consideraciones éticas .....	67
IV. RESULTADOS.....	68
V. DISCUSIÓN.....	88
VI. CONCLUSIONES .....	94
VI. RECOMENDACIONES.....	96
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
VIII. ANEXOS.....	107

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°01: Estructura del virus de la Influenza Aviar .....	10
Figura N°02: Rutas migratorias mundiales .....	20
Figura N°03: Pollo con secreción Nasal .....	24
Figura N°04: Estructura del Virus de la Enfermedad Newcastle .....	31
Figura N°05: Pollo en posición de opistótonos, signo nervio de la enfermedad del Newcastle .....	44
Figura N°06: Mapa de mercados informales muestreados.....	52

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N°01. Preparación de Mezcla Maestra para Gen Matriz tipo A, H7 y H5.....	61
Cuadro N°02. Secuencia de Primers para la detección de influenza Aviar tipo A, subtipo H7 y H5.....	63
Cuadro N°03. Condiciones de ciclaje para detección de influenza aviar tipo A, subtipos H7 y H5 mediante RT-PCR.....	64
Cuadro N°04. Número de muestras de aves silvestres colectadas en mercados de la zona norte y resultados a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle. ....	69
Cuadro N°05. Número de muestras de aves silvestres colectadas en mercados de la zona centro y resultados a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle. ...	72
Cuadro N°06. Número de muestras de aves silvestres colectadas en mercados de la zona sur y resultados a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle. ....	76
Cuadro N°07. Número de muestras de aves domésticas tipo traspatio colectadas en mercados de la zona norte y resultados a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle. ....	79
Cuadro N°08. Número de muestras de aves domésticas tipo traspatio colectadas en mercados de la zona centro y resultados a HI para el virus de la influenza aviar. ....	82
Cuadro N°09. Número de muestras de aves domésticas crianza traspatio colectadas en mercados de la zona sur de Lima para el virus de la Enfermedad de Newcastle mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación.....	84
Cuadro N°10. Resultados de RT-PCR para Influenza Aviar tipo A. ....	87

## ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfico N°01. Numero de muestras de aves silvestres colectadas en la zona norte de Lima y resultados a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle. ....	71
Gráfico N°02. Número de muestras de aves silvestres colectadas en la zona centro de Lima, y resultados a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle. ....	75
Gráfico N°03. Numero de muestras de aves silvestres colectadas en la zona sur de Lima y resultados a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle. ....	78
Gráfico N°04. Número de muestras de aves domésticas tipo traspatio colectadas en la zona Norte de Lima y resultados a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle .....	81
Grafico N°05. Número de muestras de aves domésticas tipo traspatio colectadas en la zona Centro de Lima y resultados a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle. ....	83
Gráfico N°06. Número de muestras de aves domésticas tipo traspatio colectadas en la zona Sur de Lima y resultados a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle .....	86

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N°1: Protocolo IACUC WCS-PREDICT #16027 (Primera página) .....	107
Anexo N°2: Ficha de colecta de datos.....	108
Anexo N°3: Resultados de rt-PCR para Influenza Aviar.....	109

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia del virus Influenza Aviar y el virus de la enfermedad de Newcastle en aves silvestres y domésticas traspatio, comercializadas en mercados del norte, centro y sur de Lima metropolitana. Entre los años 2007 y 2010, se colectaron 801 muestras de hisopados orales y cloacales de aves silvestres y de traspatio de estos mercados. Para determinar la presencia del virus de la Influenza Aviar se utilizó la prueba RT-PCR, mientras que para detectar el virus de la enfermedad del Newcastle se utilizó la prueba de inhibición de la hemaglutinación. Todas las muestras resultaron negativas al virus de la influenza aviar a través del RT-PCR. Se logró determinar la presencia del virus de la enfermedad del Newcastle en un 4.37% (35/801) de las muestras procesadas, las que provenían de las especies *Aratinga erythrogenys*, *Aratinga leucophthalmus*, *Columba livia*, *Streptopelia decaocto*, *Gallus gallus* y *Meleagris gallopavo* a través del aislamiento viral e inhibición de la hemaglutinación. Los resultados nos sugieren que la venta de aves silvestres y aves de traspatio en mercados de Lima son un factor de riesgo importante en la transmisión y mantenimiento del virus de la enfermedad del Newcastle.

Palabras claves: Influenza Aviar y el virus de la enfermedad de Newcastle, RT-PCR, prueba de inhibición de la hemaglutinación, aves silvestres, aves domésticas traspatio

## ABSTRACT

This study aimed to determine the presence of the avian influenza virus and the Newcastle Disease virus in wild birds and backyard poultry sold in the markets in the northern, central and southern areas of metropolitan Lima. For the development of this study 801 samples of cloacal and oral swabs from wild birds and backyard poultry of several species present in these markets were collected between 2007 and 2010. To determine the presence of the avian influenza virus we used Real Time – PCR (RT-PCR) test, the detection of the Newcastle virus was attempting by the hemagglutination inhibition test. It was not able to determine the presence of the avian influenza in birds through the RT-PCR test. The Newcastle Disease virus was detected in 4.37% (35/801) of the tested samples, in species such as *Aratinga erythrogenys*, *Aratinga leucophthalmus*, *Columba livia*, *Streptopelia decaocto*, *Gallus gallus* y *Meleagris gallopavo*. The Newcastle Disease in these birds which are sold in 11 markets in metropolitan Lima is confirming by this study.

Key words: avian influenza virus, Newcastle Disease virus, RT-PCR, hemagglutination inhibition test, wild birds wild backyard poultry

## I. INTRODUCCIÓN

El virus de la Influenza Aviar, como el virus de la enfermedad del Newcastle son los dos virus más importantes que afectan a la industria avícola. Ambos figuran en la lista de la de La Organización Mundial de la Sanidad Animal – OIE<sup>1</sup>, debido a que causan elevadas tasas de morbilidad y mortalidad en aves domésticas. La presencia de cualquiera de estos virus en un país trae consigo repercusiones económicas negativas, debido a que limita el consumo de productos y subproductos avícolas disminuyendo así la oferta en el caso de Influenza Aviar, además una restricción en el comercio de estos en el caso del virus de la enfermedad de Newcastle<sup>2-3</sup>. Además de afectar ambos virus la salud pública de diferentes maneras, ya que el virus de la influenza aviar puede llegar a convertirse en pandemia ocasionando la muerte de 40 millones de personas entre los años 1918 al 1919 la cual fue conocida como la Gripe Española que fue causado por el virus H1N1 de origen aviar el cual fue aislado en 1930, aunque en el año 2009 se produjo una Epidemia mundial causado por un virus H1N1 el cual provenía del cerdo<sup>4-5-6-7</sup>, otros virus de influenza aviar como el H5N1 el cual infecto por primera vez a un humano en 1997 en Hong Kong y en el 2013 el virus H7N9 infectó inicialmente a tres personas, dos

residentes de Shanghai y uno de la provincia de Anhui en China, a diferencia del virus de la enfermedad del Newcastle en humanos sólo genera signos respiratorios leves y conjuntivitis, por esto se considera una zoonosis menor en humanos<sup>9</sup>

Ambas enfermedades virales tienen distribución mundial, esto debido a que sus reservorios naturales son las aves silvestres acuáticas migratorias o residentes<sup>10-11</sup>, pero recientes estudios al norte de Vietnam han demostrado que pequeñas aves terrestres silvestres actúan como reservorios naturales del virus de la influenza subtipo H5<sup>12</sup>.

Perú es considerado por la OIE como un país libre de influenza aviar en aves domésticas, gracias a un monitoreo que realizó el Servicio Nacional de Agrario de Sanidad Agraria - SENASA entre los años 2001 y 2005 durante el cual se muestreo más de 20 000 aves de corral en el que no se identificaron casos positivos<sup>10-13-14</sup>. Mientras que estudios realizados en aves silvestres en humedales del Perú desde el 2006 hasta 2008, han demostrado la presencia de algunos subtipos de influenza Aviar, los cuales pueden poner en riesgo esta condición<sup>8-15-16</sup>.

En el caso del virus de la enfermedad del Newcastle fue reportado por primera vez en Sudamérica en 1950 en Venezuela y en 1951 en Perú por Phillips<sup>13</sup>, luego de un prolongado silencio epidemiológico, desde el año 2010 el Perú según la OIE es catalogada con el estatus de “enfermedad clínica”.

El comercio ilegal de aves silvestre que en los últimos tiempos se ha convertido en una nueva fuente de diseminación de estos dos virus, gracias a las condiciones en las que

estas aves son transportadas y comercializadas, provocando en ellas procesos de inmunosupresión generando la proliferación y propagación de estos y otros agentes patógenos oportunistas<sup>8-12-19-21</sup>, poniendo en riesgo tanto la salud animal como la salud pública<sup>17</sup>.

Es de importancia epidemiológica reforzar o generar nuevos programas y políticas de vigilancia en zonas de alto riesgo como son los mercados de ventas de aves vivas, esto debido a la convergencia de aves de diferentes; procedencias, especies y edades, otros aspectos importantes es la bioseguridad y la vacunación en el caso de la enfermedad del Newcastle, estos dos últimos tienen un rol trascendental en la prevención y control de las enfermedades<sup>9-13</sup>.

Las aves domésticas son susceptibles a ambas enfermedades, debido al carácter explosivo, además de su rápida diseminación que estas tienen en ellas, es por esta razón que la mayoría de países incluyendo el nuestro cuenta con programas oficiales de vigilancia y control para ambos agentes, debido a que existe el riesgo de propagación de cepas silvestres como de laboratorio<sup>8-9-19</sup>. Debido a esto se deben monitorear periódicamente tanto las aves silvestres migratorias y residentes acuáticas, así como los lugares de anidación temporales o permanentes, también es necesario controlar los niveles de bioseguridad en los laboratorios donde se lleve a cabo el diagnóstico y la caracterización de los virus<sup>8-9</sup>.

El presente estudio tiene por objetivo demostrar la presencia de los virus de la Influenza Aviar y el virus de la enfermedad del Newcastle en aves silvestres y domésticas tipo

traspatio comercializadas en 11 mercados de Lima Metropolitana. La importancia de esta investigación radica en la necesidad de identificar agentes patógenos prevalentes en aves silvestres y domésticas tipo traspatio, contribuyendo a la vigilancia enfermedades e infecciones de impacto en la producción avícola, esto nos sirve como insumo para implementar programas o acciones sanitarias a través de entidades sanitarias de gestión en salud y de sanidad animal <sup>13-15</sup>.

## II. REVISION DE LITERATURA

La presencia del virus de Influenza Aviar como el virus de la enfermedad del Newcastle pone en riesgo la industria avícola a tanto a nivel nacional como mundial, ya que llegan a causar hasta el 100% de mortalidad en poblaciones de aves domésticas, países como Brasil y Estados Unidos los cuales representan el 68.36% de la exportación mundial total en este rubro han sido afectado económicamente<sup>1</sup>.

El Perú se ubica en el tercer lugar de América Latina de consumo de pollo, con un consumo de 43.5 kg de pollo al año por persona, el primer lugar lo ocupa Brasil con 50Kg por persona al año, la producción mensual es de 33 millones de aves, constituyendo el 57% del Producto Bruto Interno (PBI) pecuario, esto equivale un total de S/ 4,400 millones anuales a nivel nacional, esto quiere decir que el patrimonio avícola a nivel nacional representa el 23% del PBI agropecuario y el 2% del PBI a nivel nacional <sup>49-54</sup>, la presencia de los virus de la influenza aviar como el virus de Newcastle generan grandes pérdidas económicas y restricciones tanto en el comercio nacional e

internacional<sup>1-22</sup>.

En el Perú tanto el comercio como la crianza informal de aves silvestres y domésticas tipo traspatio, predispone la aparición de algunas de estas dos enfermedades, esto debido a las condiciones de hacinamiento, la falta de selección por edades y las pobres condiciones de salubridad en las que se encuentran, poniendo en riesgo tanto a la salud animal como pública con consecuencias fatales<sup>9-13</sup>.

## **2.1. Influenza Aviar**

### **2.1.1. Etiología**

Este virus consta de genoma Ácido ribonucleico (ARN) segmento de polaridad negativa de la familia orthomyxoviridae, género Influenzavirus<sup>27-30</sup>.

El virus de la influenza Aviar tipo A es el de mayor trascendencia debido a su virulencia y patogenicidad, no solo afecta seriamente la salud animal sino también la salud pública llegando a convertirse en pandemia<sup>2-19</sup>.

### **2.1.2. Clasificación**

La clasificación de los virus de influenza en 3 tipos; A, B y C, pero solo la de tipo A es la que infecta a las aves, estos a su vez se clasifican según los subtipos de hemaglutinina (H) y neurominidasa (N)<sup>2-19-28</sup>.

El virus de la influenza C presenta 7 segmentos de ARN, mientras que los virus de la influenza A y B presentan 8 segmentos de ARN, estos virus afectan a gran variedad de animales y al hombre, pero el tipo de infección que causa la Influenza Aviar A es altamente patógena, siendo la responsable de múltiples brotes a nivel mundial, los cuales han significados grandes pérdidas económicas en los países que las han sufrido<sup>2-19-20-25</sup>.

Los virus de tipo A puede llegar a tener hasta 144 combinaciones desde H1N1 hasta H16N9. A su vez, el tipo A es el que mayor relevancia, ya que posee la capacidad de infectar a humanos y a algunos animales como: aves domésticas, cerdos, equinos y a otros mamíferos marinos. Una característica propia del virus de tipo A, es que carece de mecanismos de reparación de errores durante la replicación del ácido ribonucleico, lo que produce cambios puntuales en los genes que codifican H y N, es por esta razón que la cepa inicial es sustituida por una nueva variante antigénica denominado cambio shift<sup>1-2-8-19</sup>. Lo más resaltante de esta cepa, es que puede intercambiar o recombinar su material genético y fusionarse con otra cepa diferente, esto se debe a que su genoma presenta 8 segmentos de ARN, permitiendo la recombinación del material genético, dando como resultado un subtipo distinto a los dos virus originales, proporcionando una característica inmunológica diferente<sup>1-8-19</sup>.

Para describir a las cepas de influenza aviar se utiliza la siguiente nomenclatura: el tipo de virus, el huésped, la especie de origen excepto para humanos, el sitio geográfico origen geográfico, el número de la cepa, el año en que se aisló y el subtipo de antígeno ejem; A/pavo/WInsconsin/1/68(H8N4), este es un virus de tipo A aislado de

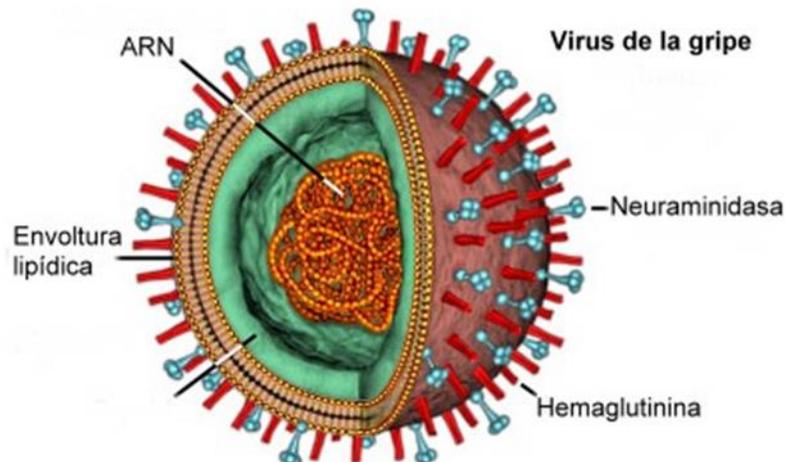
pavos en Winsconsin en 1968 y clasificado como H8N4<sup>1-2-8-19</sup>.

### 2.1.3. Estructura

El virus de Influenza es pleomorfo, esférico y filamentoso y puede llegar a tener un diámetro de 100nm. Posee una envoltura lipídica compuesta por dos capas con espículas de glicoproteínas, cada una de ellas presenta una forma definida como la hemaglutinina (H); se denomina así por su actividad hemaglutinante. La H; es una glicoproteína tipo I, que en su extremo C-terminal insertado en la envoltura de los viriones, es el principal antígeno de la superficie de los Virus de la Influenza Aviar para la producción de anticuerpos neutralizantes. Esta proteína de forma de bastoncillo está formada por un trímero en el que cada monómero termina en forma globular, además de ser responsable de la unión de los viriones a los receptores de las células huésped y la fusión de la envoltura del virus con la membrana celular de las células infectadas. La H es codificada por el segmento 4 del ARN vírico y es sintetizado como un polipéptido precursor (H0), que es escindido mediante hidrólisis enzimática en dos polipéptidos H1 y H2, mientras que el corte H0 es un requisito para la infectividad viral, generando un “dominio de fusión” en el terminal de la H2, para la fusión de la membrana<sup>8-19-30-33</sup>.

La neurominidasa (N) también llamada sialidasa que tiene forma de hongo, siendo el principal flanco para la respuesta inmunológica y además de ser importante para la epidemiología. La N es una glicoproteína tipo II que contiene su extremo N-terminal insertado en la envoltura de la partícula vírica y su extremo C-terminal distal de la misma, que es codificada por el segmento 6 del ARN vírico posee actividad enzimática ya que

hidroliza al ácido siálico contribuyendo a la liberación de las partículas víricas de los receptores de las células infectadas, facilitando de esta manera la diseminación del virus<sup>8-30-33</sup>. Presenta una envoltura que está sobrepuesta a la matriz que consiste en dos proteínas: M1 y M2, tanto la matriz como la envoltura, tienen la finalidad de proteger el genoma que se encuentra en su interior<sup>2</sup>.



**Figura N°01: Estructura del virus de la Influenza Aviar**

Fuente: Salud Publica y algo más

#### **2.1.4. Variación antigénica de las Cepas**

Los virus de la influenza Aviar posee dos mecanismos primarios los cuales le proveen; alta tasa de mutación espontaneas o de presión inmunológica y de redistribución de los segmentos genéticos entre cepas de diferentes especies (entre ellas las humanas). Estos mecanismos proveen a estos virus la oportunidad de cambiar y adaptarse, esto contribuye a establecer nuevas infecciones a nuevas especies de hospederos<sup>8-19-27-30-33</sup>.

##### **2.1.4.1. La Deriva Antigénica (antigenic drift)**

La deriva antigenética son los cambios de nucleótidos individuales en los genes que codifican a los sitios antigénicos de la hemaglutinina (H) y neurominidasa (N) o ambas, además la actividad de la ARN polimerasa viral es proclive al error<sup>19-30-</sup>

Se observa la deriva antigénica en los virus Influenza A, esto es gracias a mutaciones en la molécula de H19. Los virus se unen a las células del hospedador gracias a los ácidos siálicos de las superficies de las células del hospedador, a través de la depresión en la superficie distal de la cabeza globular de la molécula de H<sup>15-19-30-33</sup>.

Este fenómeno es muy importante para la patogénesis del virus y no sólo restringiéndose a modificaciones de la H, ya que algunos virus de Influenza A H3N2 estacionales, este mecanismo ha llevado a modificaciones de la nucleoproteína viral y así estos virus han logrado el escape del reconocimiento por parte de los linfocitos T citotóxicos<sup>19</sup>. Se sabe que una variante por deriva antigénica es responsable de enfermedad significativa cada 4 años y esta puede llegar a tener 4 a más sustituciones de aminoácidos en dos o más sitios antigénicos<sup>19-30-49</sup>.

#### **2.1.4.2. Cambio antigénico (antigenic shift)**

Cuando dos virus de Influenza Aviar infectan una misma célula, se da el segundo mecanismo, este es muy significativo desde el punto de vista molecular<sup>19</sup>. Para que se ensamblen nuevas partículas virales, durante la replicación, el genoma es replicado y enviado al citoplasma<sup>19</sup>. Esto debido a que el genoma de los dos virus es segmentado, además de haber dos cepas virales en proceso dentro de la misma célula<sup>8-19-51</sup>.

El verdadero causante de la aparición de los diferentes subtipos virales es el reordenamiento génico a lo largo de la historia conocida de los virus Influenza en humanos y animales<sup>19</sup>.

### **2.1.5. Hospedero**

Se ha aislado este virus en más de 105 aves de vida libre, como en patos, gansos y cisnes que pertenecen al orden Anseriforme, también en otras aves como carrelimos, frailecillos. Pájaros bobos y gaviotas pertenecientes al orden Charadriiformes que son playeras, otros ordenes de aves de vida libre donde este virus ha sido detectado son; Falconiformes, Galliniformes, Columbiformes, Ciconiiformes, Paseriformes, Gruiformes, Piciformes, Procellariiformes y Pelianiformes<sup>8-49-51</sup>.

Además de reportarse en aves ornamentales y de producciones; afectados son los siguientes Psittaciformes, Casuariiformes, Struthioniformes, Rheiformes, Anseriformes y en su gran mayoría de las Galliniformes domésticas, estos dos últimos grupos encierran a pavos, patos, gallinas, gansos, perdices, gallineta, perdices, codorniz blanca y codorniz japonesa. Es probable que aves del orden Psittaciformes la actualidad se cree que después de ser capturadas son contagiadas con este virus al ser expuestas a una cuarentena con aves ya infectadas<sup>8-15</sup>.

Las infecciones en gorriones, estorninos y aves de percha pertenecientes al orden Passeriforme, se han asociado con brotes en granjas<sup>15-49</sup>.

### 2.1.6. Epidemiología

Debido a los cambios Drif y Shift los cuales generan la aparición de nuevas variantes y subtipos de este virus, permitiendo así a este agente patógeno romper la barrera intra-especie e inter-especie para así infectar a nuevos individuos. Los cambios estructurales de la hemaglutinina y neurominidasa, aumentan así la virulencia de este virus, cambiando así la epidemiología y epizootiología de la influenza Aviar<sup>50</sup>.

El ingreso de este virus a las granjas avícolas comerciales se da a través de; principalmente por aves acuáticas migratorias, otras aves de corral domésticas o aves ornamentales, cuyo origen es desconocido, cerdos domésticos y mascotas que actúan como diseminadoras del virus<sup>8-15</sup>. El riesgo de infectarse con el virus a través de estas fuentes va a depender del contacto directo o indirecto que las aves tengan con estas fuentes<sup>30</sup>.

Los mercados informales en los cuales se comercializan aves vivas, constituyen una gran puerta para el ingreso del virus de la influenza aviar tanto de mediana y alta patogenicidad en los sistemas comerciales de crianza<sup>15-51</sup>.

Una vez que el virus ha ingresado a una población de aves doméstica, la diseminación de este a través de las vías oral-fecal como la aerógena, se hace más fácil debido a la cercanía en que se encuentran<sup>33</sup>. Los fómites como comederos, bebederos, entre otros, van a jugar un papel muy importante en la trasmisión del virus, algunos insectos como las mosca van a actuar como vectores mecánicos<sup>30-33</sup>. No se descarta la transmisión vertical, es imposible que los huevos infectados sobrevivan, pero la

presencia de huevos rotos dentro de la incubadora, se convierte en un problema de contaminación<sup>8</sup>.

