



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Detección y caracterización genética y patogénica de
Paramixovirus aviar en poblaciones de aves silvestres y
domésticas de crianza tecnificada y traspatio de Perú**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Medicina
Veterinaria

AUTOR

Maria Eliana ICOCHEA D'ARRIGO

ASESOR

Ph.D. Juan Anderson MORE BAYONA

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Icochea M. Detección y caracterización genética y patogénica de Paramixovirus aviar en poblaciones de aves silvestres y domésticas de crianza tecnificada y traspasio de Perú [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Maria Eliana Icochea D' Arrigo
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	09161133
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-7102-0584
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Juan Anderson More Bayona
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	43316819
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-6089-2886
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Fidel Francisco Suárez Aranda
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10833645
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Claudio L. Afonso
Tipo de documento	Cédula de identidad
Número de documento de identidad	032 ARG/11.610.491

Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Abelardo Lenin Maturrano Hernández
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	15725076
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Juan Anderson More Bayona
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43316819
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.4.1.6 Patología Aviar
Grupo de investigación	GINAVES
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC). Contrato 358-2019, FONDECYT
Ubicación geográfica de la investigación	Universidad Nacional Mayor de San Marcos y sus coordenadas geográficas. Edificio: Facultad de Medicina Veterinaria, Laboratorio de Patología Aviar País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Obligatorio. Ejemplo: Marzo 2004 - octubre 2022
URL de disciplinas OCDE	http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN MEDICINA VETERINARIA**

En la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 10:00 horas del día miércoles 20 de diciembre del 2023, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Doctor, presidido por el Dr. Fidel Francisco Suárez Aranda y conformado por los siguientes miembros docentes: Ph.D. Claudio L. Afonso, Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández y Dr. Ph.D. Juan Anderson More Bayona (**Asesor**), se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

“Detección y caracterización genética y patogénica de Paramixovirus aviar en poblaciones de aves silvestres y domésticas de crianza tecnificada y traspasío de Perú”, presentado por:

MARIA ELIANA ICOCHEA D'ARRIGO

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Doctor en Medicina Veterinaria y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **MUY BUENO, (18) DIECIOCHO**

A continuación, el Jurado por intermedio de su Presidente recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del Grado Académico de Doctor en Medicina Veterinaria, a la Magister Maria Eliana Icochea D'Arrigo.

Siendo las 12:25 horas del día miércoles 20 de diciembre de 2023, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.


.....
Dr. Fidel Francisco Suárez Aranda (P.P.D.E.)
Presidente


.....
Ph.D. Claudio L. Afonso
Miembro


.....
Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández (P.P.T.C.)
Miembro


.....
Ph.D. Juan Anderson More Bayona (P.Au.D.E.)
Miembro (Asesor)


.....
Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado





Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado



CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, JUAN ANDERSON MORE BAYONA en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Directoral N° 117-UPG-FMV-2023 de la tesis, cuyo título es **Detección y caracterización genética y patogénica de Paramixovirus aviar en poblaciones de aves silvestres y domésticas de crianza tecnificada y traspatio de Perú**, presentado por la magister María Eliana Icochea D'Arrigo para optar el grado académico de Doctor en Medicina Veterinaria, CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 9% de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

Firma del Asesor

DNI: 43316819

Nombres y apellidos del asesor: JUAN ANDERSON MORE BAYONA



DEDICATORIA

A mis adorados hijos Jorge, Alvaro, Eliana Rocio, y a mis nietos, que son y serán siempre el principal motivo de mi vida,

A la memoria de mi padre Alfonso Icochea de Vivanco, mi adoración, ejemplo y modelo de vida en todos los sentidos.

A mi madre Olga D'Arrigo de Icochea, por tu inmenso amor y apoyo y por todos los sacrificios que tuviste para criar ocho hijos brillantes y adorar a mi padre como lo hiciste.

A mi esposo Jorge Arturo Vigil Quinteros, por el inmenso amor y comprensión que tuviste hacia mí y nuestros hijos.

A mis hermanos Lyda, Martha, Alfonso, Manuel, Rosario, Rosita y Patricia, por su inmenso cariño fraterno que nos tenemos y apoyo emocional.

Agradecimientos

A Dios por haberme dado unos padres, hermanos, esposo e hijos ejemplares, mi familia maravillosa y, por todas las oportunidades que puso para mí en la vida y que me han permitido llegar a lograr lo que tengo.

Al Dr Claudio Afonso por aceptar ser miembro asesor y jurado revisor, infinitamente agradecida por sus sabias y valiosas observaciones

A mi asesor de tesis Dr. Juan More, por su amistad, guía y apoyo incondicional en el desarrollo de mi tesis.

Al Dr Felipe San Martin Howard, por su amistad y apoyo en la realización de este trabajo.

A Rosita Gonzalez y Fernando Carcelen por alentarme y tratar todo el tiempo de facilitarme el tiempo para que termine la tesis.

A Gina Castro, Alonso Callupe, Ana Paola Apaza, Kathy Vargas y Yoselyn Vasquez, que me alentaron permanentemente a culminar mi tesis

A Luis Tataje, Manuel Ramirez y Jinmy Nuñez por su apoyo en la realización de este trabajo.

Muchas gracias a todos

ÍNDICE GENERAL

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	2
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	7
ABSTRACT	9
LISTA DE CUADROS	11
LISTA DE FIGURAS	13
INDICE DE ABREVIATURAS	15
ANEXOS	17
I. INTRODUCCIÓN	18
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 HISTORIA	21
2.1.1 Ocurrencia de la enfermedad de Newcastle en el mundo	21
2.1.2. La Enfermedad de Newcastle en el Perú	22
2.2 ETIOLOGÍA	24
2.2.1 Taxonomía viral	24
2.2.2. Estructura viral	25
2.2.3. Propiedades biológicas del virus	27
2.2.4 Replicación viral	33
2.2.5. Patotipos y genotipos virales	35
2.2 EPIDEMIOLOGÍA	43
2.2.1 Resistencia a los agentes físicos y químicos	43
2.2.2 Huéspedes y reservorios virales	45
2.2.3 Vías de transmisión	48
2.2 RESPUESTA INMUNE	50
2.2.1 Respuesta innata	51
2.2.2 Respuesta inmune humoral	52
2.2.3 Respuesta inmune celular	53
Signos clínicos	56
Lesiones macroscópicas	57
2.5.2 Lesiones histopatológicas	58
2.6. DIAGNÓSTICO	59
2.6.1 Aislamiento viral	59
2.6.2. Evaluación de la respuesta serológica	60
2.6.3. Detección e identificación molecular del virus	62
2.6.4. Pruebas para determinar la patogenicidad viral	65
2.7 PREVENCIÓN Y CONTROL	66
2.7.1. Vacunación	67
III. MATERIALES Y MÉTODOS	70
3.1 ENSAYO A: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE PARAMIXOVIRUS AVIAR EN AVES SILVESTRES DEL PERÚ	70
3.1.1 Lugar de ejecución	70
3.1.2 Animales	72
3.1.3. Colección de muestras	73
3.1.4. Determinación de patogenicidad y genotipo viral de aves silvestres	75
3.2 ENSAYO B: AISLAMIENTO VIRAL Y DETERMINACIÓN DE PATOGENICIDAD DE CEPAS DE PARAMIXOVIRUS AVIAR EN AVES DOMÉSTICAS DEL PERÚ	79
3.2.1 Lugar de ejecución:	80
3.2.2 Animales:	80
3.1.3 Detección, aislamiento e identificación viral:	83

3.1.4 Determinación de patogenicidad viral por la prueba de IPIC.....	87
3.1.5 Determinación del genotipo viral por secuenciamiento del gen F o por secuenciamiento de última generación.....	87
IV. RESULTADOS	90
 AISLAMIENTO VIRAL, DETERMINACIÓN DE PATOGENICIDAD Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CEPAS DE PARAMIXOVIRUS AVIAR	90
4.1 ENSAYO A: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE PARAMIXOVIRUS AVIAR EN AVES SILVESTRES DEL PERU.....	90
4.1.1 Aislamiento viral en aves silvestres.....	90
4.2 ENSAYO B: RESULTADOS DEL AISLAMIENTO VIRAL, DETERMINACIÓN DE PATOGENICIDAD Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CEPAS DE PARAMIXOVIRUS AVIAR EN AVES DOMÉSTICAS DEL PERÚ.....	94
ANÁLISIS GENÉTICO Y FILOGENÉTICO DE AISLADOS DEL VIRUS EN AVES DOMÉSTICAS DEL PERÚ.....	101
V. DISCUSIÓN.....	111
5.1 ENSAYO A: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE PARAMIXOVIRUS AVIAR EN AVES SILVESTRES DEL PERÚ.	111
5.2 ENSAYO B: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE PARAMIXOVIRUS AVIAR EN AVES DOMÉSTICAS DEL PERÚ.....	115
VI. DISCUSION GENERAL;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.	
VII. CONCLUSIONES.....	124
VIII. RECOMENDACIONES	125
IX. REFERENCIAS.....	126
X. ANEXOS	142
XI. LISTA DE PUBLICACIONES	152