Los pavos son aves que pueden ser infectadas de forma mecánica por diferentes subtipos de influenza aviar originados en el cerdo y vía humanos infectados con este virus teniendo origen en el cerdo<sup>49-50</sup>.

La influenza aviar que afecta a aves domésticas fue descrita por primera vez en febrero de 1858 en Italia por Eduardo Perroncito, el describió como un padecimiento infeccioso de rápida diseminación y con una alta tasa de mortalidad en aves domésticas, el cual tuvo origen en el otoño anterior, además de causar un fuerte impacto en la agricultura tanto a los agricultores como a la economía casera de ese entonces, mientras que la influenza aviar de alta patogenicidad la primera vez que fue descrita se le denominó Peste aviar, un 1951 se describió la infección de manera filtrable por Cennantani y Savonuzzi, este virus fue aislado en 1955 por Shafer<sup>8-49-50-51</sup>.

Chile se consideraba un país libre del virus de la influenza aviar desde 1975, por lo tanto esta enfermedad era considerada con exótica para este país, hasta el año 2002 cuando sucede el brote de H7N3 en la comuna de San Antonio provincia de Melipilla, el primer foco que se reporta afecta a un plantel de reproductoras de Broiler de la Granja Miltil y el segundo foco afecto a la una granja de reproductoras de pavo de la Granja Tromolen. Esto significó que el plan de Emergencia Sanitario del Servicio Agrícola y Ganadero del Ministerio de Agricultura se pusiera en marcha por primera vez en los últimos 15 años, lográndose erradicar en seis meses la enfermedad para esto se

sacrificaron 483.536 aves<sup>64</sup>.

A fines del 2003 hasta Enero del 2004 se propago de una manera descontrolada una epidemia de influenza Aviar H5N1 en Vietnam, Corea del Sur, Laos, Camboya, Tailandia, China, Japón e Indonesia, afectando a miles de pollos y patos los cuales fueron sacrificados. En marzo del 2004 la esta epidemia parecía estar controlada, pero en Julio de ese mismo año el virus resurgió en China, Tailandia y Vietnam, fue aislado por primera vez en Malasia. Estudios realizados demostraron que este virus proveniente de patos domésticos al sur de china<sup>8-15</sup>.

Esta epidemia no solo arrasó con gran parte de la población de aves domésticas en el continente Asiático, también se reportaron casos humanos con desenlaces fatales 4 en Camboya, 12 en Tailandia y 34 en Vietnam<sup>15</sup>.

Con el brote de Hong Kong en 1997, muchos estudios han revelado el principal rol que juegan las aves domésticas, en la ecología de este virus de influenza aviar tipo A, aunque actualmente estudios han revelado que aves domésticas como los pollos pueden mantener varios serotipos de influenza aviar<sup>8-30-49</sup>. En la actualidad las aves migratorias acuáticas son consideradas los principales reservorios, las aves excretan al virus a través de las heces, saliva y secreciones respiratorias<sup>2-22-33-35-36</sup>. Debido a que en las aves silvestres el virus se replica a nivel del intestino y son eliminados por las heces 2 a 14 días post infección, lo que indica una manera eficiente de transmitir el virus ya que contamina el agua<sup>4-24-27</sup>.

En aves acuáticas la biología del virus H5N1 es muy cambiante. Los primeros reportes en el 2002 acerca de la presencia de este virus en aves domésticas y exóticas en parques naturales de Hong Kong nos indican grandes tasas de mortalidad en ellas. Debido que solo se habían reportado las muertes de gaviotas por virus H5N3 en Sudáfrica en 1967 y la muerte de patos criollos en Italia entre los años 1999 al 2000<sup>15</sup>.

El virus H5N1 tiene la característica de evolucionar rápidamente por mecanismos que aún se desconocen, de dilucidar este mecanismo de rápida evolución nos proveería una llave para el entendimiento de las constantes epidemias<sup>8-15</sup>.

Realizando un estudio se ha descubierto las características antigénicas y genéticas del virus H7N3, que fueron aislados en Italia de patos silvestres en el 2001 y de pavos en el 2002 a 2003, descubriendo que ambas cepas de virus aviares, están directamente relacionadas tanto a nivel fenotípico como genotípico, los porcentajes de homología en 7 de sus genes están comprendidos de la siguiente manera; PB2 (polimerasa básica 2) un 99.8% y M (matriz) 99.1 .A diferencia de los genes N por una supresión de 23 aminoácidos en la proyección NA. Debido a esta región las neurominidasas de ambos grupos mostraron una similitud de 99%. Esto llevo a la conclusión que el virus H7N3 que fueron aislado del pavo provinieron de cepas circulantes de influenza aviar de aves acuáticas migratorias, esto es un paso muy importante hacia la comprensión de los mecanismos por los cuales se pueden transmitir interespecie y así el surgimiento de una potencial pandemia por este virus<sup>8-15-49-50</sup>

Se han realizado estudios de tipificación de ineffectividad de este virus, esto

va a depender de la cepa, pH, temperatura y salinidad del agua. Fuera del hospedador y a una temperatura de 17°C los virus de la influenza aviar pueden sobrevivir hasta 207 días y por un tiempo más a 4°C y en condiciones menos favorables entre 24 a 48 horas<sup>15-</sup>

49.

### **2.1.7. Rutas migratorias de la Influenza Aviar**

Estas rutas migratorias son difíciles de trazar, esto debido a las distintas distancias que recorren las aves, además las ubicaciones de áreas de reproducción, internación, las fechas de inicio de migración, por mencionar alguno de estos factores que influyen a generar una gran diversidad de rutas. Cabe recalcar de dos especies de aves no tienen las mismas rutas por asociación de varias de ellas por términos de semejanza, para un mejor estudio el mapa mundial sean dividido en 5 grandes rutas migratorias para aves migratorias acuáticas estas son; El acuerdo de aves acuáticas migratorias África y Eurasia, la ruta central asiática, la ruta del este Asiático y Australasia, la ruta central del Pacífico, y la ruta de las Américas, es importante para la llegada del virus de la Influenza Aviar a nuestro país<sup>8-15</sup>.

#### **2.1.7.1. El acuerdo de Aves acuáticas migratorias de África y Eurasia (AEWA)**

Esta ruta incluye el Noreste de Canadá, Groenlandia, Europa. Siberia occidental, Las Repúblicas de Asia Central y Occidental, los Caucaos, el Oriente Medio, la Península Arábiga, Madagascar y sus Islas asociadas<sup>8-15</sup>.

#### **2.1.7.2 Ruta Central Asiática**

Aquí se incluyen los territorios de Siberia Central, Mongolia, Las Repúblicas Centrales, Irán y Afganistán, los Estados del Golfo y Omán, el subcontinente Indio y las Maldivas<sup>8-15</sup>.

#### **2.1.7.3. Ruta del Este Asiático y Australia**

Esta ruta migratoria incluye los territorios del este de Siberia, Alaska, Mongolia, Corea, Japón, China, La india Oriental, Bangladesh, Asia Sudoriental, las Islas Sunda, Filipinas, Nueva Guinea, Australia y Nueva Zelanda<sup>8-15</sup>.

#### **2.1.7.4. Ruta del Pacífico**

Esta ruta se extiende a lo largo del Océano Pacífico desde Alaska, el lejano este de Rusia a Nueva Zelanda<sup>8-15</sup>.

### **2.1.7.5 Ruta de las Américas**

Incluye los territorios del Norte, Centro y Sur del continente Americano y el caribe y además cuatro rutas tradicionales para el Norte de América (Pacífico, central, Mississippi y Atlántico) <sup>8-15</sup>.

De las cuales se han descrito 4 rutas migratorias principales para Norteamérica estas son; del Pacífico, del Atlántico, Central y Mississippi. Las dos últimas rutas algunos autores las describen como la misma, estas son la rutas que las aves migratorias usan antes de arribar a nuestro país <sup>8-15</sup>.

#### **2.1.7.5.1. Ruta del Atlántico o del Este:**

Se inicia en el ártico Canadiense y en la costa de Groenlandia, estas son áreas de reproducción, las migraciones sigue hasta sitios de descanso en la costa oriental canadiense y de Estados Unidos. Para llegar a las costas sudamericanas las aves avanzan a través del caribe por el atlántico <sup>8-15</sup>.

#### **2.1.7.5.2. Ruta Central:**

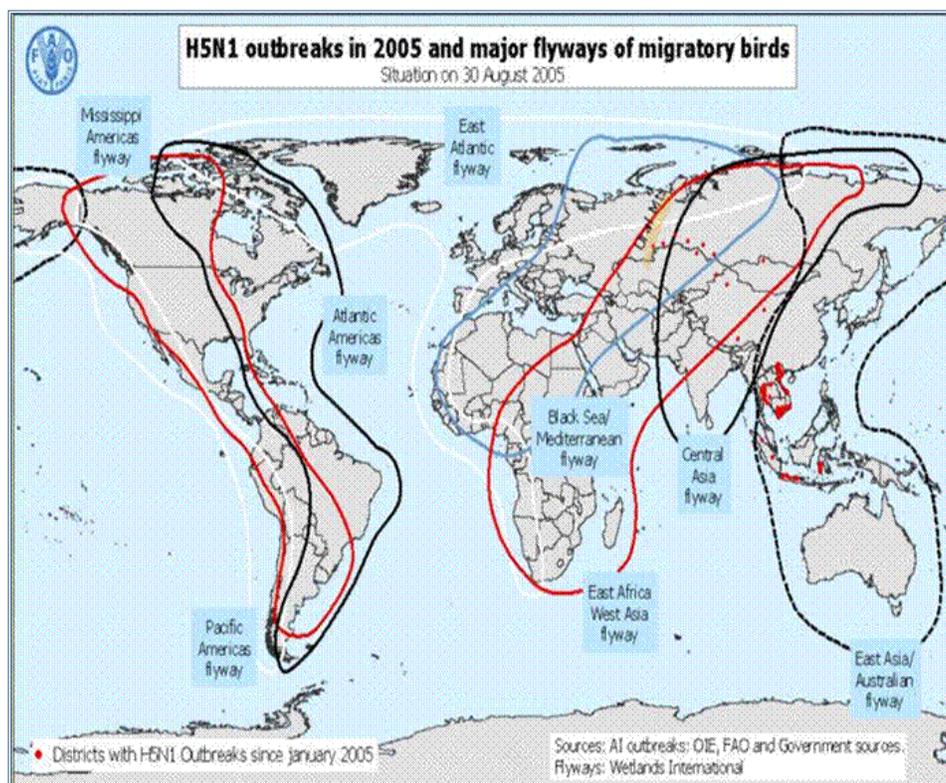
Esta se origina en el Ártico y zona interior de Norteamérica e incluye la ruta de Mississippi; a través de las praderas centrales de Norteamérica, Rocallosas y cuenca del Mississippi las aves se desplazan, hasta llegar al Golfo de México y Centroamérica. Es desde este punto que algunas aves se desplazan a través de la

Cordillera de los Andes, o por la costa Pacífica o Atlántida mientras otras lo hacen por la zona interna de Sudamérica<sup>8-15</sup>.

**2.1.7.5.3. Ruta Oeste (Corredor del Pacifico):**

Esta se inicia en el extremo más oriental de Siberia y en Alaska, estas aves se van a desplazar así el sur por la costa del Pacifico llegando algunas hasta la tierra del Fuego o incluso al territorio Antártico <sup>8-15</sup>

Cabe resaltar que estas rutas es la puerta de entrada del virus de influenza aviar tipo A, a nuestro país a través de aves silvestres acuáticas migratorias <sup>8-15</sup>.



**Figura N°02: Rutas migratorias mundiales**

Fuente: FAO

### 2.1.8. Transmisión

Las principales formas de diseminar el virus de la Influenza Aviar es la vía fecal-oral o en algunos casos por la vía respiratoria<sup>2-8</sup>. El periodo de incubación del virus de la influenza aviar es de 1 a 7 días en aves doméstica, pero a efecto de declaración obligatoria según el código terrestre de la OIE es de 21 días<sup>2-8-35</sup>.

El virus se replica en la célula epitelial del tracto intestinal de las aves, siendo eliminadas a través de la cloaca entre 2 -14 días post infección. Otras aves se infectan mediante el agua contaminada con las heces de aves infectadas <sup>30</sup>.

### 2.1.9. Patogenia

El proceso de infección empieza con la inhalación o ingestión de partículas virales de influenza aviar. En el tracto digestivo se encuentran los receptores de superficie del ácido siálico SA $\alpha$ -2.3, que es el encargado de cortar a la hemaglutinina del virus, ocurriendo así múltiples ciclos de replicación con liberación de partículas virales infecciosas. En las aves domésticas el virus presenta mayor actividad a nivel en la cavidad nasal para los virus de baja patogenicidad a diferencia de los patos donde el sitio de replicación viral es a nivel de las criptas de Lieberkühn en el colon y en el tracto respiratorio<sup>8-32-27</sup>.

La replicación de los virus de baja patogenicidad solo se da en el tracto respiratorio e intestinal, las infecciones secundarias se dan por bacterias oportunistas en algunos casos teniendo desenlaces fatales. En ocasiones este virus se disemina

sistemáticamente, replicándose y causando daño a nivel de túbulo renales, el epitelio acinar pancreático entre otros órganos que poseen células epiteliales conteniendo enzimas como tripsina <sup>27</sup>.

Para el caso del virus de la influenza aviar de alta patogenicidad, se va a observar a las 24 horas el epitelio nasal ulcerado e inflamado, con presencia de los virus en macrófagos de la submucosa, heterófilos y capilares de las células endoteliales. Juegan un rol muy importante en la replicación inicial y la diseminación viral los macrófagos y heterófilos. Estos virus se van a replicar a nivel de células endoteliales, diseminándose tanto por sistema vascular y linfático, para luego infectar y replicarse en otros órganos como el cerebro, riñones, hígado entre otros. Aunque no está muy clara la ruta de ingreso del virus al sistema nervioso central<sup>8-27</sup>.

Los signos clínicos y la muerte de las aves son debido a una falla multiorgánica, el daño que causa este virus es por tres procesos; replicación directa del virus en las células, tejido y órganos; los efectos indirectos de la producción de mediadores celulares como citoquina y la isquemia debido a la trombosis vascular<sup>27</sup>.

#### **2.1.10. Inmunidad**

La respuesta inmune humoral a nivel sistémico y mucosa que es inducida tanto por infección con el virus de la Influenza Aviar como la inmunización con vacunas, incluye la producción sistémica de IgM después de la infección, a esto le sigue la producción de IgG a diferencia de la respuesta a nivel de mucosas que ha sido

pobrementemente caracterizada. La producción de anticuerpos va a variar según la especie de ave<sup>2-8</sup>.

### **2.1.11. Signos Clínicos**

Los signos por la infección con el virus de la influenza aviar en aves domésticas pueden producir desde una infección subclínica, que se manifiesta con signos respiratorios leves entre ellos estornudos, tos, lagrimeo y sinusitis, en gallinas de corral se observa la caída en la producción de huevos, estos se observan despigmentados y deformes, además otros signos que también se pueden observar son; inapetencia, diarrea y desordenes nerviosos. La mortalidad tiende a ser pronunciada, en algunos casos este virus se puede presentarse de una manera inaparente<sup>27-33</sup>. En las aves silvestres la infección es subclínica, pero en 1961 hubo un brote en golondrina de mar (*Sterna hirundo*) en África<sup>27</sup>.

El virus influenza Aviar H5N1 que es el responsable de producir enfermedad y muerte en gallinas, pollo entre otras gallináceas de corral y gansos domésticos, puede llegar a producir enfermedad clínica, lesiones y muerte frecuentes en patos domésticos además de una variedad de especies de vida libre y en cautiverio, esto sucede en Asia desde 1996<sup>15</sup>.



**Figura N°03: Pollo con secreción Nasal**

Fuente: Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela

#### **2.1.11.1. Lesiones macroscópicas**

Las lesiones por el virus de la Influenza Aviar tipo A, en los cuadros hiperagudos son mínimas pudiéndose observar congestión de vísceras además de músculos y deshidratación.

A diferencia de las aves cuyo curso de la enfermedad es más prolongado se ha observado petequias y hemorragias en; la laringe, ventrículos, grasa del epicardio, serosa y la mucosa del proventrículo, además de la serosa adyacente al esternón. Otros signos clínicos que se han observado son; edema subcutáneo alrededor de la cabeza, focos necróticos en algunos casos de color amarillos o grises en bazo, hígado, riñón y pulmones, presencia de exudados en sacos aéreos, esplenomegalia. Se

han reportado ruptura del ovario y caída de la yema en la cavidad celómica, en reproductoras livianas y pesadas. También se han reportado inflamación de los ovarios y oviductos; además de la peritonitis por ruptura del folículo en aves de postura<sup>8-15-33</sup>.

#### **2.1.11.2. Lesiones microscópicas**

Las lesiones histopatológicas observadas consisten en necrosis multiorgánica, los tejidos severamente afectados son; corazón, páncreas, pulmón, cerebro y los órganos linfoides. Observándose comúnmente necrosis neural y neuronofagia, además de una meningoencefalitis linfocítica con gliosis focal también se observa edema y hemorragia. Se han reportado una necrosis coagulativa difusa de los miocitos, que usualmente se acompaña de inflamación linfocítica. Otras lesiones que se han asociado la replicación del virus de la Influenza tipo A son; necrosis de túbulos renales, células adrenales corticotrópicas, miofibrillas esqueléticas, células vasculares endoteliales y células acinares pancreáticas. En la piel desprovista de plumas, se han llegado a observar un gran número de microtrombos dentro de los capilares dérmicos e hipodérmicos, que están acompañados por vasculitis, edema perivascular edema subcutáneo y necrosis del endotelio capilar<sup>8-15-27-30</sup>.

#### **2.1.12. Importancia en Salud Pública**

En el hombre se pueden presentar tanto los virus de alta y de baja patogenicidad, ambos tipos de virus tienen un periodo de incubación de 1 a 3 días, los virus de baja patogenicidad aislados en humanos son H9N2 y H7N2, los cuales

producen conjuntivitis, tos no productiva, dolor de garganta, deglución dolorosa y corrimiento nasal, a diferencia de los de alta patogenicidad los cuales se presentan de una manera brusca y producen fiebre, escalofríos mialgia, cefalalgia y fatiga, siendo las poblaciones más susceptibles los niños, los adultos mayores, mujeres embarazadas y personas inmunosuprimidas, en muchos de estos pacientes las consecuencias son fatales, los virus de alta patogenicidad aislados en humanos son; H7N3, H7N7 y H5N1<sup>27-32</sup>.

En el siglo XX ocurrieron 3 pandemias a nivel mundial en; 1918 por H1N1, 1957 por H2N2 y 1968 por H3N2, las cuales se han cobrado miles de vidas humanas y ha tenido un origen aviar<sup>15</sup>.

### **2.1.13. Control**

Las medidas de prevención para evitar la entrada de estos dos virus al centro de expendio, es no comercializar aves silvestres provenientes del tráfico ilegal, esto debido a al estado inmunosupresión que presentan, ya que las convierte en las principales fuentes de diseminación de virus<sup>49</sup>. La colocación de aves de diferentes edades y especies en una misma jaula, esto debido a que no todas las especies son resistentes a los mismo agentes patógenos además el grado de inmunidad por edades es la misma, lo que hace que algunas de estas aves sean más resistentes que otras al ser expuestas a diferentes virus<sup>49</sup>. Además el uso jaulas tipo parrillas de 2 a 3 pisos que facilita la propagación y manteniendo de estos virus, debido a que facilita a la contaminación entre pisos, además que la limpieza de estas es difícil por la forma en la

que están diseñadas y esto permitiendo así el mantenimiento de estos virus<sup>2-15</sup>.

Se hacen vacunas recombinantes contra el virus de la Influenza tipo A, a través de la inserción del gen codificador de la hemaglutinina de este en un virus vivo no de influenza tipo A, ya que este último actúa como vector y vacunas a las aves de corral utilizando este virus recombinante<sup>2</sup>. Las ventajas de utilizar estas vacunas son; proporcionan inmunidad mucosa, humoral y celular, inducen una protección inicial a aves jóvenes además de proporcionar una protección importante a la semana siguiente y su importancia radica ya que ayudan a distinguir entre aves infectadas y aves vacunadas, por ejemplo, no inducen la producción de anticuerpos contra los antígenos de la nucleoproteína o de la matriz que son comunes a todos virus de la influenza A. Esto quiere decir que solo en las aves infectadas de forma natural se detectarán anticuerpos en la prueba de la AGID o en las pruebas ELISA que son utilizadas para la detección de anticuerpos de la influenza del grupo A (nucleoproteína y/o matriz)<sup>2</sup>.

Según el manual terrestre de la OIE del 2015 el uso de vacunas recombinantes está restringido a países en los que están autorizadas y legalizadas. La vacuna recombinante preparada a partir del virus de la viruela aviar y virus de la influenza A subtipo H5, se ha autorizado en; El Salvador, Guatemala, México, China (República Popular de) y EE.UU<sup>2</sup>.

#### **2.1.14. Susceptibilidad a los agentes Químicos y Físicos**

Siendo estos virus inestables al medio ambiente y factores físicos como la sequedad, cambios de pH, calor y condiciones isotónicas, todas estas condiciones los pueden inactivar. También pueden ser inactivados por solventes orgánicos y detergentes como el desoxicolato de sodio y dodecilsulfato de sodio, debido a que poseen una envoltura lipídica. Los aldehídos (formaldehído o glutaraldehídos), beta-propiolactona y etilenimia binaria pueden destruir al virus de la influenza aviar en presencia de material orgánico<sup>8-15</sup>.

También se pueden utilizar desinfectantes como fenoles, ácidos diluidos, hidroxilamina, iones de amonio e hipoclorito de sodio, lo cuales van a destruir a la influenza aviar<sup>8-27</sup>.

#### **2.1.15. Diagnóstico**

Debido a la variedad de signos clínicos el diagnóstico en campo solo es presuntivo. Por esta razón que se debe realizar aislamiento e identificación del virus y serología a través de las pruebas de Inhibición de la hemaglutinación y RT-PCR.<sup>8-31</sup>.

## 2.2. Enfermedad de Newcastle

### 2.2.1. Etiología

Esta enfermedad es producida por el Paramixovirus tipo 1 (PVM-1), son virus ARN monocatenario de sentido negativo con aproximadamente 15, 186 nucleótidos, no segmentado, pertenece al orden Mononegavirales, de la familia Paramyxoviridae, subfamilia Paramyxovirinae, Género Avulavirus<sup>13-30</sup>.

La Enfermedad de Newcastle es una de las enfermedades aviares más importantes del mundo, habiendo producido pérdidas de hasta 5 mil millones de dólares en países desarrollados, como fue el caso de Estados Unidos durante el brote del 2002 al 2003<sup>12-25</sup>.