RESUMEN

En el Perú, durante los últimos cuarenta años, los Paramixovirus aviar-1 de tipo patogénicos, han sido causantes de la enfermedad de Newcastle (ENC), ocasionado frecuentes brotes en aves domésticas, principalmente en aves de riña y en menor grado en plantales de ponedoras comerciales y pollos de engorde, por ello, se considera a la ENC como la principal enfermedad infecciosa de las aves, mostrando una presentación cíclica en el tiempo. Por tal motivo, se planteó este estudio con los objetivos generales de: 1) contribuir al conocimiento de la epidemiología de la ENC en el Perú, 2) determinar si las aves silvestres son portadoras de cepas patogénicas de Paramixovirus aviar y 3) estimar el riesgo que estas representan como fuente de contaminación para las aves domésticas y de traspatio. El estudio consistió en dos ensayos; el ensayo A que tuvo como objetivos específicos: aislar, detectar y caracterizar molecularmente a los paramixovirus aviares en 22 especies de aves silvestres, residentes y migratorias de seis humedales en la costa del Perú; a saber: Lagunas de Puerto Viejo, Pantanos de Villa, Laguna Paraíso, Albufera de Medio Mundo, Chancay, playa Mejía y Piura y; el ensayo B que tuvo como objetivos realizar el análisis clínico, genómico y patogénico de los aislados del virus obtenidos de casos clínicos remitidos al Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (LPA) con fines de diagnóstico. Durante los años 2007 al 2022 fueron colectadas 6,393 muestras de heces frescas de aves silvestres, obteniéndose resultados positivos a Paramixovirus aviar en 31/6393 muestras, la totalidad de aislados fueron identificadas como avirulentos, por el tiempo de muerte del embrión, por ser del genotipo I y por tener un Índice de Patogenicidad Intracraneana (IPIC) de 0. Uno de las 31 aislados fue negativo a Paramixovirus aviar-1 por la prueba de inhibición de la hemoaglutinación y RT-PCR; el secuenciamiento por NGS permitió identificarla como de la misma familia paramixoviridae, y sub subfamilia avulavirinae, pero del género metaavulavirus. En el ensayo B se analizaron 21 casos de aves domésticas sospechosas de ENC, recibidos en el LPA desde el año 2004 al 2022. Diez casos procedentes de aves de riña, seis de pollos de engorde, tres de aves de postura y dos de aves de traspatio. Contrariamente a lo encontrado en aves silvestres, el secuenciamiento del gen F determinó que los diez aislados de aves de riña fueron del tipo virulento, cinco del Genotipo XII, cuatro del

subgenotipo XII.1 y uno del subgenotipo VII.d; todas con IPIC de entre 1.75 a 1.85 que corresponde con los virus velogénicos viscerotrópicos. Por otro lado, se identificaron dos virus virulentos en aves de postura con genotipos XII y XII.1 e IPIC de 1.78 y 1.83 y, uno no virulenta del genotipo II, IPIC 0. En pollos de engorde, cinco aislados fueron de genotipo virulento: cuatro XII y uno XII.1; los dos aislados restantes fueron no virulentas del II. Asimismo, los dos aislados obtenidos de aves de traspatio fueron virulentos del genotipo XII y subgenotipo XII.1 con un IPIC de 1.8 y 1.85. Las secuencias de nucleótidos de la proteína HN de los aislados peruanos fueron comparadas con uno de referencia de su mismo genotipo encontrándose porcentajes de identidad de aminoácidos de entre 95.00 y 99.98%; únicamente el aislado del genotipo VII de aves de riña del 2022, mostró un porcentaje de identidad ligeramente más bajo (95.18) al compararlo con el aislado de Colombia del año 2010. Se concluye que: 1) En el Perú existe una diversidad genética de virus, siendo los genotipos virulentos, XII y VII, con un predominio del XII, los que circulan entre las aves domésticas; 2) Que ambos genotipos XII y VII, infectan principalmente a aves de riña; y 3) Que existe una baja presencia de infección en las aves silvestres de las especies con mayor número de muestras analizadas en el presente estudio como fueron: las gaviotas (1617), cormoranes (1278), patos silvestres (946) y pelicanos (677), en las cuales se detectaron solo virus no patogénicos del genotipo I, demostrando que en el país las aves silvestres representan un riesgo menor para la industria avícola; 4) Que existe un alto grado de conservación genética entre el genotipo de los aislados peruanos y su correspondiente aislado de referencia; 5) Por último se concluye que la presentación de brotes en aves comerciales en nuestro país es consecuencia de una baja cobertura de vacunación en aves de riña y factores culturales que atentan contra la bioseguridad, habiéndose reconocido los importantes reservorios virales y tipos de virus circulantes. Los resultados obtenidos han permitido contar con un mayor conocimiento de la epidemiología de la ENC en el Perú.