### 2.2.2. Clasificación

La característica más resaltante del virus Newcastle es su gran variación en la patogenicidad para los pollos, es por eso que la clasificación de las cepas se da siguiendo los criterios de comportamiento en las pruebas de tiempo promedio en que mata un pollo (TPM), índice de patogenicidad intracraneal (IPIC) en pollos de un día y el índice de patogenicidad intravenosa (IPIV) en pollitos de 6 semanas de edad<sup>27-28</sup>.

Las cepas asintomáticas: consisten en una infección subclínica a nivel entérico<sup>3</sup>.

Las cepas Lentogénicas o respiratorio, se denominan así ya que producen

muy pocas o ninguna lesión a nivel respiratorio<sup>2-28</sup>.

Las cepas Mesogénicas producen baja mortalidad en aves domésticas, se presentan con signos respiratorios y nerviosos ocasionales<sup>3</sup>. En el pasado estas cepas fueron utilizadas como cepas vacúnales, entre ellas encontramos las cepas; Roakin, Komarov, Meekteswar y H<sup>12.28</sup>.

Las cepas velogénicas que se dividen en; velogénica viscerotrópica que produce lesiones intestinales hemorrágicas y velogénica neurotrópica, que presenta alta mortalidad después de los signos nerviosos como de los respiratorios<sup>3-30</sup>.

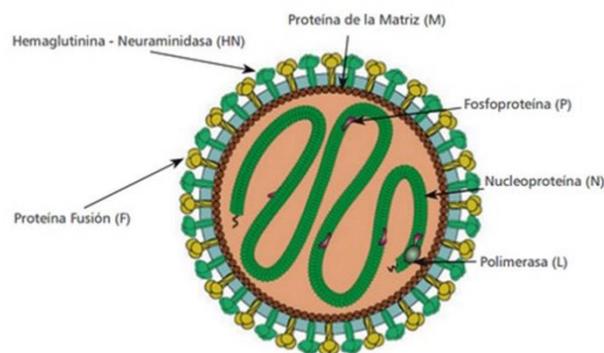
Pero esta clasificación no es muy clara debido a que en infecciones en aves libres de patógenos Específicos (SPF) se observa un enmascaramiento de esta infección, o se puede dar una exacerbación de los signos clínicos las cuales son producidas por cepas benignas, cuando estas se superponen infecciones con microorganismos o en condiciones ambientales adversas<sup>3</sup>.

### **2.2.3. Estructura**

Las partículas virales son pleomórficos miden entre 100 a 500 nm de diámetro, aunque algunos de estos virus se pueden encontrar en forma filamentosa con aproximadamente 100 nm de ancho y longitudes variables. Al ser observado este virus con microscopio electrónico se observó la cápside en forma de espina de pescado de 18 nm de ancho y un grado de inclinación de 5 nm y tiene simetría helicoidal. Las

glicoproteínas de superficie se observan con una extensión de 8 nm en la cubierta<sup>27-60</sup>. Este virus posee dos glicoproteínas de superficie llamadas proteína hemaglutinina-neuraminidasa (H-N) y la proteína de fusión (F) que es responsable de la fusión, además de la formación de policariocitos<sup>60-61</sup>. Estos virus tienen un peso molecular promedio de  $500 \times 10^6$  Da, el 25% de este peso lo posee la envoltura lipídica y el 6% los carbohidratos<sup>61</sup>.

Este virus posee un genoma de 15 a 16 kb, que codifica seis proteínas, siendo las más importantes; proteína L ARN polimerasa asociada a la núcleo cápside, proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN), la proteína de Matriz (M), la fosfoproteína (P) asociada también a la núcleo cápside, la nucleoproteína (N) y la proteína de fusión (F) que es responsable de la fusión y formación de policariocitos<sup>20-21</sup>, este virus es sensible a los lípidos solventes e inestables a pH muy alto o bajo, y sensible al calor por  $40^\circ\text{C}$ <sup>60-61</sup>.



**Figura N°04: Estructura del Virus de la Enfermedad Newcastle**

Fuente: Engormix

#### 2.2.4. Hospedero

Este virus es capaz de infectar a todas las aves domésticas, en algunos casos los signos clínicos tienden a variar, dependiendo la especie que infecte, por ejemplo en patos y gansos, en estas dos especies de aves tienden a mostrar menos signos clínicos que otras, algunos autores indican que las aves de crianza traspatio son más resistentes las líneas comerciales<sup>12-61</sup>.

Al respecto en especies de aves silvestres se han reportado infecciones naturales y experimentales en; Psittaciformes, Anseriformes, Falconiformes, Columbiformes, Gruiformes, Passeriformes, Strigiformes, Piciformes, Plicaniformes, Spheniciformes, Phasiandae y Struthioniformes. Se consideran como diseminadoras de este virus; Psittaciformes, Anseriformes, Passeriformes y Strigiformes, debido a que sean reportado infecciones persistentes<sup>12-61</sup>. En aves silvestres en cautiverio luego de ser capturadas se da la transmisión hacia sí mismas y es que estas aves son portadores de los virus de la enfermedad del Newcastle de baja patogenicidad y cuando son sometidas a situaciones de estrés, como en este caso son capturadas, estas aves pasan por procesos de inmunosupresión lo que con lleva a que este virus en ellas cause la enfermedad<sup>61</sup>.

Las aves silvestres en su mayoría son más resistentes que las aves domésticas, debido a que los signos clínicos en estas son inaparentes. Las especies más susceptibles son aquellas que presentan una relación filogenética más estrechas con el pollo, como las Galliformes, a diferencia de las aves acuáticas que son más resistente a este virus<sup>12</sup>.

### 2.2.5. Epidemiología

Es una enfermedad de distribución mundial tanto en aves domésticas como silvestres, pero solo es reportable a la autoridad sanitaria competente en aves domésticas<sup>3</sup>. Siendo las especies más susceptibles a la enfermedad del Newcastle los pollos entre las aves de corral, siendo los más resistentes a esta enfermedad los pavos, patos y gansos, cabe resaltar que estos últimos se han visto afectados por los genotipos VI y VII han llegado a causar en China brotes desde los años 90, las poblaciones de palomas son endémicas a los virus lentogénicos y mesogénicos, la susceptibilidad en faisanes, codornices entre otras aves de caza va a variar de acuerdo a la especie<sup>25</sup>. En las aves silvestres como los pingüinos son altamente susceptibles presentando altas tasas de mortalidad, un estudio realizado en el 2009 en la península Keller en las Islas de Rey Jorge en la Antártida dos integrantes del equipo de campo del laboratorio de Virología Clínica y Molecular del instituto de ciencias biomédicas de la universidad de São Paulo, este equipo logro recolectar un total 100 muestras tres especies de pingüinos, estas fueron; *Pygoscelis antarcticus*, *Pygoscelis adeliae* y *Pygoscelis papua*.<sup>52</sup> De estas muestras tomadas solo el 2% (2/100) resultaron positiva al virus de la enfermedad del Newcastle<sup>52</sup>. Aves rapaces como el Águila Marina de Cola Blanca y algunas especies de halcones también son alta mente sensibles a este virus.

Esta enfermedad se ha reportado en gaviotas, búhos, pelícanos e incluso en un alcatraz atlántico y en aves psitácidas llegan a desarrollar los signos neurológicos o mueren<sup>12-25</sup>.

Se hace difícil la verdadera distribución geográfica de la enfermedad debido al uso a nivel mundial de las vacunas contra el virus de la enfermedad Newcastle, sin embargo se han reportado y demostrado infecciones en todo los continentes incluyendo la Antártida King 2002<sup>28-39</sup>.

El monitoreo internacional es llevado a cabo por la FAO y la OIE, además que nuestro país ante la OIE presenta el estatus de enfermedad limitada a una o más zonas, esto gracias a la presencia de una variedad de reservorios como lo son las aves silvestres, aves de pelea y crianza en traspatio, las cuales van a favorecer la presencia de brotes de esta enfermedad<sup>12-60</sup>. En algunos casos la información que puedan brindar estas instituciones acerca del estado de algunos países con referencia a este virus, no sea tan representativa, debido que algunos solo reportan cuando sucede en aves comerciales, no cuando sucede en crianza de traspatio, ornamentales y deportivas como en el caso de los gallos de pelea<sup>28-39</sup>

En África, Asia, Centro América y partes de Sudamérica, el virus de la enfermedad del Newcastle es enzoótico o causa regular de epizootias, a diferencia de Europa Oriental en donde ocurren epizootias esporádicas<sup>12</sup>.

La distribución actual de este virus va a depender de los intentos de los países por tratar de erradicarla o controlarla, pero este éxito va a depender de la naturaleza de la industria avícola, países que en su mayoría la crianza es traspatio tienen muchos más problemas que aquellos en la que la crianza es industrializada<sup>51</sup>.

Desde la primera vez que el virus fue reconocido como tal, han ocurrido 4 panzootias de este virus; La primera panzootia, esta se inicia 1926 al suroeste de Asia, llegando a Europa, reportándose un brote aislado de este virus en Inglaterra. A este virus le tomó alrededor de 30 años diseminarse a nivel mundial y además siguió siendo muy importante durante los primeros años de la década de los sesentas<sup>12-51</sup>.

Mientras que la segunda panzootia se inicia aparentemente en medio oriente a fines de la década de los 60s y 1973 ya había llegado a todos los países<sup>12</sup>. La velocidad de diseminación que esta presenta a diferencia de la primera se debe a la revolución de la industria avícola, debido al comercio internacional que en ese momento se vivía, produciendo mayor contacto entre granjas debido al flujo de camiones que comercializaban alimentos<sup>12-60</sup>. Se cree que el virus responsable de esta segunda panzootia haya tenido relación con la importación de aves Psitácidas en cautiverio, siendo la principal causa de diseminación de este virus el transporte aéreo<sup>57</sup>. Debido al serio impacto que tuvo esta segunda panzootia en la industria avícola en la mayoría de los países desarrollaron vacunas así como políticas de protección para aves contra el virus de la enfermedad del Newcastle<sup>51-60</sup>.

El inicio de la tercera Panzootia es poco claro, algunos investigadores creen que a mediados de los 70s con el uso casi universal de las vacunas contra este virus, la mayoría de aves estuvieron protegidas, pero en la mayoría de casos permitieron la replicación y diseminación del virus, otros, investigadores indican que la tercera panzootia fue iniciada del PMV-1, afines de la década de los 70s y comienzo de los 80s y tiene como principal diseminador a las palomas<sup>51</sup>.

La cuarta Panzootia, considera que a los columbiformes cuales fueron descartados en un inicio genéticamente pero tienen gran presencia en todos los países europeos, las cuales cuentan con poblaciones de varios millones de individuos, este grupo aves a las cuales pertenecen palomas (*Columba sp.*), cuculis (*Zenaida sp.*) entre otras, las cuales son criadas con fines multipropósito ya sea para carreras, exposiciones y con fines alimenticios. Este grupo de aves fue el más afectada por esta panzootia, observándose que estas aves presentaban como signos patognomónicos los cuadros neurotrópicos y vicerotropicos característicos de la enfermedad que produce este virus<sup>51</sup>. Se cree que se inicia en medio oriente diseminándose por el mundo a fines de la década de los 70s y la década de los 80s, para el 1981 se había diseminado por toda Europa y luego a todo el mundo, esto por el contacto entre aves de carrera, exposición y el comercio internacional de aves en general. Gracias a la naturaleza permitió la diseminación de la infección en 24 países. En 1984 ocurrieron 20 brotes en pollos no vacunados gran Bretaña, esto fue gracias a la contaminación por alimento por palomas, cabe recalcar que este virus a sido reconocido por más de dos décadas en palomas, siendo enzootica en palomas de carrera (palomas mensajeras) en muchos países, además con diseminación regular en palomas domésticas, considerando a estas aves

como amenaza para la crianza comercial de aves<sup>12-51</sup>. Otros investigadores consideran que la cuarta panzootia se inicia a fines de los 80s y durante los 90s, durante este periodo de tiempo se tomaron muestras y se lograron caracterizar varias cepas de este virus, lo que sirvió como evidenciar de enlace epidemiológico entre los brotes de Asia, Medio Oriente, África y Europa en los 90s, incluso se cree que aún seguimos viviendo esta cuarta panzootia en la actualidad<sup>12-51</sup>.

Durante 1994 en Europa Occidental se reportaron 239 brotes, siendo este el pico más alto de brotes durante esta década en la comunidad europea, estos se produjeron tanto en pollos de engorde como en ponedoras comerciales, se pudo observar alta mortalidad, además de aislar cepas velogénicas y vicerotropicas<sup>12-51</sup>. La distribución indicaba que se trababa una sola epidemia desde los inicio hasta mediados de los 90s, pero las investigaciones realizadas en los diferentes brotes a lo largo de todo este tiempo, revelo gracias a la evidencia filogenética y antigénica indican que diversas cepas virales fueron las responsables de estos brotes. Los brotes ocurridos en la unión europea entre los años 1991 al 1995 fueron en; Países bajo, Bélgica, Luxemburgo y Alemania en aves de traspatio, los brotes de 1995 en adelante han sido en este tipo de aves. Durante el año 2000 en Italia se reportaron 254 brotes, siendo en su mayoría aves de traspatio como las más afectadas<sup>51-59</sup>.

Entre los años 1995 al 1999, se reportaron 27 brotes en Irlanda del Norte, 18 en Dinamarca, 2 Finlandia, 1 en Noruega, 1 en Irlanda y 1 en Suecia, todos en Europa Occidental habían sido declarados libre del virus de la enfermedad de Newcastle, además de haber sido monitoreadas regularmente por pruebas serológicas, no

encontrándose evidencia de infección producida por este virus, pero no se descarta la incursión de virus avirulentos que son diseminados por las aves silvestres<sup>51</sup>.

En Australia en 1966 se reconocieron patotipos similares entéricos asintomáticos en aves silvestres después de 34 años que este país estaba libre del virus de la enfermedad del Newcastle, además se han reportado dos brotes durante el año 1998 y otros brotes en 1999 al 2000<sup>12</sup>.

Durante los años 1995 al 2003 ha habido diversos brotes del virus de la enfermedad del Newcastle, comprometiendo la vida de más 100 000 aves en Honduras, Brasil, Italia, Canadá, México, América Central y Estados Unidos. En setiembre del 2002 al sur de California hubo un brote en una granja de aves comerciales el cual se diseminó a otras granjas vecinas, lográndose aislar el virus velogénico vicerotropico<sup>51</sup>.

Durante los años 2004 al 2005 se reportaron los siguientes brotes ante la OIE; Mayo del 2004 Senegal, en junio de ese mismo año en Venezuela en pollos de engorde de 35 días de edad el origen del brote relacionado con aves silvestres y Turquía también en una granja de pollo de corte pero este fue un virus de campo por un descuido en los programas de vacunas. En el mes de Julio del 2004 se reportaron 3 brotes el primero en Suecia en gallinas ponedoras, el origen de la infección fueron las aves silvestres, en este países están prohibidas las vacunas contra este virus, el segundo brote fue en Tailandia en pollos, pavos y gansos, el último Brote fue en Finlandia en pavos la posible causa de la infección fueron las aves silvestres<sup>61</sup>. Es importante mencionar que tanto en Suecia y Finlandia está prohibida la vacunación contra este

virus. En noviembre de ese mismo año se confirmó la presencia de este virus en Chipre en palomas y perdices silvestres, adicional a este hecho se reportaron brotes en pavos, gallina de guinea, pavos reales y gansos, la avicultura comercial en este país toma la decisión de aplicar un programa de vacunación sistemático<sup>12-51</sup>.

En abril del 2005 en Japón, se aisló el virus en pollos, en Julio de ese mismo año en Francia se confirmó la presencia en faisanes y perdices, además en Grecia en donde hubo un brote en una granja comercial. En agosto se reportado 3 brotes en Reino Unido, Bulgaria e Israel<sup>51</sup>.

El 02 de noviembre del 2008 en Belice, se aisló este virus de pollos de engorde y gallinas ponedoras, aquí se reportaron 4118 casos.<sup>21</sup> El 6 de marzo del 2013 en Nueva Guinea se reportaron 17 casos en aves criadas en libertad en el pueblo cercano a la frontera con la Provincia de Papua en Indonesia, cabe recalcar que la enfermedad del Newcastle es endémica para Indonesia, el 22 de diciembre de ese mismo año en Israel se reportaron 23427 casos en pollos de engorde de 6 semanas de edad. El 3 de enero del 2014 reapareció en Botsuana afectando Tórtola Turca y pollos de crianza traspatio principalmente, aquí se reportaron 3888 casos, el primero de noviembre del 2014 en Rumania se reportaron 63356 casos en aves (la OIE no especifica qué especie de aves fueron las afectadas).<sup>21</sup> El 01 de febrero del 2015 después de 25 años reapareció en Costa Rica afectando a un total de 71 de aves de traspatio, el 24 de abril de ese mismo en Nicaragua se reportaron 6 casos en la página de la OIE solo indica que fueron en aves, no especifica el tipo de esta, además el 25 de agosto en Rumania se reportaron 44610 muertes de pollos de 4 semanas de edad, estas

aves ya habían sido vacunadas contra esta enfermedad y el 19 de diciembre también en Rumania se reportaron la muerte de 510 de gallinas ponedoras por este virus<sup>21</sup>.

### **2.2.6. Transmisión**

El virus de la enfermedad del Newcastle tiene un periodo normal de incubación de 2 a 15 días, pero este periodo va a depender de la susceptibilidad de la población y la virulencia de la cepa, así pues las cepas velogénicos tiene un periodo de incubación de 2 a 6 días<sup>3, 51</sup> Hay que tener en cuenta que un brote con este virus se puede presentar en tan solo 72 horas y acabar con la vida de todo un lote de pollos<sup>12-30</sup>.

Se pensaba que los reservorios de este virus eran las aves domestica pero esta idea fue descartada en 1926 durante el brote de Newcastle en Indonesia, debido al carácter explosivo y altamente mortal de este virus en este grupo de aves. Desde ahí la idea que el primer reservorio de este virus haya sido un ave del sudoeste asiático<sup>30</sup>.

El virus es eliminado por aves través del tracto respiratorio y digestivo, luego de dos días post infección y a un día de presentar los signos clínicos, pudiéndose transmitir a través del contacto directo entre las aves o de manera indirecta a través de los bebederos, comederos u otros objetos contaminados con el virus<sup>12</sup>. No se descarta la transmisión horizontal pero es poco probable, pero los huevos fecundados infectados se pueden convertir en fuente de infección<sup>12-30-51</sup>.

### 2.2.7. Patogenia

Una vez que ingresa el virus al ave se replica en el epitelio de la mucosa respiratorio y digestivo, todo esto a través de la proteína de envoltura ya que esta se une al ácido siálico en los glucolípidos de la superficie célula y junto con la proteína de fusión F, es cortada por proteasas de células huésped, para formar así las proteínas F1 y F2, para así poder generar la infección, lo que genera que el virus pase directamente de célula a célula y así escapar de los anticuerpos<sup>27</sup>. Una vez que se ha replicado el virus puede llegar al bazo y la medula ósea vía hemática y de ahí a otros órganos como el pulmón, los intestinos y sistema nervioso central<sup>27</sup>. Puede haber mutaciones a nivel de los sitios de corte, generando adición de nuevas bases de aminoácidos, generando en estos virus cambios en su nivel de patogenicidad <sup>27</sup>.

Las lesiones típicas que produce este virus son a nivel del sistema nervioso central, renal, respiratorio y digestivo<sup>28</sup>. Las cepas velogénicas producen en pollo y patos hemorragias a nivel del tracto digestivo a diferencia de las lentogénicas que solo producen lesiones típicas a nivel de la mucosa traqueal y bronquial en pollos, lo que facilita la entrada de organismos oportunistas que producen neumonías, rinitis y conjuntivitis secundarias <sup>27</sup>.

En aves silvestres el sistema nervioso central y el sistema renal se ven afecta frecuentemente, produciendo una septicemia llevando a la muerte del animal, estas lesiones son poco apreciables a la histopatología<sup>27</sup>. Tanto en aves silvestres como en aves domésticas las lesiones a nivel del sistema nervioso central consisten en una inflamación no supurativa y son observan al microscopio<sup>28</sup>.

### **2.2.8. Inmunidad**

La respuesta inmune celular es la respuesta inicial contra la infección del virus de la Enfermedad del Newcastle, esta se detecta después de 2 a 3 días post infección, en la mucosa de la tráquea, se observó la presencia de células T, como las TCD8 y TCD4, hay un incremento de Células TCD3 en la glándula de Harder, también se detectaron el incremento de células dendríticas foliculares y macrófagos. Algunos investigadores creen que las células T juegan un rol de eliminación de este virus debido al incremento de estas en los órganos antes mencionados<sup>51</sup>.

La respuesta local contra la infección del Virus de la Enfermedad del Newcastle, está dada en el tracto respiratorio superior por la IgA en mayor cantidad, aunque se ha detectado IgM en secreciones nasales, los responsable de la inhibición de la replicación viral en la superficie de la mucoso y se ha detectado IgG en los exudados traqueales, observándose excreciones similares en la glándula de Harder, luego de la infección ocular<sup>51</sup>.

### **2.2.9. Signos Clínicos**

Los signos clínicos que van a manifestar las aves, van a depender mucho de la interacción entre la patogenicidad de las cepas y la susceptibilidad del hospedero, ya que en algunos casos pueden presentar hasta una alta tasa de mortalidad o

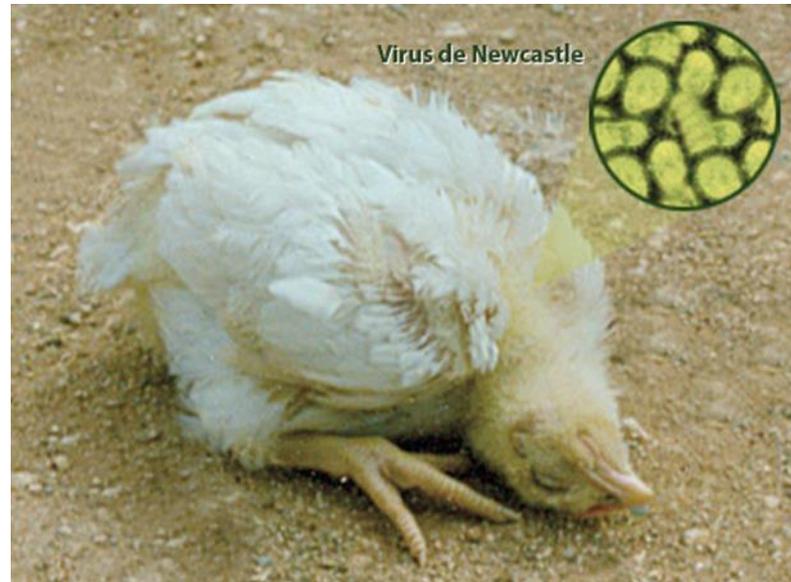
morbilidad y en algunos caso la enfermedad es inaparente (subclínica) <sup>30-39</sup>.

Las cepas lentogénicas o asintomáticas, se presentan en pollitos con signos respiratorio y la mortalidad que producen a esta edad es insignificante y en las adultas es inaparente <sup>13-60</sup>.

Las cepas mesogénicas en adultos se pueden observar signos respiratorios, mientras que pollitos se observan signos respiratorios y nerviosos llegando a alcanzar una mortalidad considerable a diferencia de las aves adultas que la mortalidad es insignificante <sup>12-61</sup>.

Las cepas velogénicas neurotrópicas se va a presentar en aves de cualquier edad, la característica del cuadro clínico, es la presentación de signos nerviosos como tortícolis y opistótonos, luego de iniciarse los signos respiratorios <sup>3-27</sup>.

En aves silvestres las manifestaciones clínicas son nerviosas debido a que el virus va a producir una inflamación a nivel de cerebro y de medula espinal, lo que va a producir una falta de equilibrio, Opistótonos, parálisis unilateral o bilateral de las patas o alas y marcha descoordinada <sup>27</sup>.



**Figura N°05: Pollo en posición de opistótonos, signo nervio de la enfermedad del Newcastle**

Fuente: Engormix

### **2.2.9.1 Lesiones Macroscópicas**

Las lesiones macroscópicas van a depender de la cepa y el patotipo del virus infectante, las más severas son producidas por los virus velogénicos, se observan hemorragias en la mucosa del proventrículo, ciego y en los intestinos delgado y grueso, estas tienen origen en las paredes intestinales, tonsilas cecales y las placas de Peyer, mientras el sistema nervioso central no se observan ningún tipo de lesiones<sup>12-60</sup>. No siempre se observan lesiones en el tracto respiratorio, pero cuando estas se hacen manifiestan lo hacen a través de inflamación además de la hemorragia marcada congestión de la mucosa de la tráquea. Otros órganos donde se han observado hemorragias en conjuntiva inferior donde, necrosis focal en bazo hemorragias y edema

paratraqueal cerca al ingreso de la tráquea<sup>60</sup>.

### **2.2.9.2. Lesiones Microscópicas**

Las lesiones histopatológicas son tan variadas como los signos clínicos, como las lesiones macroscópicas, las lesiones más comunes en aves de corral son; en el sistema vascular; se han observado edemas, hemorragias y congestión de las vasos sanguíneos asociados a diversos órganos<sup>60</sup>. En el sistema linfoide; se observa necrosis y depleción de tonsilas cecales, bazo, timo, glándula de Herder y Bursa, en el tracto respiratorio; se presenta con pérdida de cilios, congestión, edema además infiltración de linfocitos y macrófagos a través de la tráquea, en el tracto intestinal; necrosis del tejido linfoide y hemorragia de la mucosa y en el sistema nervioso; se observa encefalitis no purulentas con degeneración neuronal, focos de células gliales, hay infiltración perivascular de linfocitos e hipertrofia de las células endoteliales del cerebro, medula y zona central del cerebelo<sup>12-60-61</sup>.

### **2.2.10. Importancia en Salud Pública**

Es una de la zoonosis benigna sin consecuencia graves, sin embargo su importancia en salud pública radica, puesto que el ser humano es susceptible a todas

las cepas del Newcastle, siendo lo más expuesto a esta enfermedad los técnicos de laboratorio y personal de vacunación, esto debido a que están expuestos a grandes cantidades de virus<sup>27</sup>. La infección puede ser leve a moderada, la manifestación clínica es una conjuntivitis bilateral o unilateral con congestión, lagrimeo, dolor, tumefacción en los tejidos subconjuntivales y afecciones en los ganglios preauriculares<sup>27</sup>. El virus es excretado a través de las descargas oculares entre 4 a 7 días, recomendándose evitar todo contacto con aves durante este es las descargas oculares pueden durar entre 4 a 7 días, recomendándose evitar todo contacto ya sea directo o indirecto con aves durante este periodo<sup>13-27</sup>.

### **2.2.11. Control**

El objetivo del control es proteger a las aves en producción o de uso ornamental de la infección con el Virus de la Newcastle y además reducir el número de aves susceptibles a este virus mediante la aplicación de la vacunación<sup>3</sup>. Las vacunas más difundidas en el mundo son las que contienen virus lentogénico del tipo cepa Hitchner-B1 y La Sota, esta última cepa induce una respuesta inmune más fuerte<sup>12</sup>. La ventaja de esta tipo de vacunas permite la vacunación en masa, ya que se puede la facilidad incorporándolas en el agua de bebida, administrándose como un spray grueso o mediante instilación conjuntival o intranasal, haciendo que el uso de esta sea más rentable para la industria avícola<sup>13</sup>.

Las vacunas inactivadas, se preparan a partir de líquido alantoideo, al cual se le adiciona formaldehído o beta-propiolactona, para la inactivación de su

infectividad. Además de utilizar un coadyuvante oleoso la hace mucho más eficaz. Debido al tipo de vacunación debe ser individual, hace que el costo por vacunación sea alto<sup>30</sup>.

La duración de la inmunidad va a depender del programa de vacunación elegido, tener en cuenta que el nivel de inmunidad maternal de los pollos jóvenes, afectan los programas de vacunación ya que este varía de granja a granja, de lote a lote y entre individuos<sup>3</sup>.

Las vacunas más usadas contra este virus son vectorizadas, conformadas por un virus portador, el cual va a expresar una o más proteínas inmunógenas del Virus de la Enfermedad de Newcastle, esto induce una respuesta inmunitaria contra este y el virus vector. Para producir este tipo de vacunas se utilizan; virus vaccinia, virus de la viruela aviar, virus de la viruela de las palomas, herpesvirus del pavo, Marek's virus de la enfermedad de Marek y virus aviar asociado a adenovirus<sup>3-60</sup>.

Se han desarrollado vacunas a partir de subunidades basadas en la expresión a gran escala de proteínas del virus de la enfermedad del Newcastle, aquí se emplean vectores como baculovirus o plantas. Además el uso de vacunas de ADN de plásmido que codifique proteínas del Virus de la Enfermedad de Newcastle inmunógenas relevantes<sup>3-51</sup>.

Debido al sentido negativo del Virus de la enfermedad del Newcastle, esta característica hace posible genéticamente la modificación de este genoma,

desarrollando cepas de este virus con nuevas propiedades como; la implementación de diferenciación serológica y expresión e la incorporación de genes extraños, consiguiendo así que el propio virus sea un vector vacunal para la aplicación a aves de corral<sup>3-60</sup>.

Estas son algunas vacunas desarrolladas mediante la ingeniería genética como ha sido mencionada en el párrafo anterior han sido autorizados en algunos países como; VectorVax FP-N, Trovac-NDV y Innovax-ND. Un problema con algunas de las vacunas, podría ser la inmunidad existente contra el vector, ya que esta interfería con la aplicación genérica de estas vacunas en el campo<sup>3</sup>.

Otros de los puntos que hay que tener en cuenta para el control de esta enfermedad es la diseminación de esta, es por esta razón debido se adoptan disposiciones a nivel nacional e internacional, las cuales que regulan el comercio de aves vivas, como sus productos y subproductos<sup>12</sup>. Pero los factores más importantes para la prevención de la introducción de la enfermedad y su posterior diseminación, son las condiciones bajo las cuales las aves son criadas y el grado de bioseguridad practicado en las explotaciones avícolas<sup>51</sup>

### **2.2.12. Susceptibilidad a agentes Químicos y Físicos**

El virus de Newcastle como otros paramixovirus puede ser destruidos por tratamientos físicos tales como; ser expuesto a una temperatura de 56°C por 3hrs o a

60°C por 30min, a desecación por irradiación de luz o rayos ultravioletas, pH ácidos y por oxidación<sup>53</sup>.

Otros compuestos que también van a afectar al virus son los compuestos químicos tales como éter, solventes lípidos y desinfectantes como formalinas y fenoles<sup>8</sup>.

Cabe resaltar que la tasa de ineffectividad del virus va a depender de una serie de factores tales como; cepa viral a la cual pertenece, el medio ambiente al que está suspendido y la interacción entre tratamientos. Ningún tratamiento garantiza la destrucción total de los virus pero si disminuye la tasa de sobrevivencia de los virus infectante<sup>13-53</sup>.

### **2.2.13. Diagnóstico**

El diagnóstico en campo de esta virus es muy difícil debido a que la enfermedad que produce no tiene signos patognomónicos, lo que hace difícil su identificación este carece de signos enfermedad es muy complicado, además cabe recalcar que la amplia variación viral según la cepa, el huésped afectado como otros factores hacen solo sospechar que las aves están infectadas con este virus. Es importante distinguir en poblaciones de aves aquellas que infectadas con la cepa de virus velogénico de aquellas que presentan las cepas lentogénicas del virus, ya que este se da por el uso de vacunas vivas. De ahí radica la importancia de las pruebas diagnóstico que permitirán el tomar decisiones sobre las medidas de control que se deben usar dentro del galpón<sup>21-60</sup>.

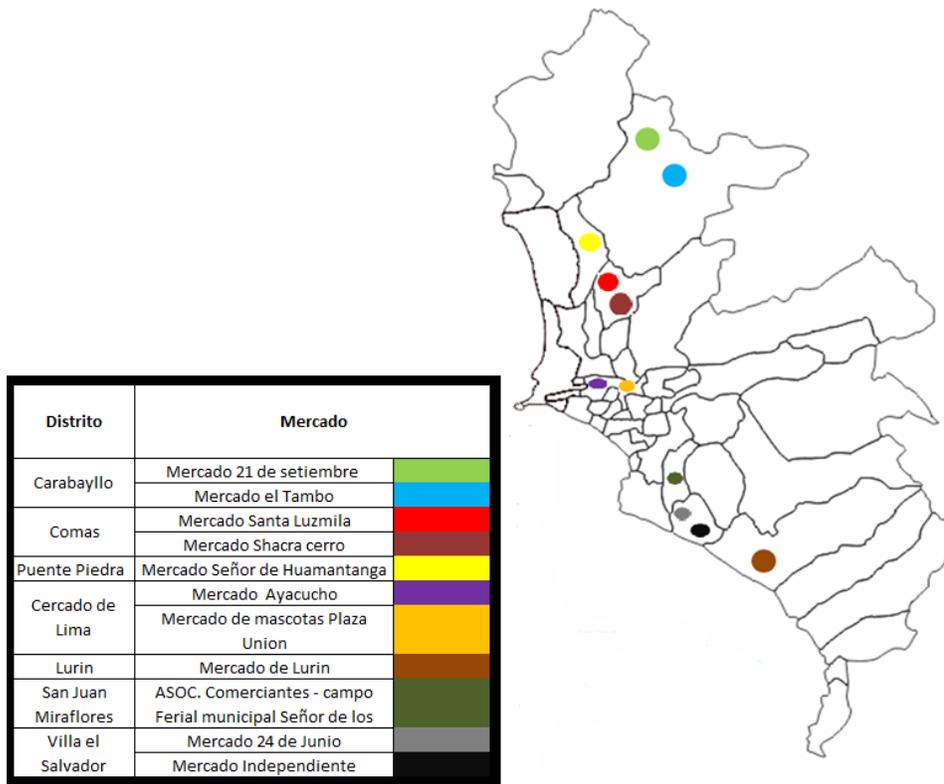
El diagnóstico se puede realizar a través de aislamiento e identificación del virus usando la prueba de Inhibición de la hemaglutinación y por serología con la prueba de ELISA<sup>60</sup>.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar del Estudio**

Se trabajaron en un total de 11 mercados de 7 distritos de Lima metropolitana estos fueron; Mercado Señor de Huamantanga ubicado en la cruce de la Av. San Lorenzo y Av. Puente Piedra el distrito de Puente Piedra, en el distrito de Cercado de Lima con los mercados que se trabajó fueron; Asociación de vendedores Plaza Unión ubicado en la Av. Alfonso Ugarte 308, Mercado Ayacucho ubicado en el Jirón Ayacucho cdra. 5, en el distrito de Carabayllo se trabajó con los Mercado 21 de setiembre Av. Túpac Amaru (altura del Km 22) y el Mercado el Tambo que está ubicado en Av. Túpac Amaru (por el parque zonal Manco Capac), en el distrito de Comas se trabajó con el Mercado Santa Luzmila que está ubicado en el cruce de las av. Universitaria con av. De la Fuente y Mercado Shacra Cerro que está Ubicado en el cruce entre av. Belaunde y

av. Túpac Amaru, en el distrito de Lurín se recolectaron muestras del Mercado de Lurín ubicado en la Antigua Panamericana Sur Km. 36, ASOC. Comerciantes - Campo Ferial Municipal Señor de los Milagros ubicado en la av. Pista Nueva desde la cdra.4 hasta la cdra. 6 etapa A en el distrito de San Juan de Miraflores, en el distrito de Villa el Salvador se Trabajó con El Mercado 24 de Junio ubicado entre las cuadras 14 y 16 de la av. Revolución y el Mercado Independiente entre la av. Central cdra. 16 y av. Juan Velasco Alvarado cdra.8.



**Figura N°06: Mapa de mercados informales muestreados**

Fuente: Creación Propia

### 3.2. Población en Estudio

Para este estudio se utilizó el muestreo por conveniencia, el cual nos permitió hacer la recolección de un número mayor número de muestras posibles durante el 2007 al 2010: las muestras fueron tanto de aves silvestres (endémicas y exóticas) y de traspatio que eran ofrecidas en estos mercados, cuya procedencia era desconocida.

### 3.3. Tamaño de Muestra

Para este estudio se recolectaron un total de 801, El tamaño de la muestra se obtuvo asumiendo que la prevalencia es del 5% para el virus de la Influenza Aviar, mientras que la prevalencia del virus de la enfermedad del Newcastle se asume que es menos del 1%<sup>9</sup>. Este número fue determinado debido a que se aplicó el modelo binomial:

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 p(1 - p)}{E^2}$$

Z= Coeficiente de confianza es 1.96

l = Error absoluto o error máximo admisible es de 0.016

p = Proporción del atributo de interés de la población es de 0.05

n=Tamaño mínimo de muestra es 801

q = (p-1) = 0.95

### **3.4. Toma de Muestra**

Para la toma de muestras en los mercados, se solicitó el consentimiento verbal de los vendedores; para esto se les informo sobre el procedimiento, los beneficios y las consecuencias antes de proceder al manejo de estas aves.

Mediante restricción manual las aves fueron sujetadas por personal debidamente capacitado y entrenados, esto con la finalidad de no poner en riesgo la vida de estos animales.

Una vez que el ave está correctamente sujeta se procede a coleccionar los hisopados orales y cloacales, para esto se introdujo el hisopo dentro de la boca y luego en la cloaca de estas aves, frotándose cuidadosamente contra ambos lados. Luego los hisopos se fueron colocaron inmediatamente en los tubos con UTM® y mantenidos en refrigeración (+4°C) hasta su transporte al laboratorio.

### **3.5. Equipos y Materiales**

- Hisopos
- Tubos UTM®
- Guantes
- Mascarillas N 95
- Mandiles desechables
- lentes protectoras
- Cajas de tecnopor
- Gel refrigerante
- Gradillas
- Franelas
- Lapiceros
- Hojas de colecta
- Bolsas de desechos
- Hojas de remisión para el laboratorio de patología Aviar.
- Aves

### **3.6. Recolección de las muestras**

Para proceder con la recolección de las muestras se solicitó un consentimiento

verbal de los vendedores, aquí se les informaba sobre el procedimiento, los beneficios y las consecuencias del estudio antes de empezar con este.

Todo el personal que estuvo involucrado con la toma de muestra conto con; respirador N95, lentes protectores, guantes y mandil desechable, siendo este el equipo de protección personal mínimo requerido.

Una vez que los animales fueron inmovilizados se procedió con el examen físico y la toma de muestras orales y cloacales, a través del empleo de hisopos que fueron introducidos y frotándolos cuidadosamente tanto en la cavidad oral y cloacal de las aves para evitar lesiones posteriores. Luego estos hisopos fueron introducidos dentro del medio de transporte UTM® (Copan Italia, 330 C), los cuales fueron mantenidos a una temperatura de 4°C, dentro de una caja de tecnopor hasta llegar al laboratorio, las muestras fueron alicuotadas y refrigeradas a – 70°C hasta su procesamiento.

Se recolectaron muestras tanto de aves sanas como de aquellas que presentaban sintomatología de parecida con Newcastle como a influenza.

### **3.7. Procesamiento de las muestras**

Para el diagnóstico de los virus de la influenza aviar y del virus de la enfermedad del Newcastle se utilizaron las siguientes pruebas diagnósticas:

### **3.7.1. Aislamiento del virus – Inoculación en Huevos Embrionados (STF)**

Las muestras fueron enviadas al laboratorio de Patología Aviar de la UNMSM, estas fueron procesadas utilizando la técnica de inoculación en huevos embrionados SPF de 9 a 10 días de edad.

Este procedimiento se lleva a cabo realizando los siguientes pasos:

- Las muestras son homogenizadas individualmente por 15 segundos en un vórtice.
- De cada 10 muestras se colecta 500ul, para formar un pool de 5ml aproximadamente y a los cuales se les asigno un código de identificación.
- Los tubos con muestras fueron centrifugados a 1000g por 10 minutos.
- El sobrenadante fue retirado cuidadosamente y colocado en otro tubo previamente identificado.
- Adicionalmente se le agrega al sobrenadante una solución de antibiótico de penicilina – estreptomina de 0.05ml al 20 % a cada muestra.
- Las muestras son incubadas de 2 a 3 horas a 4°C

- Las muestras son recolectadas en jeringas estériles individuales, las cuales fueron filtradas con millipore de 0.22um. finalmente se colecto un mínimo de 2 ml por pool.
- Para la inoculación de la muestra, fue necesario el uso de embriones de aves SPF de 10 días de edad, el punto de inoculación que es de 2mm por encima del borde la cámara de aire (área menos vascularizada), este punto se determina mediante el uso del ovoscopio.
- La zona se inoculación es previamente desinfectada mediante el uso de alcohol yodado, para luego ser perforada.
- Cada 5 embriones son inoculados con 0,2 ml vía saco alantoideo por cada pool formado.
- Los huevos fueron sellados con parafina y colocados en una incubadora a 37°C durante 6 días.
- Durante el proceso de incubación los huevos fueron observados diariamente proceso que se conoce como “miraje”, esto con la finalidad de registrar la mortalidad y el tiempo de muerte transcurrido tras la inoculación: aquellos huevos que no sobrevivieron fueron mantenidos en refrigeración hasta el día de la evaluación.

- Los huevos sobrevivientes fueron sacrificados al sexto día por refrigeración.
- Se hace una incisión en la cascara del huevo, por encima de la cámara de aire, con el uso de una tijera se remueve parte de la cascara que conforma la cámara de aire.
- De cada embrión se recolecta 45 µl de líquido alantoideo, usando una pipeta colectora.
- El líquido alantoideo es colocado en celdillas de microplacas, para ser enfrentado a 45 µl de glóbulos rojos.
- Se homogenizan las muestras y se esperan unos minutos para observar si la hemaglutinación era positiva.

### **3.7.2. Identificación del Virus Influenza**

Para determinar la presencia de Influenza Aviar, las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal SENASA.

### 3.7.2.1. RT-PCR

El cual se realizó de la siguiente manera:

Primero se procede con la extracción de ARN (Ácido ribonucleico) esto se hace utilizando el kit RNeasy de Qiagen, previamente las muestras fueron lisadas y homogenizadas con el buffer de alta salinidad que contiene tiocianato de guanidina inactiva el virus y RNAsas, permitiendo que el ARN se una a la membrana de silica. Luego de la adición del buffer se agitó con vórtex para la interrupción completa de las paredes celulares y membranas de plasma que permiten la liberación de ARN. Después clarificamos con etanol, el cual ayuda también a que el ARN precipite, las muestras fueron lavadas en tres oportunidades esto con la finalidad de asegurarse de mantener el ARN limpio y se diluyeron en 500 µl de agua libre de RNAsas.

El RT-PCR para detección del gen matriz de la influenza tipo A, H7 y H5 se realizó utilizando 25µl de formulación mix Qiagen® la cual contaba con 17µl de mezcla maestra y 8 µl de la muestra problema, como se muestra en el cuadro N°1.

Cuadro N°01. Preparación de Mezcla Maestra para Gen Matriz tipo A, H7 y H5

Reactivos	Matriz tipo A / H7 formula mix Qiagen®	H5 formula mix Qiagen®
	VOL	VOL
H <sub>2</sub> O	6.45µl	5.95µl
5Xbuffer	5µl	5µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	1.25µl	1.25µl
dNTP's (10mM each)	0.8µl	0.8µl
Forward Primer (20 pmol/ul)	0.5µl	0.5µl
H5 EA Forward Primer (20 pmol/ul)	--	0.5µl
Reverse Primer (20 pmol/ul)	0.5µl	0.5µl
RNase Inhibitor (13.3 unit/ul)	0.5µl	0.5µl
Enzyme Mix	1.0µl	1.0µl
Probe (6pmol/ul)	0.5µl	0.5µl
ROX Reference dye	0.5µl	0.5µl
Mezcla Maestra	17µl	17µl
Muestra problema	8µl	8µl
Total	25µl	25µl

**Fuente: National Veterinary Services Laboratories**

Cuadro N°01. Este protocolo detecta la gen matriz de la influenza aviar tipo A, el cual se conserva mucho en estos tipos de virus e inmediatamente se realizaron el RT-PCR específicos para H7 y H5, estos primers van a identificar la región HA2, este se conserva dentro de los genes de hemaglutinina de los subtipos H7 y H5. Además se observa en este protocolo que se usa tanto el Forward Primers H5 cepa norteamericano y Forward Primers H5 cepa euroasiático, debido a que este último presenta una variación en los oligonucleótidos.

Los Forward reconocen y se unen a una sección del genoma de Influenza A. debido a que cuentan con un componente de fluorocromo para este tipo de reacción emitiendo una coloración fluorescente cuando ha detectado que una muestra es positiva. La secuencia de primers se esquematiza en la Cuadro 02.