Palabras claves: Aves silvestres, domésticas, enfermedad de Newcastle, patotipo, genotipo.

ABSTRACT

In Peru, during the last forty years, the pathogenic viruses of Newcastle disease (NDV) have caused frequent outbreaks in domestic birds, mainly in fighting birds and less in commercial layers and broiler chickens, therefore, ND is considered one of the diseases with the greatest health and economic impact on the poultry industry., showing a cyclical presentation over time. For this reason, this study was proposed with the general objectives of contributing to the knowledge of the epidemiology of ND in Peru, determining whether certain species of wild birds are carriers of pathogenic strains of avian Paramyxovirus and assessing virus presence and if they represent a source of contamination for domestic and backyard birds. The study consisted of two trials; Trial A had the specific objectives: to isolate, detect and molecularly characterize avian paramyxoviruses in 22 species of wild, resident and migratory birds from six wetlands on the coast of Peru; namely: Lagunas de Puerto Viejo, Pantanos de Villa, Laguna Paraíso, Albufera de Medio Mundo, Chancay, Mejía beach and Piura and; Trial B, whose objectives were to carry out the clinical, genomic and pathogenic analysis of the virus isolates obtained from clinical cases referred to the Avian Pathology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos (LPA) for the purposes of diagnosis.. During the years 2007 to 2022, 6,393 samples of fresh feces from wild birds were collected, obtaining positive results for avian Paramyxovirus in 31/6393 samples. All isolated strains were identified as avirulent, due to the time of death of the embryo, because they were of the genotype I and for having an Intracranial Pathogenicity Index (ICPI) of 0. One of the 31 strains was negative for avian Paramyxovirus-1 by the hemagglutination inhibition test and RT-PCR; NGS sequencing allowed it to be identified as being from the same family paramyxoviridae, and subfamily avulavirinae, but from the genus metaavulavirus. In trial B, 21 cases of domestic birds suspected of ND were analyzed, received at the LPA from 2004 to 2022. Ten cases in fighting birds, six in broiler chickens, three in laying birds and two in

backyard birds. Contrary to what was found in wild birds, the sequencing of the F gene determined that the ten strains of fighting birds were of the virulent type, five of the XII, four of the subgenotype XII.1 and one of the subgenotype VII.d; all with ICPI between 1.75 to 1.85, which corresponds to viscerotropic velogenic viruses. On the other hand, two virulent strains were identified in laying hens with genotypes XII and XII.1 and ICPI of 1.78 and 1.83, and one non-virulent strain of genotype II, ICPI 0. In broiler chickens, five strains were of virulent genotype: four GXII and one XII.1; the remaining two strains were non-virulent of the GII. Likewise, the two strains in backyard birds were identified as virulent of genotype XII and subgenotype XII.1 with ICPI of 1.8 and 1.85. The nucleotide sequences of the HN protein of the Peruvian isolates were compared with a reference of the same genotype, finding percentages of amino acid identity between 95.00 and 99.98%; Only the isolate of genotype VII of fighting birds from 2022 showed a slightly lower percentage of identity (95.18) when compared to the isolate from Colombia from 2010. It is concluded that: 1) In Peru there is a genetic diversity of viruses, being the virulent genotypes, XII and VII, with a predominance of XII, those that circulate among domestic birds; 2) Both genotypes XII and VII mainly infect fighting birds; and 3) There is a low presence of infection in wild birds of the species with the greatest number of samples analyzed in the present study, such as: seagulls (1617), cormorants (1278), wild ducks (946) and pelicans (677), in which only non-pathogenic viruses of genotype I were detected, demonstrating that in the country wild birds represent a lower risk for the poultry industry; 4) There is a high degree of genetic conservation between the genotype of the Peruvian isolates and their corresponding reference isolate; 5) Finally, it is concluded that the occurrence of outbreaks in commercial birds in our country is a consequence of low vaccination coverage in fighting birds and cultural factors that threaten biosecurity, having recognized the important viral reservoirs and types of circulating viruses. The results obtained have allowed us to have greater knowledge of the epidemiology of ND in Peru.