Cuadro N°02. Secuencia de Primers para la detección de influenza Aviar tipo A, subtipo H7 y H5

Virus		Secuencia (5' -3' )
Matriz de Influenza A	M + 25* 5'Primer	5'-AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG-3'
	M + 64*sonda	5'-FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-BHQ-1
	M-124* 3'Primer	5'-TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG-3'
Avian H7	H7 +1515 5'Primer	5'-ATG GAG AGC ATA AGG AAC TAC-3'
	H7 + 1585* sonda*	5'-FAM-CAG ATA GAC CCA GTG AAA TTG AGT-BHQ-1-3'
	H7+1628 3'Primer	5'-CCG AAG CTA AAC CAT AAG-3'
H5-Norteamericana	H5+1456*5'NA Primer	5'-ACG TAT GAC TAT CCA CAA TAC TCA-3'
H5-Eurasian	H5+1456* 5'EA Primer	5'ACG TAT GAC TAC CCG CAG TAT TCA-3'
	H5+1637* sonda	5'-FAM-TCA ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA-BHQ-1-3'
	H5+1685* 3'Primer	5'-AGA CCA GCT ACC ATG ATT A GC-3'

**Fuente: Fuente: National Veterinary Services Laboratories**

Este cuadro se refiere a la posición del nucleótido en el extremo 5' de la sonda y el Primer hibrida con el genoma de virus de influenza aviar.

Para controlar tanto el tiempo de incubación a cada temperatura, además de las diferentes temperaturas y como también el número de ciclos se utiliza un termociclador en tiempo real. Todos estos parámetros se explican en la Cuadro N°3.

Cuadro N°03. Condiciones de ciclaje para detección de influenza aviar tipo A, subtipos H7 y H5 mediante RT-PCR

Probe/Primer set		Etapa	Tiempo	Temperatura
AIV matriz	45 ciclos	Desnaturalización	1 sec.	94°C
		Amplificación	30 sec.	60°C
H5	40 ciclos	Desnaturalización	1 sec.	94°C
		Amplificación	30 sec.	57°C
NA/EA H5 Assay		Extensión	5 sec.	72°C
H7	40 ciclos	Desnaturalización	10 sec.	94°C
		Amplificación	30 sec.	54°C
2008 H7 Assay		Extensión,	10 sec.	72°C

**Fuente: Fuente: National Veterinary Services Laboratories**

Las trece muestras se procesaron en placas de alrededor de treinta reacciones cada una, además de procesarse tres controles positivos (por cada primer utilizados) y también se procesaron 3 controles negativos que se distribuyeron por toda la placa,

además de su función como controles negativos, estos nos indican si hubo contaminación de la placa al momento de manipularla.

Las reacciones obtenidas a través de este procedimiento fueron procesadas en 3 horas, obteniéndose una gráfica de resultados proporcionados por el programa 7500 software. La curva para cada reacción es elaborada por el termociclador en tiempo real que lee la absorbancia de la reacciones durante cada ciclo del proceso.

Para determinar si una muestra es positiva, los controles positivos forman curvas las cuales se denominan límites de absorbencia, este límite lo vamos a encontrar aproximadamente en la mitad de la sección del crecimiento exponencial de la curva, esto quiere decir que si la curva que se forma por las reacciones sobrepasa el límite de absorbencia dentro de los 40 ciclos, esta se considera positiva.

### **3.7.3. Identificación del virus del Newcastle**

Para determinar la presencia del virus de la enfermedad del Newcastle se utilizo la Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación, esta prueba se realizó en el laboratorio de Patología Aviar de la UNMSM:

#### **3.7.3.2 Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación**

Esta consiste en:

- Se colocaron 25 µl de suero fisiológico tamponado. Luego de colocar 25

μl de las muestras de suero de las aves a cada una de las 11 celdillas de la primera hila de cada placa, siempre se deja una para el control negativo.

- Se mezcla 25 μl del contenido y se pasa 25 μl a la segunda hilera, volviéndose a mezclar, pasándose a la tercera hilera volviéndose a repetir este procedimiento hasta llegar a la última hilera.
- Se agregó 25 μl de antígeno del virus de la enfermedad del Newcastle (paramyxovirus tipo 1), que es conformado por 8 unidades de hemaglutinantes.
- La placa se deja incubar por 30 min para la obtención de la reacción antígeno-anticuerpo a temperatura ambiente.
- Finalmente se le agrega a las celdillas 25 μl de glóbulos rojos al 0.75% y se mezcla agitando bien la bandeja
- Dejándose incubar por 45 a 60 min a temperatura ambiente, luego de esto se hace la lectura visual inclinando la microplaca.

**Nota:** Cabe resaltar que todos estos procedimientos se llevaron a cabo en una cabina de bioseguridad de Clase II y utilizando el equipo de Bioseguridad adecuado para esta labor.

### 3.8. Consideraciones éticas

El manejo y la colecta de muestras de animales fue realizado en cumplimiento con el Acta de Bienestar Animal y de acuerdo a los principios establecidos en la “Guía para el uso y cuidado de Animales de Laboratorio”, Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, National Academy Press, 1996. Los procedimientos fueron revisados y aprobados mediante un Protocolo de uso de animales en la investigación (AUP, por sus siglas en inglés) de la Universidad de Texas A&M (2007-2008), y autorizados por el Comité de ética para el uso y cuidado de animales (IACUC) del Instituto de Investigación de la Marina de los Estados Unidos en Perú (NMRCD, 2009-2010).

Las muestras utilizadas para este estudio fueron colectadas y analizadas por los proyectos de investigación **“Enfermedades infecciosas en el comercio legal e ilegal de aves silvestres”** (autorizaciones de investigación otorgadas por resolución directoral N°022-2007 INRENA-IFFS-DBS, N° 046-2008 INRENA-IFFS-DBS, N°0101-2009 -AG-DGFFS-DGEFFS) y **“Enfermedades infecciosas en el comercio de animales silvestres en Perú”** (resolución directoral 0411-2010-AG-DGFFS-DGEFFS).

## IV. RESULTADOS

El presente estudio se analizaron 801 procedentes de hisopados traqueales y cloacales de aves silvestres y de traspatio comercializadas en 11 mercados de Lima metropolitana, de los cuales el 73.91% (209/801) pertenecen a aves silvestres y el 26.09% (592/801) a aves de traspatio. De las cuales 4.36% (35/801) muestras resultados positivas a la prueba de inhibición de la hemaglutinación para el virus de la Enfermedad de Newcastle, de los cuales el 1.49% (12/801) se obtuvieron de aves silvestres y el 2.87% (23/801) a partir de aves domésticas tipo traspatio.

Cuadro N°04. Número de muestras de aves silvestres colectadas en mercados de la zona norte y resultados a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle.

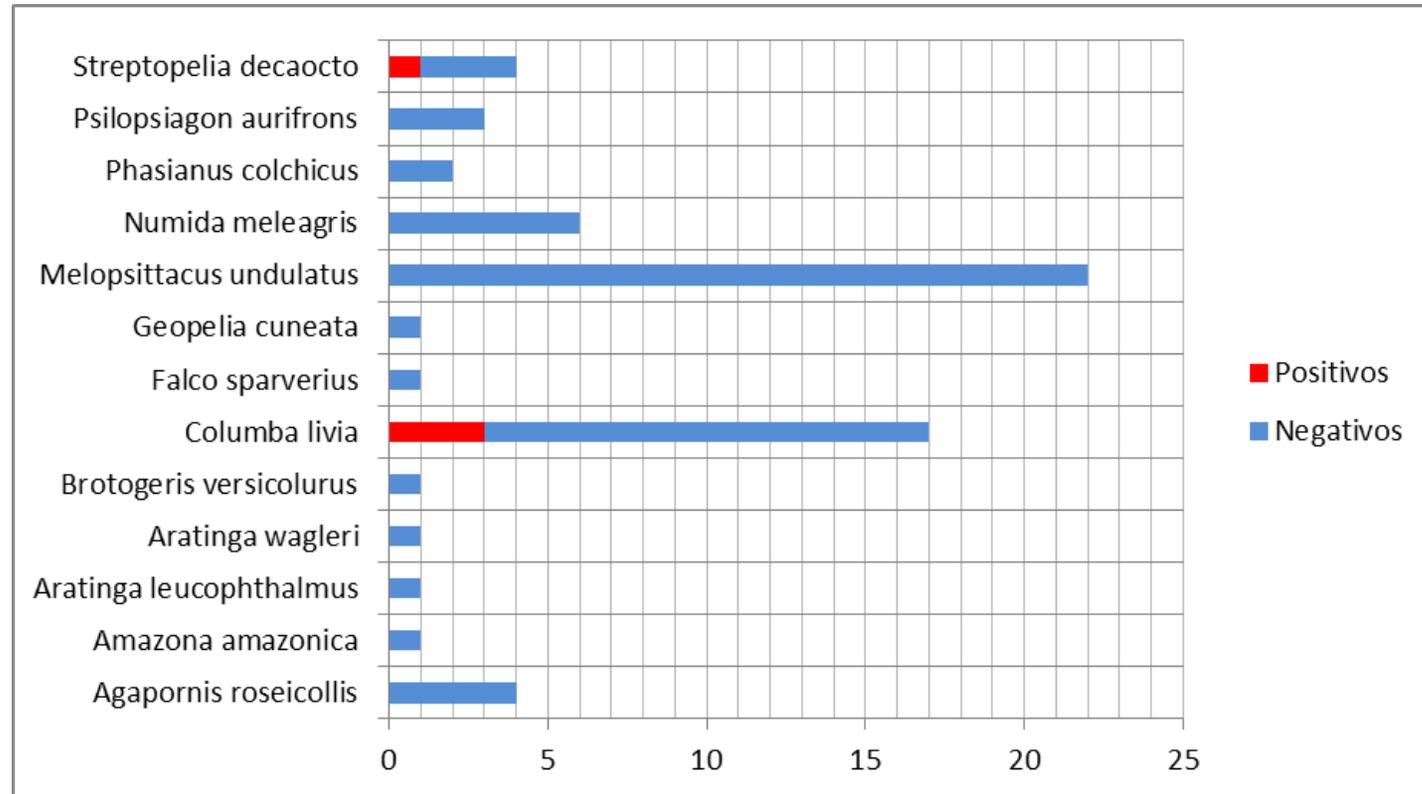
Distrito	Mercado	Especie de aves muestreadas	Resultados para Virus de Newcastle	
			Nº de muestras por Especie de aves	Resultado HI
Carabayllo	Mercado 21 de setiembre	<i>Melopsittacus undulatus</i>	1	Negativo
	Mercado el Tambo	<i>Columba livia</i>	1	Negativo
		<i>Geopelia cuneata</i>	1	Negativo
		<i>Melopsittacus undulatus</i>	3	Negativo
Comas	Mercado Santa Luzmila	<i>Melopsittacus undulatus</i>	2	Negativo
	Mercado Shacra cerro	<i>Melopsittacus undulatus</i>	2	Negativo
		<i>Amazona amazonica</i>	1	Negativo
Puente Piedra	Mercado Señor de Huamantanga	<i>Numida meleagris</i>	6	Negativo
		<i>Phasianus colchicus</i>	2	Negativo
		<i>Agapornis roseicollis</i>	4	Negativo
		<i>Aratinga leucophthalmus</i>	1	Negativo
		<i>Aratinga wagleri</i>	1	Negativo
		<i>Brotogeris versicolurus</i>	1	Negativo
		<i>Columba livia</i>	<b>3</b>	<b>Positivo</b>
			13	Negativo
		<i>Falco sparverius</i>	1	Negativo
		<i>Melopsittacus undulatus</i>	14	Negativo
		<i>Psilopsiagon aurifrons</i>	3	Negativo
		<i>Streptopelia decaocto</i>	<b>1</b>	<b>Positivo</b>
	3	Negativo		

**Fuente: Creación Propia**

En el Cuadro N°04 se observa que el distrito de la zona norte con el mayor número de muestras recolectadas en aves silvestres es Puente piedra con el 6.61% (53/801), las aves de las cuales si obtuvieron el mayor número de muestras fueron obtenida de *Columba livia* con el 1.9% (16/801), las cuales pertenecía al mercado Señor de Huamantanga perteneciente al distrito de Puente Piedra. En la zona norte se obtuvo 11.42% (4/35) de muestras positivas para el virus de la enfermedad de Newcastle en aves silvestres, de las cuales el 75% (3/4) obtenidas de *Columba livia* y el 25% (1/4) de *Streptopelia decaocto*, todos estas muestras fueron tomadas del mercado de Señor de Huamantanga perteneciente al distrito de Puente Piedra.

Gráfico N° 01. Número de muestras de aves silvestres colectadas en la zona norte de Lima y resultados a H1 para el virus de la Enfermedad de Newcastle.

Fuente: Creación Propia



Cuadro N°05. Número de muestras de aves silvestres colectadas en mercados de la zona centro y resultados a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle.

Distrito	Mercado	Especie de aves muestreadas	Resultados para Virus de Newcastle	
			N# de muestras por Especie de aves	Resultado HI
Cercado de Lima	Mercado Ayacucho	<i>Agapornis fischeri</i>	2	Negativo
		<i>Agapornis personatus</i>	2	Negativo
		<i>Amazona amazonica</i>	7	Negativo
		<i>Amazona farinosa</i>	3	Negativo
		<i>Amazona festiva</i>	5	Negativo
		<i>Amazona ochrocephala</i>	2	Negativo
		<i>Aratinga acuticaudata</i>	1	Negativo
		<i>Aratinga erythrogenys</i>	24	Negativo
		<i>Aratinga leucophthalmus</i>	1	Negativo
		<i>Aratinga mitrata</i>	2	Negativo
		<i>Aratinga sp.</i>	14	Negativo
		<i>Aratinga weddellii</i>	19	Negativo
		<i>Brotogeris sanctithomae</i>	1	Negativo
		<i>Brotogeris versicolurus</i>	37	Negativo
		<i>Dives warszewiczi</i>	5	Negativo
		<i>Forpus coelestis</i>	15	Negativo
		<i>Melopsittacus undulatus</i>	2	Negativo
		<i>Pionus menstruus</i>	5	Negativo
		<i>Primolius couloni</i>	2	Negativo
		<i>Pulsatrix perspicillata</i>	3	Negativo
<i>Serinus canaria</i>	1	Negativo		
<i>Streptopelia decaocto</i>	2	Negativo		

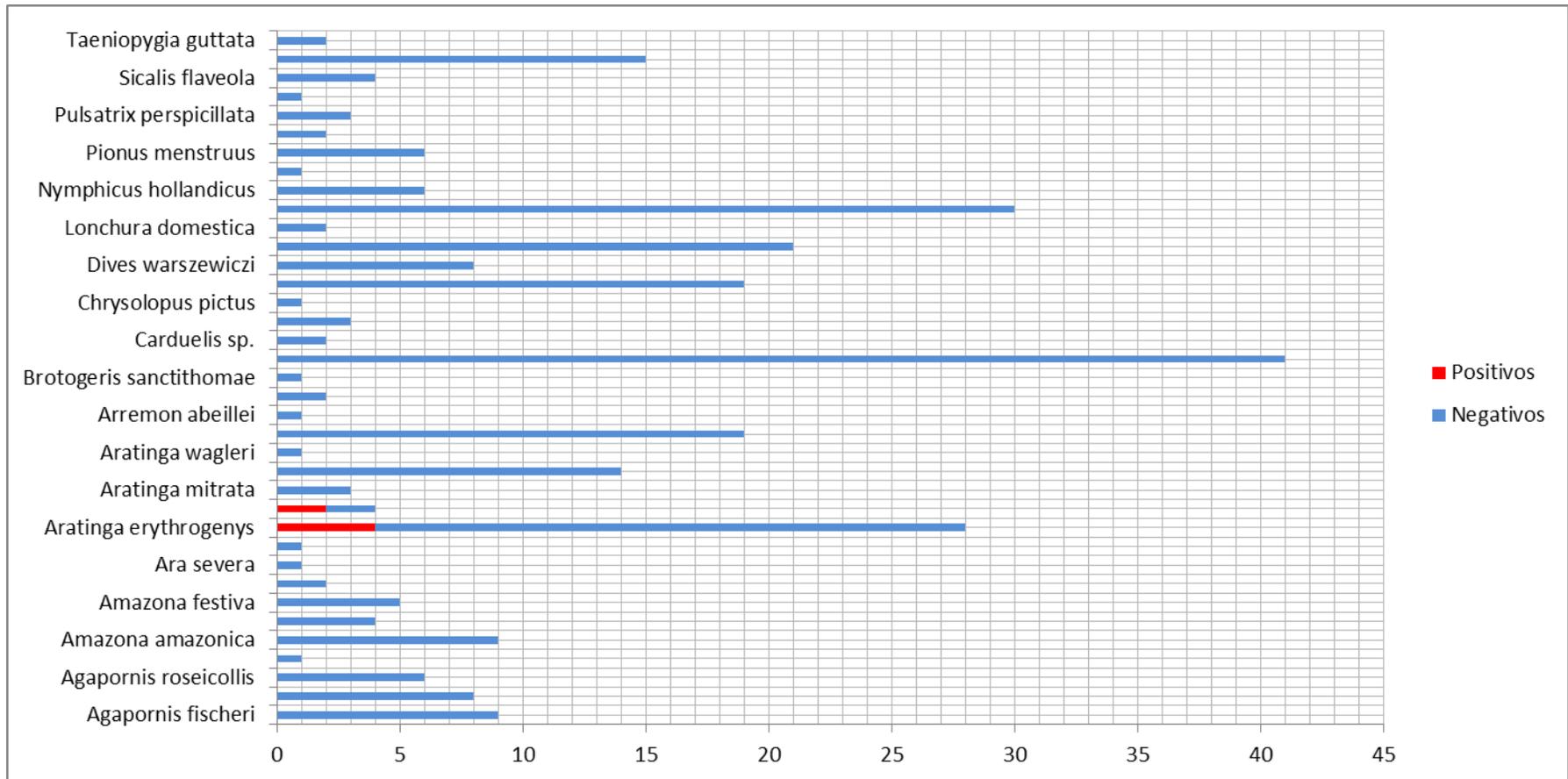
Cercado de Lima	Mercado de mascotas Plaza Unión	<i>Agapornis fischeri</i>	7	Negativo
		<i>Agapornis personatus</i>	6	Negativo
		<i>Agapornis roseicollis</i>	6	Negativo
		<i>Amazona aestiva</i>	1	Negativo
		<i>Amazona amazonica</i>	2	Negativo
		<i>Amazona farinosa</i>	1	Negativo
		<i>Chrysolopus pictus</i>	1	Negativo
		<i>Ara severa</i>	1	Negativo
		<i>Aratinga erythrogenys</i>	<b>4</b>	<b>Positivo</b>
		<i>Aratinga leucophthalmus</i>	<b>2</b>	<b>Positivo</b>
			1	Negativo
		<i>Aratinga mitrata</i>	1	Negativo
		<i>Aratinga wagleri</i>	1	Negativo
		<i>Arremon abeillei</i>	1	Negativo
		<i>Brotogeris pyrrhopterus</i>	2	Negativo
		<i>Brotogeris versicolurus</i>	4	Negativo
		<i>Carduelis sp.</i>	2	Negativo
		<i>Catamenia inornata</i>	3	Negativo
		<i>Columba livia</i>	19	Negativo
		<i>Dives warszewiczi</i>	3	Negativo
		<i>Forpus coelestis</i>	6	Negativo
		<i>Lonchura domestica</i>	2	Negativo
		<i>Melopsittacus undulatus</i>	28	Negativo
		<i>Nymphicus hollandicus</i>	6	Negativo
		<i>Paroaria coronata</i>	1	Negativo
		<i>Pionus menstruus</i>	1	Negativo
		<i>Sicalis flaveola</i>	4	Negativo
		<i>Streptopelia decaocto</i>	13	Negativo
<i>Taeniopygia guttata</i>	2	Negativo		

**Fuente: Creación Propia**

En el cuadro N°05 en este cuadro se puede observar que el mayor número de muestras obtenidas en aves silvestres en la zona centro de Lima se obtuvo en el mercado Ayacucho con el 19.3% (155/801), el ave silvestre del cual se obtuvo el mayor número de muestras fue el *Brotogeris versicolurus* con el 4.6% (37/801), esto debido al gran número de puestos pertenecientes a este mismo mercado. En la zona centro se obtuvo 14.28% (6/35) de muestras positivas para el virus de la enfermedad de Newcastle en aves silvestres, de las cuales el 66.66% (4/6) obtenidas de *Aratinga erythrogenys* y el 33.33% (2/6) de *Aratinga leucophthalmus*, todas estas muestras fueron tomadas del Mercado de mascotas Plaza Unión del Cercado de Lima.

Gráfico N.º 02. Número de muestras de aves silvestres colectadas en la zona centro de Lima, y resultados a H1 para el virus de la Enfermedad de Newcastle.

Fuente: Creación Propia



Cuadro N°06. Número de muestras de aves silvestres colectadas en mercados de la zona sur y resultados a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle.

Distrito	Mercado	Especie de aves muestreadas	Resultados para Virus de Newcastle	
			Nº de muestras por Especie de aves	Resultado HI
Lurín	Mercado de Lurín	<i>Brotogeris versicolurus</i>	4	Negativo
San Juan Miraflores	ASOC. Comerciantes - campo Ferial municipal Señor de los Milagros	<i>Numida meleagris</i>	4	Negativo
		<i>Agapornis fischeri</i>	1	Negativo
		<i>Agapornis personatus</i>	7	Negativo
		<i>Agapornis roseicollis</i>	4	Negativo
		<i>Aratinga erythrogegens</i>	11	Negativo
		<i>Aratinga leucophthalmus</i>	2	Negativo
		<i>Aratinga sp.</i>	1	Negativo
		<i>Aratinga wagleri</i>	14	Negativo
		<i>Aratinga weddellii</i>	2	Negativo
		<i>Brotogeris cyanoptera</i>	1	Negativo
		<i>Brotogeris versicolurus</i>	34	Negativo
		<i>Columba livia</i>	37	Negativo
		<i>Columbina cruziana</i>	1	Negativo
		<i>Forpus coelestis</i>	14	Negativo
		<i>Melopsittacus undulatus</i>	57	Negativo
		<i>Nymphicus hollandicus</i>	3	Negativo
		<i>Pionus menstruus</i>	3	Negativo
		<i>Psilopsiagon aurifrons</i>	4	Negativo
		<i>Sicalis flaveola</i>	1	Negativo
	<i>Streptopelia decaocto</i>	<b>2</b>	<b>Positivo</b>	
		8	Negativo	
	<i>Volatinia jacarina</i>	2	Negativo	
Villa el Salvador	Mercado 24 de Junio	<i>Aratinga leucophthalmus</i>	2	Negativo
		<i>Aratinga weddellii</i>	3	Negativo
		<i>Brotogeris versicolurus</i>	1	Negativo
		<i>Columba livia</i>	1	Negativo
		<i>Forpus coelestis</i>	2	Negativo
		<i>Melopsittacus undulatus</i>	5	Negativo

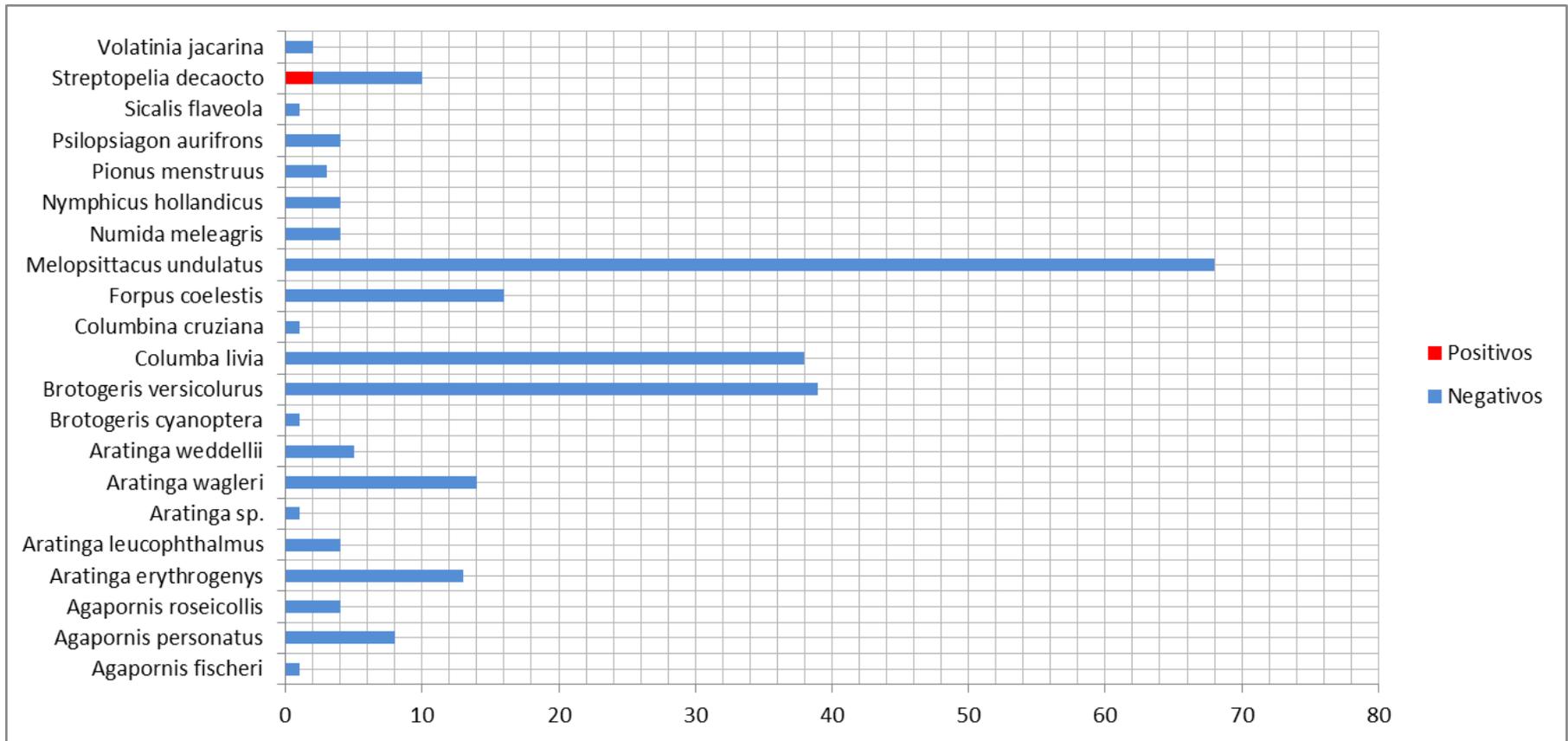
Mercado Independiente	<i>Agapornis personatus</i>	1	Negativo
	<i>Aratinga erythrogenys</i>	2	Negativo
	<i>Melopsittacus undulatus</i>	6	Negativo
	<i>Nymphicus hollandicus</i>	1	Negativo
	<i>Streptopelia decaocto</i>	1	Negativo

**Fuente: Creación Propia**

En el cuadro N°06 en este cuadro se puede observar que el mayor número de muestras obtenidas en aves silvestres en la zona Sur de Lima se obtuvieron de la ASOC. Comerciantes - campo Ferial municipal Señor de los Milagros ubicado en el distrito de San Juan de Miraflores con el 26.6% (213/801), el ave silvestre el cual se obtuvo el mayor número de muestras fue *Melopsittacus undulatus* con el 7.1% (57/801), pertenecientes a este mismo mercado. En la zona Norte se obtuvo 5.7% (2/35) de muestras positivas para el virus de la enfermedad de Newcastle en aves silvestres, las cuales el 100% (2/2) fueron obtenidas de *Streptopelia decaocto* de la ASOC. Comerciantes - campo Ferial municipal Señor de los Milagros de San Juan de Miraflores.

Gráfico N° 05. Número de muestras de aves silvestres colectadas en la zona sur de Lima y resultados a H7N9 para el virus de la Enfermedad de Newcastle.

Fuente: Creación Propia.



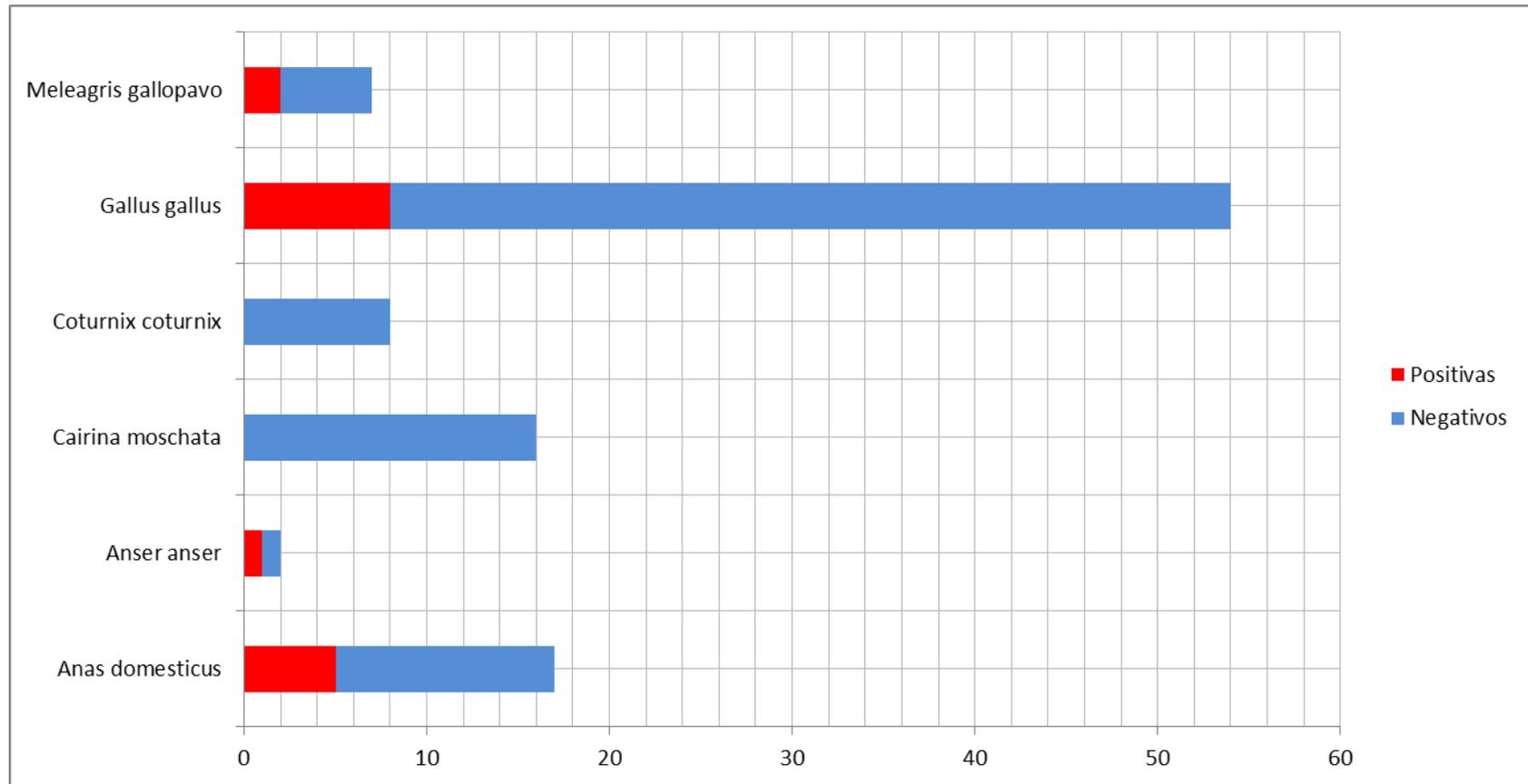
Cuadro N°07. Número de muestras de aves domésticas tipo traspatio colectadas en mercados de la zona norte y resultados a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle.

Distrito	Mercado	Especie de aves muestreadas	Resultados para Virus de Newcastle	
			N# de muestras por Especie de aves	Resultado HI
Carabayllo	Mercado 21 de setiembre	<i>Cairina moschata</i>	2	Negativo
		<i>Gallus gallus</i>	3	Negativo
	Mercado el Tambo	<i>Anser anser</i>	1	Negativo
		<i>Gallus gallus</i>	4	Negativo
Comas	Mercado Santa Luzmila	<i>Gallus gallus</i>	2	Negativo
	Mercado Shacra Cerro	<i>Gallus gallus</i>	2	Negativo
Puente Piedra	Mercado Señor de Huamantanga	<i>Anas domesticus</i>	<b>5</b>	<b>Positivo</b>
			12	Negativo
		<i>Anser anser</i>	<b>1</b>	<b>Positivo</b>
		<i>Cairina moschata</i>	14	Negativo
		<i>Coturnix coturnix</i>	8	Negativo
		<i>Gallus gallus</i>	<b>8</b>	<b>Positivo</b>
			35	Negativo
		<i>Meleagris gallopavo</i>	<b>2</b>	<b>Positivo</b>
	5	Negativo		

Fuente: Creación Propia

En el cuadro N°07 se observa que el distrito de la zona norte con el mayor número de muestras recolectadas en aves domésticas tipo traspatio es Puente piedra con el 11.23% (90/801), las aves de las cuales si obtuvo el mayor número de muestras fue *Gallus gallus* con el 5.86% (47/801), de las cuales el 91.48% (43/801) pertenecientes al mercado Señor de Huamantanga del distrito de Puente Piedra mientras que el 4.25% (2/47) perteneciente a los mercados Santa Luzmila y Mercado Shacra Cerro ambos del distrito de Comas. En esta zona se obtuvo 45.71% (16/35) de muestras positivas para el virus de la enfermedad de Newcastle en aves de traspatio, de las cuales el 31.25% (5/16) obtenidas de *Anas domesticus*, *Gallus gallus* con el 50.00% (8/16) y el 12.5% (2/16) de *Meleagris gallopavo*, todos estas muestras fueron tomadas del mercado de Señor de Huamantanga perteneciente al distrito de Puente Piedra.

Gráfico N°04. Número de muestras de aves domésticas tipo traspatio colectadas en la zona Norte de Lima y resultados a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle.



Fuente: Creación Propia

Cuadro N°08. Número de muestras de aves domésticas tipo traspatio colectadas en mercados de la zona centro y resultados a HI para el virus de la influenza aviar.

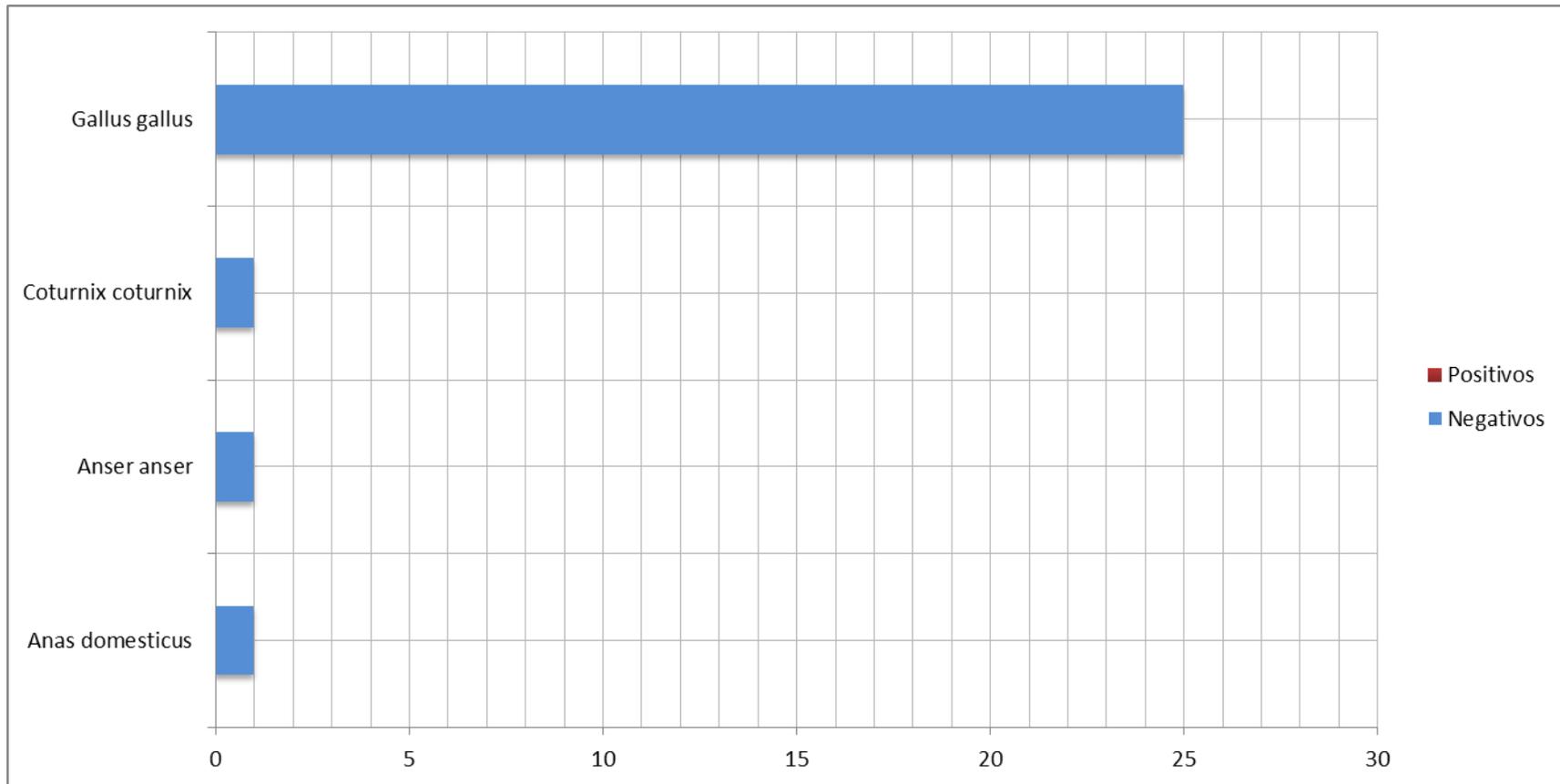
Distrito	Mercado	Especie de aves muestreadas	Resultados para Virus de Newcastle	
			Nº de muestras por Especie de aves	Resultado HI
Cercado de Lima	Mercado Ayacucho	<i>Gallus gallus</i>	2	Negativo
	Mercado de mascotas Plaza Unión	<i>Anas domesticus</i>	1	Negativo
		<i>Anser anser</i>	1	Negativo
		<i>Coturnix coturnix</i>	1	Negativo
		<i>Gallus gallus</i>	23	Negativo

**Fuente: Creación Propia**

En el cuadro N°08 se observa que el mercado en el cual se colectaron el mayor número de muestras de aves domésticas crianza traspatio fue Mercado de mascotas Plaza Unión con el 3.12% (25/801), el ave de traspatio de la cual se obtuvieron mayor número en esta Zona fue *Gallus gallus* con el 89.28% de la cuales el 82.14% (23/28) fueron obtenidas de mercado de mascotas Plaza Unión y el 7.14% (2/28) se obtuvo del mercado Ayacucho. En esta zona no se obtuvieron animales positivos en aves crianza traspatio.

Gráfico IV. El número de muestras de aves domésticas tipo tripatío colectadas en la Zona Centro de Lima y referidas a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle.

Fuente: Creación Propia



Cuadro N°09. Número de muestras de aves domesticas tipo traspatio colectadas en mercados de la zona sur de Lima para el virus de la Enfermedad de Newcastle mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación.

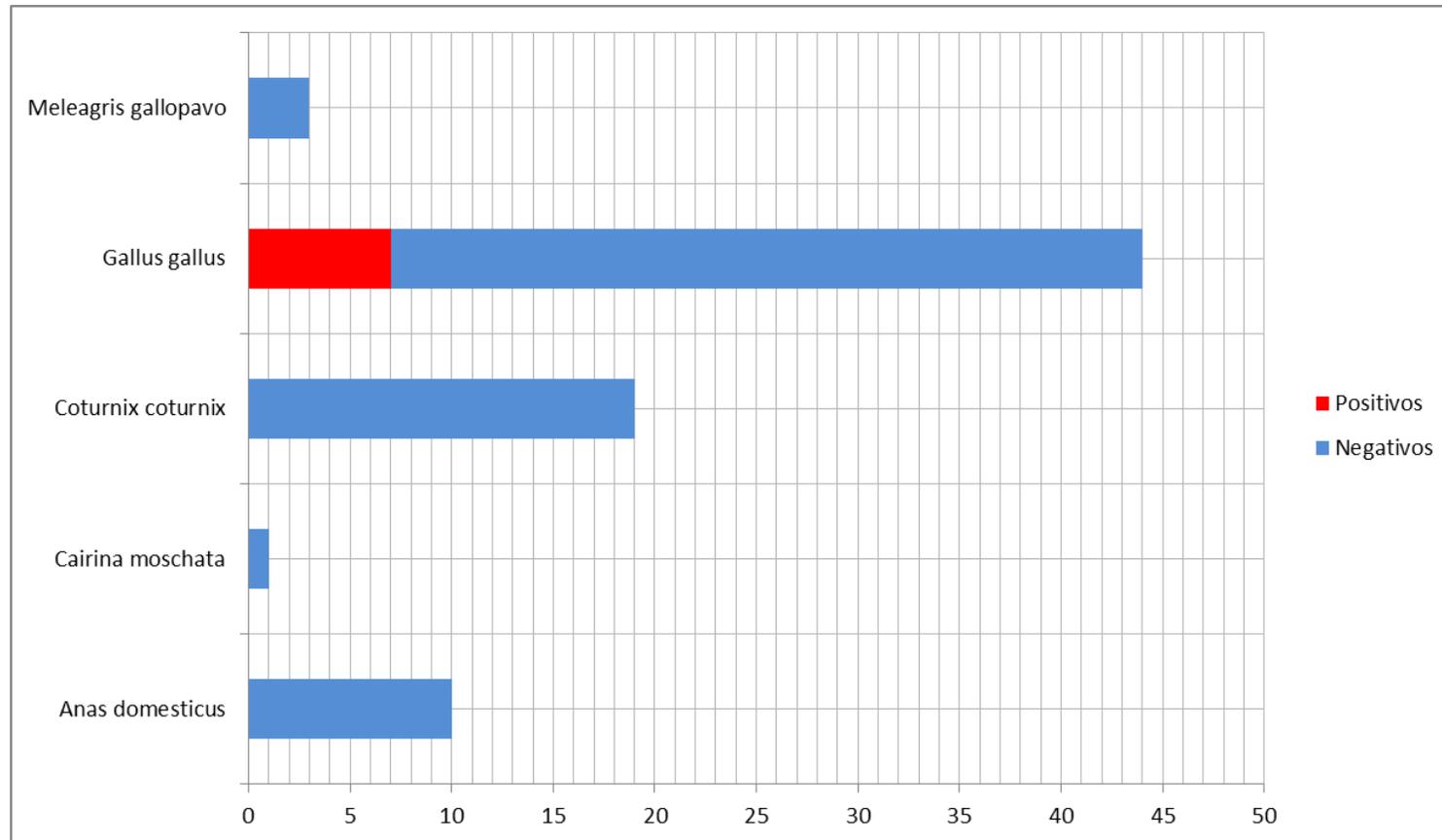
Distrito	Mercado	Especie de aves muestreadas	Resultados para Virus de Newcastle	
			N# de muestras por Especie de aves	Resultado HI
San Juan Miraflores	ASOC. Comerciantes - campo Ferial municipal Señor de los Milagros	<i>Anas domesticus</i>	7	Negativo
		<i>Cairina moschata</i>	1	Negativo
		<i>Coturnix coturnix</i>	17	Negativo
		<i>Gallus gallus</i>	<b>2</b>	<b>Positivo</b>
			37	Negativo
	<i>Meleagris gallopavo</i>	2	Negativo	
Villa el Salvador	Mercado 24 de Junio	<i>Anas domesticus</i>	3	Negativo
		<i>Gallus gallus</i>	<b>4</b>	<b>Positivo</b>
	Mercado Independiente	<i>Gallus gallus</i>	<b>1</b>	<b>Positivo</b>
		<i>Meleagris gallopavo</i>	1	Negativo
		<i>Coturnix coturnix</i>	2	Negativo

**Fuente: Creación Propia**

En el cuadro N°09 se observa que el mayor número de muestras colectadas de aves de traspatio en la zona Sur fue en la ASOC. Comerciantes - campo Ferial municipal Señor de los Milagros donde se colectaron el 8.23% (66/801), el ave domestica de crianza traspatio de la cual se obtuvo el mayor número de muestra fue *Gallus gallus* obteniéndose el 57.14% (44/77), el 50% (39/77) se recolectaron de la ASOC. Comerciantes - campo Ferial municipal Señor de los Milagros perteneciente al distrito de San Juan de Miraflores, el 5.19% (4/77) del Mercado 24 de Junio y el 1.3% (1/77) del Mercado Independiente estos dos últimos mercados pertenecientes al distrito de villa el Salvador. En esta zona se obtuvo 20.00% (7/35) de las cuales el 100%

pertenece a *Gallus gallus*, de las cuales el 28.57% (2/7) fueron recolectados en la ASOC. Comerciantes - campo Ferial municipal Señor de los Milagros del distrito de San Juan de Miraflores, el 57% (4/7) se obtuvieron del mercado 24 de Junio y el 14.28% (1/7) del mercado Independiente ambos ubicados en el distrito de Villa el Salvador.

Gráfico N°06. Número de muestras de aves domésticas tipo traspatio colectadas en la zona Sur de Lima y resultados a HI para el virus de la Enfermedad de Newcastle.



Fuente: Creación Propia

Además de las 801 muestras procedentes de aves silvestres y aves domésticas crianza traspatio comercializadas en mercados de Lima de las cuales 12 muestras pertenecientes a *Columba livia* y 1 muestra a *Coturnix coturnix* de la ASOC. Comerciantes - campo Ferial municipal Señor de los Milagros ubicado en el distrito San Juan de Miraflores, cuando estas fueron enfrentadas a antisuero del virus de la enfermedad de Newcastle no hubo reacción de inhibición de la hemaglutinación (HA), es por esta razón se decidió procesarlas a través de la técnica RT-PCR para influenza Influenza aviar tipo A, debido a la actividad hemaglutinante que estas muestras presentaron. Cuando estas 13 muestras fueron analizadas a través de RT-PCR, estas resultaron negativas al gen matriz de Influenza Aviar tipo A.