Keywords: Wild and domestic birds, Newcastle disease, virulent strains, genotype.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Casos de la enfermedad de Newcastle (%) sobre los diagnosticados en el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos entre 2002 -2006.....	23
Cuadro 2. Componentes virales involucrados en la respuesta de muerte celular (Cuadrado et al., 2015).	32
Cuadro 3. Agrupación y características de cepas del virus de la ENC, usando anticuerpos monoclonales de ratones.	36
Cuadro 4. Patotipos e índice de patogenicidad de virus de la ENC.....	37
Cuadro 5. Clasificación actual de genotipos del virus de ENC y virulencia	43
Cuadro 6. Exposición de pollos susceptibles a la cama en donde hubo brotes de pollos con ENC velogénico.	44
Cuadro 7. Detección de virus de la ENC, usando hisopados de arrastre, después de despoblar lotes de aves afectadas por un brote de virus exótico.	45
Cuadro 8. Distribución del antígeno de la nucleoproteína del virus de la ENC por IHC, en el tracto reproductivo de gallinas infectadas con 105.9 DIE50 de un vvENC (aves del 1 al 12) y controles (13 y 14).	50
Cuadro 9. Ensayos disponibles para el diagnóstico de ENC y propósito de uso ¹ solo con métodos adecuados para ese fin. Fuente: WOA 2021	59
Cuadro 10. Índice de patogenicidad de vacunas comerciales contra la Enfermedad de Newcastle de diferentes laboratorios, con cepa La sota, B1, Ulster, VG-GA, Clone 30 y C2.....	67
Cuadro 11. Humedales de la costa peruana incluidas en el monitoreo.....	72
Cuadro 12. Especies de aves silvestres comprendidas en el estudio	72
Cuadro 13: Primers específicos para virus de la Enfermedad de Newcastle	77
Cuadro 14. Mezcla de reacción de PCR por tubo de reacción	86
Cuadro 15. Programa de PCR.....	86
Cuadro 16. Listado de casos sospechoso de ENC, seleccionados de los recibidos entre 2004 al 2022, según tipo de ave, lugar de procedencia y método de análisis.....	89
Cuadro 17. IPIC O, Orthoavulavirus 1 y Metavulavirus aviar de aves silvestres.	92
Cuadro 18. Tiempo de muerte del embrión (TME), Índice de Patogenicidad Intracraneana (IPIC) y genotipo de de ocho muestras positivas a Paramixovirus aviar seleccionadas a partir de los 31 aislados de aves silvestres.	93