Cuadro N°10. Resultados de RT-PCR para Influenza Aviar tipo A.

Zonas	Distrito	Mercado	clasificación de aves	Especie de aves muestreadas	Positivo HA	RT-PCR a Influenza Aviar
Sur	San Juan Miraflores	Asoc. Comerciantes Campo Ferial Municipal Señor de los Milagros	Silvestre	<i>Columba Livia</i>	12	Negativo
			Traspatio	<i>Coturnix coturnix</i>	1	

**Fuente: Creación Propia**

En el cuadro N°10 se observa que en el mercado Asoc. Comerciantes Campo Ferial Municipal Señor de los Milagros 12 muestras procedentes de *Columba Livia* y 1 *Coturnix coturnix* las cuales resultaron negativas a RT-PCR a Influenza Aviar tipo A.

## **V. DISCUSIÓN**

Este estudio encontró una presencia de 4.37% (35/801) del virus de la enfermedad del Newcastle en aves silvestres y domesticas tipo traspatio comercializados en 11 mercados de Lima, de los cuales el 3.25% (26/801) pertenecientes a aves silvestres y el 1.12%(9/801) perteneciente a aves domésticas crianza traspatio.

Al respecto, Matsumiya desde el 2005 al 2007 obtuvo una presencia del 0.85% (10/1172) al realizar un estudio de vigilancia epidemiológica del virus de enfermedad de Newcastle en aves domésticas las cuales eran criadas en granjas tecnificadas y en aves silvestres de vida libre por todo el territorio de Brasil. Como podemos observar el estudio de Matsumiya tiene una presencia menor de este virus a comparación con el presente estudio; esto podría ser debido a que las condiciones del mercados evaluados presentaban condiciones de vida inadecuadas al momento del muestreo, como hacinamiento, que implica de diversas especies de diversos orígenes y edades en una misma jaula, además de una mala alimentación y pobre higiene, los cuales se consideran factores de infección por este virus. Gherzi en el año 2006 realizó un trabajo de vigilancia epidemiológica en aves silvestres de los humedales de puerto viejo, donde obtuvo una presencia 1.32% (3/297), porcentaje menor a lo encontrado en mercados, lo cual podría suponer que las condiciones de hacinamiento promueve a la infección por el virus de la enfermedad del Newcastle<sup>9</sup>; lo que en comparación con nuestros resultados reforzaría la hipótesis de que las infecciones por el virus de la enfermedad del Newcastle se ven favorecida por las condiciones de manejo de aves en los mercados tales como el hacinamiento y mezcla de especies.

Dentro del grupo de las aves silvestres que salieron positivas con mayor proporción fue *Aratinga erythrogenys* con 0.50% (4/801) y *Aratinga Leucophthalmus* con 0.24% (2/801) ambas pertenecientes al orden psitaciformes como lo podemos observar en el cuadro N°5, y con un 0.37% (3/801) de proporción tanto para *Columba livia* y *Streptopelia decaocto* las cuales pertenecen al orden Columbiformes como se observa

en los cuadros N°4 y N°6 , este estudio reafirma lo antes mencionado por otros investigadores que estos dos órdenes se encuentran entre los más susceptibles al virus de la enfermedad del Newcastle<sup>25-39-40-51</sup>. Estas especies actuarían como diseminadoras en una zona determinada para este virus, las cuales podrían ser consideradas como diseminadoras del virus para la industria avícola debido a la distribución mundial que estas aves tienen. Mientras que en las aves domésticas tipo traspatio, la mayor proporción lo obtuvo *Gallus gallus* con un 1.87% (15/801), seguido de *Anas domesticus* con 0.62% (5/801) y con un 0.25%(2/801) *Meleagris gallopavo*; según observa en los cuadros N°7 y N°9. El presente estudio reafirma lo antes mencionado por otros investigadores los cuales indican que las aves de crianza traspatio más susceptibles a la infección con el virus de la enfermedad del Newcastle son *Gallus gallus*, seguida por *Anas domesticus* y los menos afectados con este virus son los *Meleagris gallopavo*<sup>25</sup>.

La prueba diagnóstica utilizada para determinar la presencia virus de la enfermedad del Newcastle fue la inhibición de la hemaglutinación, debido a que este método diagnóstico es altamente específico y sensible, esta utiliza antisuero de PMVA-1, siendo esta la razón de su especificidad para la detección del virus de la enfermedad del Newcastle. Además las ventajas que esta prueba diagnóstica fueron su velocidad y facilidad de uso<sup>3</sup>.

Los resultados del estudio coinciden con la situación zoonosario reportado por el SENASA ante la OIE que el virus de la enfermedad del Newcastle está presente de forma endémica en las aves de Lima mostrando una presencia del 4.37% entre aves silvestres y aves tipo traspatio comercializadas en 11 mercados de Lima, esto constituye

un gran peligro para la salud animal en nuestro país, ya que este virus provoca altas tasas de mortalidad en las aves en general, provocando en la industria avícola grandes pérdidas económicas.

En el caso del virus de la Influenza Aviar, no se detectó la presencia de este virus tipo A subtipos H5 y H7 en las 801 muestras de aves silvestres y domésticas tipo traspatio comercializado en mercados de Lima, mediante la prueba de RT-PCR. Este estudio coincide con la situación zoonosanitaria con respecto al virus de la Influenza Aviar que ha sido reportada por SENASA ante la OIE el año 2005, indicando que nuestro país es libre de este virus<sup>66</sup>. Cabe recalcar que la metodología usada en este estudio nos permite evaluar la excreción viral y la posibilidad de contagio en aves muestreadas, aun cuando la detección sea limitada durante el periodo de incubación y en infecciones; además, se han realizado estudios de vigilancia epidemiológica en aves silvestres en diferentes puntos de nuestro país: virus H12N5 en humedales de Puerto Viejo con una proporción de 0.22%(2/900)<sup>8</sup>. En Pantanos de Villa en Lima demostrando la presencia del H7N3 de baja patogenicidad, con una proporción de 0.22% (2/900)<sup>53</sup>. Otro estudio realizado por toda la costa central del Perú se aislaron 4 subtipo de influenza aviar tipo A de baja patogenicidad estos fueron H3N8, H4N5, H10N9 y H13N2. Además un estudio realizado en el departamento de Ayacucho logró aislar el H10N7 del virus de la influenza aviar tipo A aquí se obtuvo una presencia de 1.33% (3/600)<sup>65</sup>. La presencia de este virus en aves silvestres no es de notificación obligatoria ante la OIE, pero estos hallazgos podrían poner en riesgo la condición de país libre para el virus de la Influenza aviar. Cabe recalcar que en Sudamérica no se había reportado este virus hasta el brote que se presentó en Chile en el año 2002, antes de este suceso no se habían realizados

estudios epidemiológicos de la presencia de este virus en esta parte del mundo<sup>64</sup>.

En el año 2002 en las ciudades de New York y New Jersey de Estados Unidos se realizó un estudio para la detección del virus influenza aviar tipo A en aves de mercados, donde se obtuvo un 13.03 % (202/1550) de presencia para el gen matriz de la influenza aviar de los cuales se obtuvo una proporción del 12,58% (195/1550) para el subtipo H7 y 0,064% (1/1550) para el subtipo H5 según el estudio realizado por Spackman<sup>63</sup>, esto nos sugiere que las condiciones en las que estas aves eran comercializadas favorecían al mantenimiento de la infección con este virus, es por esta razón que los estudios de monitoreo en mercados de aves vivas son importantes para determinar la presencia así como la ausencia de este virus, debido a las condiciones en las que las aves son comercializadas.

Utilizamos el RT-PCR a tiempo real como método diagnóstico para detectar la presencia del virus utilizado de Influenza aviar tipo A subtipo H5 y H7, esta prueba diagnóstica reduce el tiempo de identificación de virus de la influenza Aviar, ya que emplea un sistema de primers/fluorogénica por RT-PCR en tiempo real de un solo paso, lo que le permite la detección del virus influenza Aviar tipo A así como los subtipos H5 o H7. Esta prueba es rápida para el diagnóstico de este virus. En la actualidad el RT-PCR en tiempo real es el método de elección para la vigilancia del virus, debido a que esta es una prueba que aporta un diagnóstico rápido y sensible de los subtipos H5 y H7 de la influenza A, y permite un alto rendimiento<sup>3</sup>.

En los mercados de los cuales se obtuvieron las muestras para realizar este estudio se pueden observar las pobres condiciones en las que se encuentran las aves, constituyendo un riesgo en su salud ya que son; sometidas a constante estrés, hacinamiento, higiene deficiente, mezcla de especies e individuos de distintas edades y procedencia geográfica, condiciones que pueden favorecer el ingreso y diseminación de los virus de la Influenza aviar y Enfermedad de Newcastle, así como de otros agentes infecciosos, ya que estas aves una vez vendidas entran en contacto con otras aves ya sean de corral, peleas u ornamentales, logrando así la dispersión de estos agentes infecciosos entre dichas poblaciones, además es posible que se constituya un mecanismo de propagación de agentes infecciosos a zonas previamente no infectadas, esto podría significar un riesgo adicional que comprendería pérdidas económicas en la industria avícola<sup>69-70-71-72</sup>.

Estos mercados abren todos los días a la semana, durante todo el año lo que constituye un sistema muy dinámico para la entrada y dispersión de estos agentes infecciosos. Es por esta razón la importancia de este estudio ya que estos mercados son considerados una fuente importante como mecanismo epidemiológico que puede producir la propagación de ambos virus como de otros agentes infecciosos<sup>69-70-71-72</sup>.

## **VI. CONCLUSIONES**

1. En la presente investigación se identificó la presencia del virus de la Enfermedad del Newcastle 4.37% (35/801) en aves silvestres y domesticas tipo traspatio comercializadas en Mercados de Lima.
2. Los resultados de la presente investigación nos han demostrado la ausencia del virus de la Influenza Aviar de tipo A subtipos H7 y H5 en las 801 muestras provenientes de aves silvestres y aves domésticas tipo traspatio comercializadas en 11 mercados de Lima.

3. Las especies que se identificaron (positivos) a Paramyxovirus aviar tipo 1 para esta investigación fueron; *Aratinga erythrogenys*, *Aratinga leucophthalmus*, *Columba livia*, *Streptopelia decaocto*, *Gallus gallus* y *Meleagris gallopavo*.
  
4. La presente investigación permitió detectar la presencia de un virus Hemaglutinante presente en las aves silvestres y domesticas tipo traspatio comercializadas en mercados de Lima.

## **VI. RECOMENDACIONES**

PRIMERA: Se recomienda hacer seguimiento en los mercados de concurrencia masiva, con la finalidad de observar si hay aumento o disminución de las presencias del virus de la enfermedad del Newcastle o presencia del virus de la influenza aviar en Lima.

SEGUNDA: Realizar campañas de Educación sanitaria a las personas que comercializan aves vivas domésticas sobre el cuidado, manejo e higiene personal obligatoria y con las aves domésticas que ofertan, con la finalidad de mejorar las condiciones en las que estas son comercializadas.

TERCERA: Realizar campañas de concientización social masiva a la población en general sobre los riesgos que implica la compra de animales de origen desconocido, tanto en salud animal que provoca pérdidas económicas como en salud pública; con la finalidad de reducir la compra de estas aves para mascotas.

CUARTA: Que las autoridades respectivas erradiquen el comercio ilegal de aves silvestres, por el riesgo epidemiológico para la avicultura, y la salud pública en general.

QUINTA: Que se realicen otras investigaciones relacionadas a la presente investigación con la finalidad de incorporar nuevos conocimientos y llenar los vacíos que pueden haber quedado de la presente investigación.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).Página principal en Internet OIE 2012 [Internet] OIE 2012, calle de Prony, 75017 Paris, Francia actualizada [updated 2012; cited 2012 Ago13]. Disponible en: <http://www.oie.in/>
2. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).OIE. Manual Terrestre capítulo 2.3.4 Influenza aviar 2015. [Internet] OIE 2015, calle de Prony, 75017 Paris, Francia actualizada [updated 2015; cited 2015 Jul 24]. Disponible: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.03.04\\_AI.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf)
3. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).OIE. Manual Terrestre de la OIE capítulo 2.3.14 Enfermedad del Newcastle, 2012 [Internet] OIE 2012, calle de Prony, 75017 Paris, Francia actualizada [updated 2012; cited 2015 Jul 24]. Disponible:  
[http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.03.14\\_Enfermedad\\_Newcastle.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.03.14_Enfermedad_Newcastle.pdf)
4. Organización mundial de la Salud, Portal (OMS) Gripe por A (H1N1): preguntas frecuentes [Internet], OMS Avenue Appia 20, 1211 Ginebra 27, Suiza; [updated 2009 abril 27; cited 2015 Feb 28]. Disponible: <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/faq/es/>

5. Organización mundial de la Salud, Portal (OMS) Gripe aviar [Internet], OMS Avenue Appia 20, 1211 Ginebra 27, Suiza; [updated 2014 Marzo; cited 2015 Feb 28]. Disponible: [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian\\_influenza/es/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/es/)
6. Anhlan D, Grundmann N, Makalowski W, Ludwig S y Scholtissek C. Origin of the 1918 pandemic H1N1 influenza A virus as studied by codon usage patterns and phylogenetic analysis.[Internet] 2011 Jan [cited 2015 Feb 28]. 17(1): 64–73 Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3004067/>
7. Organización mundial de la Salud, Portal (OMS) Declaración del Dr. Keiji Fukuda en nombre de la OMS durante la audiencia del Consejo de Europa sobre la pandemia de gripe por H1N1. 2009[Internet], OMS Avenue Appia 20, 1211 Ginebra 27, Suiza; [updated 2010 Ene 27; cited 2015 Feb 28]. Disponible:
8. Segovia K. Presencia del Virus de Influenza Aviar en las Aves Silvestres de Los Humedales de Puerto Viejo.[Tesis. Bachiller]. Lima, Perú; Facultad de Medicina veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2011.
9. Gherzi B. Presencia del virus de la enfermedad del Newcastle en las aves silvestres de los humedales de Puerto Viejo. [Tesis. Bachiller]. Lima, Perú; Facultad de Medicina veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2011
10. Mancipe J, Ramírez N, Jaime C, Vera A. Cultivos celulares como alternativa para el aislamiento y la producción de biológicos contra el Virus de Influenza. Línea de Investigación en Microbiología y Epidemiología. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. 2011. [Epub ahead of print]. Disponible en: [http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/NOVA15\\_REVIS1\\_CULTIVO S.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA15_REVIS1_CULTIVO S.pdf)
11. Ministerio de Salud (MINSA) Homepage en internet MINSA 2012. [Internet] Av. Salaverry 801 Jesús María Lima / Perú [update 2012; cited 2012 Ago 13]. Disponible: [http://www.minsa.gob.pe/portada/prensa/notas\\_auxiliar.asp?nota=7634](http://www.minsa.gob.pe/portada/prensa/notas_auxiliar.asp?nota=7634)
12. Icochea D' A. Interrelación entre Aves Silvestres y Enfermedad de NewCastle. [Tesis. Post. Grado]. Lima, Perú; Facultad de Medicina veterinaria Universidad Nacional Mayor de San Marcos.2007.
13. Ravina P. Monitoreo Serologico de La Enfermedad del Newcastle Efectuado en Aves Domésticas (Gallus gallus) en Ica, Arequipa, Moquegua, Tacna, Junin Huancavelica, Ayacucho, Cuzco, Apurimac y Puno.[Tesis. Bachiller]. Lima, Perú; Facultad de Medicina veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2001.

14. Thinh T, Gilbert M, Bunpapong N, Amonsin A, Nguyen D, Doherty P, and Huyvaert K. Avian Influenza Viruses in Wild Land Birds in Northern Vietnam, 2012; 195-200, wildlife association 2012.
15. Rondón J. Vigilancia dirigida de influenza aviar en aves silvestres de los humedales de Puerto Viejo usando patos domésticos (*Cairina moschata*) como centinelas [Tesis. Post. Grado]. Lima, Perú; Facultad de Medicina veterinaria Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2011
16. Servicio de sanidad Agrario (SENASA). Sanidad Avícola SENASA 2012. [Internet] Av. La Molina N° 1915, La Molina Lima 12, Perú [updated 2012; cited 2012 Ago 13]. Disponible en: [http://spe.epiredperu.net/Act-SemAviar/aviar\\_acciones.pdf](http://spe.epiredperu.net/Act-SemAviar/aviar_acciones.pdf)
17. Servicio de sanidad Agrario (SENASA). Homepage en internet SENASA 2012. [Internet]; Av. La Molina N° 1915, La Molina Lima 12, Perú [updated 2012; cited 2012 Ago 13]. Disponible en: <http://www.senasa.gob.pe/>
18. Ramanujan, K. Bird markets pose major threat for transfer of deadly avian flu virus across U.S. borders, according to Lab of O expert. CHRONICLE ONLINE. 2015 Oct 19. [Epub ahead of print]. Disponible en: <http://www.news.cornell.edu/stories/May06/BirdMarkets.kr.html>
19. Talledo M y Zumaeta K. Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1 Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Mayor de San Marcos (UNMSM). Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1 [Internet]. 2010 Ene. [cited 2015 Oct 13] 16(2): 227 – 2 Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v16n2/a18v16n2.pdf>
20. Rodríguez E. La gripe o Influenza Aviar [Internet] Instituto de Estudio del Huevo [cited 2015 Oct 13] Disponible en: [http://www.institutohuevo.com/images/archivos/gripe\\_aviar.\\_ferri06\\_13125226.pdf](http://www.institutohuevo.com/images/archivos/gripe_aviar._ferri06_13125226.pdf)
21. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) WAHIS INTERFACE información Zoonositaria OIE 2012 [Internet]. Calle de Prony, 75017 Paris, Francia actualizada [updated 2012; cited 2012 Ago 13]. Disponible: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalsituation](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalsituation)
22. Gherzi B, Blazes D, Ichochea E, Gonzales R, Kochel T, Tinoco Y, Sovero M, Lindstrom S, Shu B, Klimov, Gonzalez A y Montgomery J. Avian Influenza in wild Birds, Central coast of Peru, Emerging infectious Diseases. Vol 15 No 6, June 2009.
23. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) Normas internacionales OIE 2012 [Internet]. Calle de Prony, 75017 Paris, Francia actualizada [updated 2012; cited 2012 Ago 13]. Disponible: [http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre\\_1.10.4.htm](http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre_1.10.4.htm)

24. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) Normas internacionales OIE 2012 [Internet]. Calle de Prony, 75017 Paris, Francia actualizada [updated 2012; cited 2012 Ago13]. Disponible: en: [http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre\\_1.10.9.htm](http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre_1.10.9.htm)
25. The center for Food Security & Public Health. Enfermedad de Newcastle. Infección por Paramixovirus Aviar. [Internet] Center for Food Security and Public Health 2160 Veterinary Medicine Iowa State University of Science and Technology [update 2008 Jul; cited 2012 Nov 2013] Disponible: [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/enfermedad\\_de\\_newcastle.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/enfermedad_de_newcastle.pdf)
26. Enrique A. Enfermedad del Newcastle Aviar. (Guadalajar-Mexico) Newcastle es considerada como una enfermedad altamente contagiosa (Virbac). Revista Virbac Publicación Trimestral NO. 12.
27. Thomas N, Hunter B and Atkinson C, infectious Diseases of wild Birds, Backwell Publishing Ltd, Oxford; 2007.
28. Moreno C. 1994. La enfermedad de Newcastle y algunos avances Recientes de Diagnósticos. Laboratorio de Microbiología Experimental Departamento de Virología e inmunología Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de México. México D.F. 2010
29. El último Foco de ENC fue registrado en Octubre de 1987. Argentina:(3) Disponible en: <http://www.aviculturaargentina.com.ar/sanidad/Enfermedad%20de%20Newcastle.pdf>
30. Acha, Boris Szyfres. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes del hombre y a los Animales. 3<sup>a</sup> ed. Vol II. Clamidirosis, rickettsiosis y virosis. Washington DC, OPS. 2003.
31. Servicio de sanidad Agrario (SENASA). Boletín informativo Sanidad Avícola SENASA 2012 [Internet] Av. La Molina N° 1915, La Molina Lima 12, Perú [updated 2012; cited 2012 Ago 13]. Disponible: [http://www.senasa.gob.pe/RepositorioAPS/0/1/JER/ANRIEVI EP\\_ESTATUTUSZ OO/boletin%2012%20dic%20\(web\).pdf](http://www.senasa.gob.pe/RepositorioAPS/0/1/JER/ANRIEVI EP_ESTATUTUSZ OO/boletin%2012%20dic%20(web).pdf)
32. Actualidad Avipecuaria Lima; Retos y oportunidades de exportación para el sector avícola peruano [internet] Camino del Inca 485 - San Miguel Lima - Perú [update 2012 Jun 14; acceso 14 Setiembre 2012]. Disponible en: <http://www.actualidadavipecuaria.com/articulos/retos-y-oportunidades-de-exportacion-para-el-sector-avicola-peruano.html>

33. The center for Food Security & Public Health. Influenza aviar de alta patogenicidad. Peste aviar, gripe aviar. [Internet] Center for Food Security and Public Health 2160 Veterinary Medicine Iowa State University of Science and Technology [updated 2010 enero; cited 2012 Ago13]. Disponible: [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/influenza\\_aviar\\_de\\_alta\\_patogenicidad.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/influenza_aviar_de_alta_patogenicidad.pdf) .
34. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), Normas [internet] Calle de Prony, 75017 Paris, Francia actualizada [updated 2012; cited 2012 Ago13]. Disponible: [http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre\\_1.10.4.htm](http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre_1.10.4.htm)
35. [Soliman A](#), [Saad M](#), [Elassal E](#), [Amir E](#), [Plathonoff C](#), [Bahgat V](#), [El-Badry M](#), [Ahmed LS](#), [Fouda M](#), [Gamaleldin M](#), [Mohamed NA](#), [Salyer S](#), [Cornelius C](#), [Barthel R](#). Surveillance of avian influenza viruses in migratory birds in Egypt. Journal of Wildlife Diseases [serial on the Internet]. 2012 Setp [cited 2012 Setp. 12]; 48(3):669-675: [about 6 p.].
36. Think TV, Gilbert M, Bunpapong N, Amonsin A, Nguyen DT, Doherty PF Jr, Huyvaert KP. Avian influenza viruses in wild land birds in northern Vietnam. Journal of Wildlife Diseases [serial on the Internet]. 2012 Setp [cited 2012 Setp. 14]; 48(1): 195–200: [about 8 p.].
37. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), Normas internacionales OIE 2012 [Internet]. Ginebra, Suiza; Organización Mundial de Salud 2012 [actualizada en Setiembre de 2012; acceso 16 Setiembre 2012]. Disponible en : [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/influenza/WHO\\_manual\\_on\\_animal-diagnosis\\_and\\_surveillance\\_2002\\_5.pdf](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/WHO_manual_on_animal-diagnosis_and_surveillance_2002_5.pdf)
38. Pilco R. Diagnóstico de la Comercialización de Fauna Silvestre. [Tesis. Bachiller]. Pucallpa-Perú. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Ucayali. 2012
39. Mendoza R. Monitoreo del virus del NewCastle en aves silvestres en la laguna albufera de medio mundo. [Tesis. Bachiller]. Lima, Perú; Facultad de Medicina veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.
40. Ventocilla W. Presencia del virus de la enfermedad de NewCastle en las heces de las aves silvestres de la laguna albufera “El Paraíso” [Tesis. Bachiller]. Lima, Perú; Facultad de Medicina veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009.
41. González-Acuña, Silva G., Moreno S., Cerda L, Donoso E., Cabello C. y López M. Detección de algunos agentes zoonóticos en la paloma doméstica (*Columba livia*) en la ciudad de Chillán, Revista Cielo [serie en Internet]. 2012 Setp [citado 2012 Set. 14]; 24 (3): 199-203: [about 3 p.]. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v24n3/art04.pdf>