Cuadro 19. Historia clínica, signos clínicos y lesiones macroscópicas de los casos seleccionados de los positivos a ENC en aves domésticas 2004-2022.....	95
Cuadro 20. Día 8: IPIC 0, caso postura Lurín 04796	99
Cuadro 21. Día 2: IPIC 1.85 caso ave de riña Barranco 040785	99
Cuadro 22. Resultados del secuenciamiento del genoma completo (NGS) de cepas aisladas en aves domésticas del Perú entre 2005 y 2022.....	100
Cuadro 23. Resultados de IPIC y secuenciamiento del Gen F de cepas aisladas de brotes en aves domésticas del Perú entre 2004 y 2015.....	100
Cuadro 24. Secuencia de aminoácidos en la región de clivaje de 17 aislados peruanos de Paramixovirus aviar-1 obtenidos de aves domésticas y 01 de aves silvestres.....	102
Cuadro 25. Comparación de residuos de aminoácidos en los sitios antigénicos de la proteína HN de los aislados peruanos del virus de la enfermedad de Newcastle con genotipos de referencia (adaptado de Ogali IN, et al., 2020).	103
Cuadro 26. Resultados del secuenciamiento NGS: longitud, identidad (%), cepa referencia y genotipo de las 09 cepas aisladas de aves domésticas del Perú entre 2005 y 2022.	106
Cuadro 27. Cambios aminoacídicos encontrados en los genes NP, P, M, F, HN y L de seis aislados de aves domésticas que tuvieron un porcentaje de identidad mayor a 98% con sus correspondientes cepas de referencia del mismo genotipo.	109
Cuadro 28. Resumen de genotipos virales identificados en la familia Paramixoviridae, subfamilia Avulavirinae, por tipo de ave y procedencia.	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales enfermedades diagnosticadas aves de riña en el LPA-FMV-UNMSM del 2002 – 2006. (Fuente; Guzman et al., 2009).	23
Figura 2. Casos de ENC diagnosticados en el Laboratorio de Patología Aviar – FMV-UNMSM de 1990 a 2005. (Fuente: Mora, 2005).	24
Figura 3. Representación esquemática del genoma del virus de la ENC y sus proteínas (Fuente propia).....	26
Figura 4. Función de las proteínas virales. (Fuente propia).....	26
Figura 5. A: Microfotografía electrónica del virión del APMV-1 teñido con phosphotungstate acid (PTA). 2B y 2C son secciones digitales de 44 nm de espesor, 2C de la parte central y 2B de la envoltura del virus. 2D y 2E: la parte central y la envoltura vistas a mayor aumento. 2F y 2G representan la vista lateral y la vista superior de la glicoproteína F del virus de la ENC. (Fuente: Mast y Demeestere, 2009).	27
Figura 6. Unión de la proteína HN. (Fuente: Meng et al., 2021).....	29
Figura 7. Infección selectiva del virus ENC en tejido de cáncer colorectal en humanos (Fuente: Tayeb et al., 2015).	30
Figura 8. Apoptosis inducida por el virus de la ENC: Descripción general de la respuesta muerte celular. (Fuente: Cuadrado et al., 2015).....	31
Figura 9. Actividad oncolítica del virus NDV-HUJ en melanoma. (Fuente: Tayeb et al., 2015).	33
Figura 10. Síntesis del ARNm viral de los Orthoavulavirus-1. El genoma de polaridad negativa sirve como molde para la generación de ARNm subgenómicos. La ARNm polimerasa (L/P) inician la síntesis del ARNm al comienzo del gen N, cerca del extremo 3' del genoma viral. Las pequeñas esferas representan la cap y las AAA la cola poli A. (Fuente: Vilela et al., 2022).	36
Figura 11. Árbol “piloto” de virus de enfermedad de Newcastle de clase II que incluye 21	41
Figura 12. Comparación entre los tres sistemas, linaje de Aldous et al. (2003), sistema genotipo desarrollado por Diel et al. (2012 ^a) y la clasificación actual. (Fuente: Dimitrov et al. 2019).	42
Figura 13. Aves silvestres relacionadas con brotes del virus de la Enfermedad de Newcastle. Fuente: elaboración propia.	46
Figura 14. Transmisión viral. Fuente: elaboración propia.	49

Figura 15. Transmisión de vENC entre pollos, patos y palomas, inoculados vía intraocular e intranasal con 106DIE50 de los virus de diferente origen, tres aves fueron colocadas en contacto en la misma jaula. (Fuente: Kang et al., 2016).	49
Figura 16. Efectos de respuesta innata, 48 h post infección con vvENC	52
Figura 17. Respuesta de anticuerpos IgG por ELISA en hisopados (A) o lavados (B) de tráquea y cloaca y, en sobrenadante de cultivos de tejidos con las mismas muestras (C), en pollos 21 d.p.v. con vacuna viva (rallas), inactivada (blanca) o no vacunado (gris). (Fuente: Chimeno et al., 2008).	55
Figura 18. Diarrea verde y edema facial en pollos de engorde a 5 días después del desafío	57
Figura 19. Lesiones macroscópicas de mucosas a nivel ocular, faringe, molleja, intestinos de pollos de engorde desafiados.	58
Figura 20. Lesiones macroscópicas de mucosas a nivel ocular, faringe, molleja, intestinos de pollos de engorde desafiados.	58
Figura 21. Hemaglutinación del fluido alantoideo de los embriones con aislamiento positivo al virus de la ENC.	61
Figura 22. A: los mecanismos de hemaglutinación (HA) y B: de inhibición de la hemaglutinación del virus de la ENC. (Fuente: Mao et al., 2022).	61
Figura 23. Representación esquemática de los tipos de ELISA, A: Directo B: Indirecto, C: Sandwich y D: Competitivo. (Fuente: Mao et al., 2022).	62
Figura 24. Representación esquemática de la prueba en tiempo real qRT PCR, A para ENC con SYBR Green y B: ENC con sondast TaqMan (Fuente: Creelan et al., 2002).	64
Figura 25. Ubicación de humedales de la costa peruana incluidos en el estudio	72
Figura 26. Procedimiento de colecta, aislamiento e identificación de paramixovirus en aves silvestres.	79
Figura 27. Casos ENC por tipo de explotación y departamento de procedencia.	81
Figura 28. Lugares de aislamiento viral (en rojo), en el departamento de Lima	82
Figura 29. Lugares de aislamiento viral (en rojo), por distritos de Lima Metropolitana	82
Figura 30. Evaluación de la viabilidad viral y título hemaglutinante de tres cepas aisladas de aves domésticas y 02 de aves silvestres.	85
Figura 31. Procedimiento de aislamiento e identificación de cepas en aves domésticas	85
Figura 32. PCR en tiempo real HRMC: caso 15009787 (A) y caso 22008463 (B).	86
Figura 33. Protocolo de determinación de patogenicidad por IPIC.	87
Figura 34. Aislamientos de Paramixovirus aviar en aves silvestres por especie de ave y lugar de detección.	90
Figura 35. Frecuencia de aislamientos de Paramixovirus aviar en huevos embrionados SPF obtenidos de heces frescas por especie de aves silvestres.	91
Figura 36. Genotipificación de la cepa de Metaavulavirus aviar.	91
Figura 37. Representación esquemática del genoma de la cepa peruana de Metaavulavirus aviar.	92
Figura 38. Índice de patogenicidad intracraneana de pollos de 1 día de edad.	92
Figura 39. Número de casos (azul) y porcentaje de positivos (naranja), a la detección de Paramixovirus aviar 1, por PCR en tiempo real en aves domésticas de casos clínicos durante los años 2015-2023.	98
Figura 40. Concatenación de SNPs del genoma completo de las 10 cepas peruanas aisladas de del estudio y las 14 referencias de los diferentes genotipos.	104
Figura 41. Árbol construido mediante la concatenación de SNPs se realizó con método de NJ con 500 de Bootstrap.	104

Figura 42. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región de clivaje del gen F de 10 cepas peruanas de Orthoavulavirus-1 aisladas de aves domésticas y silvestres.	105
Figura 43. Árbol filogenético del aislado del genotipo VIIId de Orthoavulavirus 1, aisladas de un ave de riña elaborado en base al análisis del gen F completo	107
Figura 44. Árbol filogenético de los virus de los Orthoavulavirus-1 aislados en el Perú en aves domésticas y silvestres.	108

INDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico
AOaV-1: Orthoavulavirus
APMV-1: Paramixovirus aviar-1
ARN: ácido ribonucleico
CEBA: Comité de Ética y Bienestar Animal
CEFs: Fibroblastos de embrión de pollo
CEFs: Fibroblastos de embriones de pollo
CEKs: Células de riñón de embrión de pollo
CMH: complejo mayor de histocompatibilidad
ECN: Enfermedad de Newcastle
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
F: proteína de fusión
GE: gen end
GS: gene start
HI: Inhibidores de la hemaglutinación
HN: hemaglutinina-neuraminidasa
Ig: Inmunoglobulina.
IGS: secuencias intergénicas
IL-6: Interleukina 6
IMC: inmunidad adaptativa específica o mediada por células
INF: Interferón

IPIC: Índice de Patogenicidad Intracraneana
ICPI: Intracranial Pathogenicity Index
IPIV: Índice de Patogenicidad Intravenosa
IRF: Factor regulatorio de interferon
L: polimerasa grande
LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle.
M: proteína de la matriz
mAb: anticuerpos monoclonales
MDT: Mean Death Time
NDV: virus de Newcastle
NF-Kb: factor nuclear Kappa B
NGS: Next-generation sequencing
NP: nucleoproteína
OIE: Organización Mundial de Salud Animal
ORF: Marco de lectura abierto
P: fosfoproteína
PAMPs: patrones moleculares asociados al patógeno
PBMCs: Celulas mononucleares de sangre periférica
RLRs: receptores RIG-I
RPN: complejo ribonucleoproteína
RTL: Receptores tipo Toll
RT-PCR: transcripción-reacción en cadena de la polimerasa
SENASA: Servicio Nacional de Sanidad Agraria
SPF: Specific Pathogens Free
Tarjetas FTA: tarjetas Flinders Technology Associates
TLRs: Los receptores Toll
TRAIL: Ligando inductor de apoptosis
VN: virus neutralización
VNDD: velogénicas neutrotrópicas NDV
VvENC: Enfermedad de Newcastle Velogénico Viscerotrópico
VVNDV: velogénicas viscerotrópicas NDV