42. Shaheen, A. D. Anjum and F..Clinico-Pathological observations of pigeons (*Columbia livia*) suffering from NewCastle disease. Pakistan Vet. [serial on the Internet]. 2012 Set. [cited 2012 Setp. 15]; 25(1): 1–4: [about 3 p.]. Disponible en: [http://www.pvj.com.pk/pdf-files/25\\_1/5-8.pdf](http://www.pvj.com.pk/pdf-files/25_1/5-8.pdf)
43. Tietz M., De Quadros, Da Silval and BALDO Parasites of pigeons (*Columba livia*) in urban areas of lages, Southern Brazil. 2007, 62: 183 - 187
44. Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y Otras Enfermedades Exóticas de los Animales. Control y Erradicación de la Aviar Altamente Virulenta. Mexico.p 1-55.
45. Centro Nacional de vigilancia epidemiológica y control de enfermedades. Manual para la toma de muestras virus del oeste del Nilo en aves 2008. Dirección General de Salud Animal; 208 p.1-11
46. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las vacunas para animales terrestres (mamíferos, aves y abejas) Normas internacionales OIE 2012 [Internet]. Ginebra, Suiza; Organización Mundial de Salud 2012 [actualizada en Setiembre de 2002; acceso 16 Setiembre 2012]
47. Aprueban Reglamento de Control y Erradicación de la Enfermedad de Newcastle DECRETOS SUPREMOS N° 010-2003-AG (30/12/2005)
48. Tizard I and Richard M, Inmunología Veterinaria, 6<sup>a</sup> ed. Mc Graw-Hill Interamerica de editores S.A de C.V. Mexico DF. 2000
49. Quevedo A. Rol de las Aves Silvestres Acuáticas Migratorias en la Transmisión del Virus de la influenza Aviar.[Tesis. Bachiller]. Lima, Perú; Facultad de Medicina veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2006.
50. Canales O. Principales Enfermedades Zoonoticas en Aves.[Tesina. Bachiller]. Lima, Perú; Facultad de Medicina veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2006.
51. Mora M. Enfermedad del Newcastle. [Tesina. Bachiller]. Lima, Perú; Facultad de Medicina veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2005.
52. Matsumiya M. Vigilância Epidemiológica do virus da Doença Newcastle en aves domésticas e Selvagens pelo método de Real time PCR.[Tese. Doutorado]. São, Paulo, Interunidades em biotecnología USP/ Instituto Butantan/ IPT. 2009
53. Gherzi B. Merly M. Sovero, Eliana Icochea, Rosa I. Gonzalez, David L. Blazes, Armando E. Gonzalez and Joel M. Montgomery Isolation of Low-pathogenic H7N3 Avian Influenza from Wild Birds in Peru. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, School of Veterinary Medicine, 2011

54. La Republica.pe, Lima; Perú es el tercer país en consumo de pollo en la región con 35 kilos al año [Internet] Diario La República 2015 [updated 2012 May 13; acceso 16 Setiembre 2015]. Disponible en : <http://larepublica.pe/12-05-2012/peru-es-el-tercer-pais-en-consumo-de-pollo-en-la-region-con-35-kilos-al-ano>
  
55. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). OIE. Manual Terrestre capítulo 2.3.4 Infección por el Virus de la Anemia infecciosa del Salmon. [Internet] OIE 2015, calle de Prony, 75017 Paris, Francia actualizada [updated 2015; cited 2015 Jul 24]. Disponible: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.03.04\\_AI.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf)
  
56. Caballero F. Evaluación Experimental de la Patogenicidad de un virus Velogenico Vicerotropico de la enfermedad del Newcastle y su respuesta inmune humoral en aves columbiformes. [Tesis. Bachiller]. Lima, Perú; Facultad de Medicina veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2003.
  
57. Quevedo T. Estudio Clínico, Serológico y anatomohistopatologico experimental de la Enfermedad de Newcastle causada por una cepa Velogenica del virus en Codornices. [Tesis. Bachiller]. Lima, Perú; Facultad de Medicina veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2006
  
58. Gonzales M. Presencia de anticuerpos de Influenza A en Aves, Lima 1986. [Tesis. Bachiller]. Lima, Perú; Facultad de Medicina veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1987.
  
59. Cajacuri C. Concordancia entre las Pruebas de inhibición Hemaglutinacion (HI) y ELISA, en la detección de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle en Pollos de Engorde. Tesis. Bachiller]. Lima, Perú; Facultad de Medicina veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
  
60. Chávez L. Efectividad de tres programas vacunales contra la enfermedad de Newcastle Usando Vacunas Entéricas Tesis. Bachiller]. Lima, Perú; Facultad de Medicina veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
  
61. Ayllón J. El virus de la enfermedad de Newcastle: Modelo de interacción virus-célula y vector de expresión. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celuar. Universidad de Salamanca. 2009. 211
  
62. Servicio de Sanidad Agrario de Argentina. Manual de procedimientos Influenza Aviar [Internet]. Av. Paseo Colón 367 C1063ACD, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina; SENASA. 2009.72 [update:2009; acceso 13 agosto 2015]. Disponible en: <https://viejaweb.senasa.gov.ar/Archivos/File/File3018-manual-procedimientos-influenza-aviar.pdf>.

63. Spackman E, Senne D, Myers T, Bulaga L, Garber L, Perdue M, Lohman K, Daum L,7 and Suarez D. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 2002, p. 3256–3260. Vol. 40, No. 9.
64. Rojas H, Moreira R. Influenza Aviar en Chile 2002: una Sinapsis [Internet] 2006 Oct [cited 2016 Feb.24] 32pp Disponible: <http://repiica.iica.int/DOCS/B0543E/B0543E.PDF>
65. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). OIE. Mejorar la vigilancia de las enfermedades de los animales salvajes para protegerlos y para protegernos de las enfermedades que nos transmiten. [Internet] OIE 2015, calle de Prony, 75017 Paris, Francia actualizada [updated 2016; cited 2016 Mar 19]. Disponible: <http://www.oie.int/es/para-los-periodistas/editoriales/detalle/article/improving-wildlife-surveillance-for-its-protection-while-protecting-us-from-the-diseases-it-transmit/>
66. Resolución Jefatural. N° 273-2005-AG-SENASA, (30 de diciembre del 2005).
67. Aprueban Reglamento de Control y Erradicación de la Enfermedad de Newcastle. DECRETO SUPREMO N° 010-2003-AG, ( 8 de marzo de 1984).
68. El sitio Avicola. Epidemiología molecular de la enfermedad de Newcastle. [Internet] Publishing, Benchmark House, 8 Smithy Wood Drive, Sheffield, S35 1QN, England. [updated 30 marzo 2012; cited 2016 abril 01] Disponible: <http://www.elsitioavicola.com/articles/2135/epidemiologia-molecular-de-la-enfermedad-de-newcastle/>
69. Wisedchanwet T, Wongpatcharachai M, Boonyapisitsopa S, Bunpapong N, Jairak W, Kitikoon P, Sasipreeyajun J, and Amonsin A. Influenza A Virus Surveillance in Live-Bird Markets: First Report of Influenza A Virus Subtype H4N6, H4N9, and H10N3 in Thailand. Summarized from Avian Diseases, Vol. 55, No. 4, 2011, Pages 593–602.
70. Servicio de sanidad Agrario Argentina (SENASA). Programa de Aves y Granja Dirección de Lucha Sanitaria, Dirección Nacional de Sanidad Animal. Informe del Programa de Vigilancia Epidemiológica para la Influenza Aviar y la Enfermedad de Newcastle en aves domésticas, en la República Argentina año 2008 [update:2008; acceso 6 abril 2016].
71. Mendoza A P, Gherzi B, Cavero N, Villena M, Lujan C, Ibañez Y, Segovia K, Razuri H, Montgomery J y Brightsmith D. Monitoreo de agentes patógenos en el comercio de aves domésticas, exóticas y silvestres en los mercados de Perú. 1 Wildlife Conservation Society, Lima, PERÚ; 2 Naval Medical Research Center Detachment, Lima, PERÚ; 3 Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, PERÚ; 4 Schubot Exotic Bird

Health Center, Texas A&M University, College Station, EEUU. XXII-PANVET-2010-481-PER-P.

72. Mendoza A P, Ghersi B, Cavero N, Villena M, Lujan C, Ibañez Y1, Segovia K, Razuri H, Montgomery J and Brightsmith D. AVIAN INFLUENZA AND NEWCASTLE DISEASE VIRUSES IN THE LIVE BIRD TRADE OF PERU. Iguazú, Argentina. 59th Annual International Conference of the Wildlife Disease Association. WDA 2010

## VIII. ANEXOS

### Anexo N°1: Protocolo IACUC WCS-PREDICT #16027 (Primera página)

PROTOCOL FOR ANIMAL USE & CARE		Protocol #: 16027 Date Expires: 8-Sep-2012
<b>1. Contacts</b>		
<b>Primary Investigator</b>		<b>Alternate Contact</b>
<b>Name:</b> Jonna W Mazel *		<b>Name:</b> Wendy W Weisman
<b>E-mail:</b> jwmazel@ucdavis.edu, wweisman@wcs.org		<b>E-mail:</b> wweisman@wcs.org
<b>Department:</b> VM, Medicine & Epidemiology		<b>Department:</b> Wildlife Health Center
<b>Telephone:</b> 530-754-9035		<b>Telephone:</b> 718-220-5892
<b>After Hours:</b> 530-304-1231		<b>After Hours:</b> 212-989-5416
<i>*Primary contact for sick animals</i>		
<b>2. Title</b>		
PREDICT-Wildlife Conservation Society		
<b>3. Protocol Type</b>		
Field Activity: Research or Teaching Permit Type: <b>Required permits will be obtained</b> Permit Number: <b>Pending</b> Expiration Date: <b>Pending</b>		
<b>4. Species</b>		
<b>Common Names</b>	<b>Total Number for Study</b>	<b>Name of Source of the Animals</b>
rat - <i>RODENTS, including rats, mice</i>	10500	Wild free-ranging (500), captive wildlife (20,000), domestic (5,000)
rat	250	Amendments-Same as original source
primate	5500	Wild free-ranging (500), captive wildlife (5000)
other bird	30000	Wild free-ranging (5,000), captive wildlife (20,000), domestic (5,000)
other - <i>PANGOLINS</i>	6000	Wild free-ranging (1000), captive wildlife (5,000)
other - <i>CARNIVORES</i>	7000	Wild free-ranging (1,000), captive wildlife (1,000), domestic (5,000)
other - <i>UNGULATES</i>	11000	Wild free-ranging (1,000), Captive wildlife (5,000), domestic (5,000)
other - <i>REPTILES</i>	6000	Wild free-ranging (1,000), captive wildlife (5,000)
other - <i>XENARTHRA</i>	500	Wild free ranging and captive wildlife
bat	11000	Wild caught(10,000), captive wildlife (1,000)
bat	250	Amendments-Same as original source
<b>5. Procedures</b>		
<p>In this project surveying animals globally for zoonotic diseases, animals will be safely and humanely captured, handled, sampled, and released to their wild habitats or returned to the owners who provided the researchers access to the animals.</p> <p>The following are standard practices are observed by the researchers and their staff for all such activities:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>In the case of all free-ranging wild animal captures and sampling, animals will be released as close to capture site as possible, under no circumstances to exceed 1 kilometer from capture site.</li> <li>Great care will be taken to minimize disruption to social groups/colonies, and to habitat, whenever wild free-ranging animals are captured.</li> <li>All staff handling and sampling animals will be trained and experienced in handling and sampling of wildlife in the field.</li> <li>In any case where a punch biopsy is taken, animal will receive some form of chemical restraint as outlined in this protocol.</li> <li>In the case of captive animals, domestic animals and trade sampling:             <ol style="list-style-type: none"> <li>under no circumstances will animals be purchased from hunters/traders/other sellers ("owners"), nor will other monetary reward be offered for cooperation in the sampling effort, to ensure that the project does not provide further incentive for hunting and/or wild animal trade.</li> <li>captive wild animals belonging to owners will be briefly handled, with consent of owners, for biological sample procedures only. Animals will be released back to the owner (or confiscating agency that is facilitating the sampling, as applicable) upon completion of sampling.</li> </ol> </li> <li>WCS staff members funded under PREDICT will not euthanize any animal for the purpose of sampling it, nor will they facilitate or encourage other</li> </ol>		

## Anexo N°2: Ficha de colecta de datos



### ESTUDIO DE ENFERMEDADES EN ANIMALES SILVESTRES

#### FICHA DE MUESTREO N°:

Ciudad:	Fecha:	Hora de inicio:
Maneja:	Muestrea:	Apunta:
		Hora de término:
<b>DATOS DEL INDIVIDUO</b>		
Especie:	Sexo:	Edad aprox.:
Código de individuo:	Nombre:	Peso:
Procedencia:	Explicar:	Tratamientos previos (registrar cuál y hace cuanto tiempo):
Encontrado		Antibióticos
Regalado		Antiparasitarios
Comprado		Vacunas:
Evaluación Clínica: Condición corporal: 1(cauquético) 2 (magro) 3(musculoso) 4(graso) 5(obeso)		
Lesiones externas:		
Dentadura (identificar pérdida de dientes, caries, etc):		
Otros:		
Manejo: <input type="checkbox"/> Suelto en casa <input type="checkbox"/> Suelto en patio <input type="checkbox"/> Atado <input type="checkbox"/> Encierro por horas <input type="checkbox"/> Encierro permanente		
Explicar:		
Numero de personas en casa:		Otras mascotas (# y especie)

Cant.	Muestra	Código de muestra	PROTOCOLO ANESTÉSICO					
			RMACOS	EMPLEADO	DOSIS (mg/kg p.v.)	VOLUMEN (ml)		
SANGRE								
	EDTA							
	SUERO							
	FTA							
	PS903		Hora de aplicación:					
	Frotis		Hora de efecto alcanzado:					
	Frotis + TBS		Hora de efecto finalizado:					
	Knotts		Tiempo	Tº	FR	FC	PULSO	SAPO2
HISOPADOS ORALES			5'					
	Buffer lysis		10'					
	Nuclisens BL		15'					
	RNA Later		20'					
	UTM		25'					
HISOPADOS RECTALES			30'					
	Cary blair		35'					
	RNA Later		40'					
	UTM		45'					
	Sin preserv.		50'					
HECES			55'					
	Sin preserv.		60'					
	Dicromato K							
	SAF		<b>OBSERVACIONES</b>					
PELOS								
OTROS								

### Anexo N°3: Resultados de rt-PCR para Influenza Aviar



**PCR Quantification Detailed Report**  
**PCR Base Line Subtracted Curve Fit Data (FAM)**  
 Contains All Available Data

**General Data**

Data File Name	A AIV Kit QIAGEN RI 2561 Lima 28-05-13.pts.opd
Data File Path	C:\Archivos de programa\Bio-Rad\iQ5\Users \admin\INFLUENZA\TIPO A\2013\Matrix
Collected Data	Collected Data
Current Date	28/04/2015 11:25:06
Run Date	28/05/2013 14:55:07
User aborted the run	No
Active RMEs	Original
Active Well Factors	Dynamic
Background Readings Valid	Yes
RME Valid	Yes
Well Factors Valid	Yes
Plate Setup File Name	A AIV Kit QIAGEN RI 2561 Lima 28-05-13.pts
Plate Setup File Path	C:\Archivos de programa\Bio-Rad\iQ5\Users \admin\INFLUENZA\TIPO A\2013\Matrix
Protocol File Name	Influenza type A_MATRIX_ Quantitec QIAGEN 03- 05-13.tmo
Protocol File Path	C:\Archivos de programa\Bio-Rad\iQ5\Users \admin\INFLUENZA\TIPO A\2013\Matrix
Computer name	PORTATIL_LSA
Created by app	iQ5.exe (v2.0.148.60623, (OS-Microsoft Windows NT 5.1.2600.0.Service Pack 3, CLR-1.1.4322.573, Culture-en-US).)
Created by user	BioRad\admin
Creation Date	28/05/2013 14:55:07
Created in Security Edition	No
Last Creation GUID	48a87195-9e15-4ed0-aadd-e794b0ec7980
Modified by user	BioRad\admin
Last modified date	28/05/2013 14:55:07
OS Build and Service Pack	2600 (Service Pack 3)
Report differs from last save	No

**Notes:**

**Protocol:**

Cycle 1: (1X)		
Step 1:	50,0 °C	for 30:00.
Cycle 2: (1X)		
Step 1:	95,0 °C	for 15:00.
Cycle 3: (45X)		
Step 1:	95,0 °C	for 00:15.
Step 2:	53,4 °C	for 00:45.

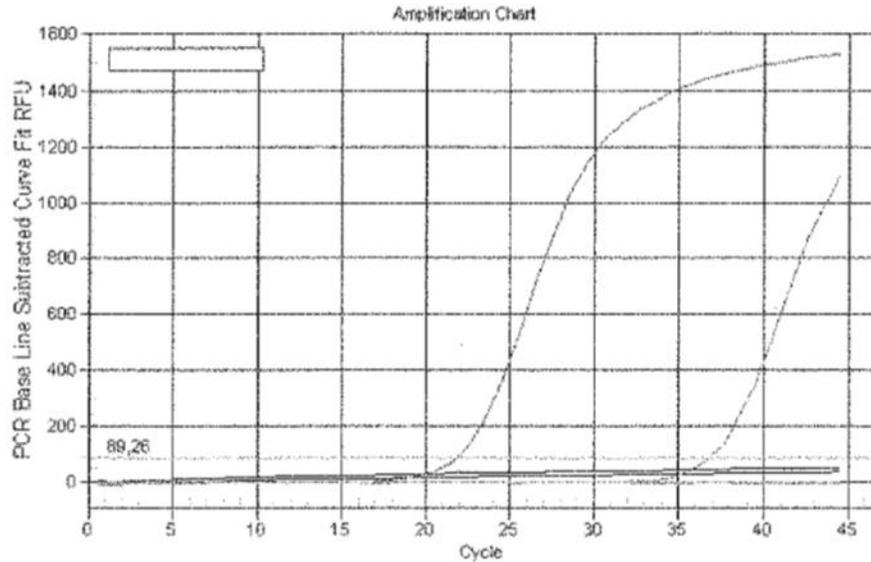
Data collection and real-time analysis enabled.

**Modified Protocol:**

Protocol unchanged

**PCR Quantification Data**

**PCR Amp/Cycle Chart**



**Standard Curve Data**

**Standard Curve Chart**

Not available

Fluor	PCR Efficiency(%)	R Squared	Slope	y-Intercept
FAM	100,0	0,000	0,000	0,000
Fluor	Units Changed?	Quantity Units	Original Units	
FAM	No	copy number	copy number	

Number of valid standard wells: **None**

**Standard Curve Spreadsheet Data**

Fluor Set	Well Type	Ident	Rep	Ct	Log	SQ	SQ	SQ	Ct	Ct
					SD	Mean	SD	Mean	SD	
FAM	A05 Unkn	2HT RI 2561 Linn	1		N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	
	0,000 N/A									
FAM	A06 Unkn	2HC RI 2561 Linn	9		N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	
	0,000 N/A									
FAM	B05 Unkn	2HT RI 2561 Linn	2		N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	
	0,000 N/A									
FAM	B06 Unkn	2HC RI 2561 Linn	10		N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	
	0,000 N/A									

FAM .00	C05 0,000 N/A	Unkn	3HT RI 2561 Lima	3	N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
FAM .00	C06 0,000 N/A	Unkn	4HC RI 2561 Lima	11	N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
FAM .00	D05 0,000 N/A	Unkn	4HT RI 2561 Lima	4	N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
FAM N/A	D06 Neg Ctrl		C- pulpaon	1	N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
FAM .00	E05 0,000 N/A	Unkn	3HT RI 2561 Lima	5	N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
FAM N/A	E06 Pos Ctrl		STI	6	36,84	N/A	0,00E+00	0,00E+00	36,84 0,000
FAM .00	F05 0,000 N/A	Unkn	6HT RI 2561 Lima	6	N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
FAM N/A	F06 Pos Ctrl		SGA	5	21,83	N/A	0,00E+00	0,00E+00	21,83 0,000
FAM .00	G05 0,000 N/A	Unkn	7HT RI 2561 Lima	7	N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
FAM .00	G06 0,000 N/A	NTC	H2O PCR Gibco	3	N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
FAM .00	H05 0,000 N/A	Unkn	1HC RI 2561 Lima	8	N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

### Run Parameters

Hot Start? **No**  
 Temperature Control Mode: **Algorithmic**  
 Volume: **20 ul**

### Data Analysis Parameters

#### **Display Controls**

Fluor **Display Mode**  
 FAM **SinglePoint**

#### **Data Selection**

Fluor **Data Window** **Center**  
**Size**  
 FAM **99%** **End**

#### **Digital Filtering**

Fluor **Global Filter** **PCR Digital** **Smoothing Filter**  
**Enabled?** **Filter Type** **Desired Width**  
 FAM **Off** **Weighted Mean** **5**

#### **PCR Data Analysis Method**

Fluor **Data Analysis Method**  
 FAM **PCR Base Line Subtracted Curve Fit**

### PCR Baseline Data Analysis Parameters

#### **Baseline Calculation**

Fluor	Baseline	Auto Baseline	Global Baseline	
Cycles			Start	End
FAM	Method Data Window	Cycle Calculation? Yes	N/A	N/A

**Overriden Baseline Cycles** **None**

**Threshold Calculation**

Floor	Use Auto Threshold?	Auto Calculated Threshold Value	User Defined Threshold Value
FAM	Yes	89,26	89,26

**Excluded Wells**

Excluded Well Count: 0

**Modified Wells**

Modified Well Count: 0

End