ANEXOS

Anexo 1. Caso: 040369. Postura de 11 sem. 2004.	142
Anexo 2. Caso 40642: Aves criollas de 45 días. 2004.	142
Anexo 3. Caso 40785: Ave de riña 8 meses 2004.	143
Anexo 4. Caso 40871. 05 aves de riña de 2 y 3 sem. 2004.	143
Anexo 5. Caso 050566. Pollos de engorde de 29 días. 2005.....	143
Anexo 6. Caso 110181. Aves de riña, 3, 7 y 14 meses. 2011 (ENC y LTI)	144
Anexo 7. Caso 110277. 03 aves de riña de 02 meses. 2011	144
Anexo 8. Caso 110288. Ave de riña de 14 meses. 2011.....	145
Anexo 9. Caso 110319. Aves de riña de diferente edad. 2011.	145
Anexo 10. Caso 130432. Ave de riña de 11 meses. 2013.....	146
Anexo 11. Caso 15009506, engorde de 34 días. 2015.....	146
Anexo 12. Caso 15009787, engorde 33.....	147
Anexo 13. Caso 22001165: Engorde Rio Seco Huaral 30 días. 2022.....	147

I. INTRODUCCION

La enfermedad de Newcastle (ENC) es considerada una de las más importantes enfermedades infecciosas de las aves, porque las cepas velogénicas del virus pueden causar brotes con alta morbilidad y mortalidad y restricción del comercio internacional, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas a la industria avícola; la enfermedad forma parte de la lista de enfermedades notificables a la Organización Mundial de Salud Animal (OMSA) (Miller y Koch, 2020).

La enfermedad es causada por cepas virulentas de Paramixovirus aviar tipo 1 (APMV-1), del género Orthoavulavirus, que pertenece a la familia Avulavirinae de la familia Paramixoviridae; los paramixovirus aviares han sido aislados de diferentes especies de aves y están distribuidos en tres géneros: Orthoavulavirus, Metaavulavirus y paravulavirus, los mismos que son clasificados en 21 serotipos por pruebas serológicas y análisis filogenético (WOAH, 2021).

La transmisión del virus es horizontal y principalmente ocurre por aerosoles o por la vía oral, y pueden ser infectadas un amplio rango de huéspedes dentro de las especies aviares, siendo susceptibles de infectarse, al menos 250 especies en 27 de las 50 órdenes de aves, en donde la severidad de la enfermedad varía con el huésped y la virulencia del virus, sin embargo, la infección tiene un gran impacto sanitario y productivo en aves domésticas de la industria avícola, principalmente pollos y gallinas (Miller y Koch, 2020), aun cuando se ha señalado que las aves silvestres generalmente albergan cepas de tipo lentogénico, mientras que los brotes en aves domésticas son causados por cepas meso o velogénicas y, que las cepas altamente patógenas parecen emerger cuando el virus se replica en lotes de aves con alta densidad poblacional (Sahoo *et al.*, 2022). Sin embargo, los registros históricos y de análisis filogenéticos de secuencias disponibles en el banco de genes sugieren que los virus virulentos que actualmente circulan emergieron de virus de baja virulencia de los años 1920-1940, por cambios mutacionales en el sitio de clivaje de la proteína de fusión (Afonso CL, 2021).

La ENC se previene aplicando estrictas medidas de bioseguridad y por vacunación. En el Perú existe una ley que obliga a la vacunación con vacunas vivas y vacunas inactivadas a todos los pollos de engorde, ponedoras, reproductores, aves de pelea, crianza de traspatio y pavos, utilizando para ello vacunas debidamente registradas autorizadas (SENASA, 2003), sin embargo, aun cuando existen varios tipos de vacunas efectivas que son aplicadas, la ENC continúa siendo una de las principales enfermedades que afectan a la industria avícola nacional.

La amplia circulación de virus en poblaciones avícolas ha originado una diversidad genética y una constante emergencia de nuevas cepas, y dado la gran importancia de la ENC para la industria avícola y, el amplio uso de vacunas vivas en el mundo, el secuenciamiento y el análisis filogenético se han vuelto los métodos de elección para caracterizar las cepas circulantes en el campo (Dimitrov *et al.*, 2019).

El análisis de la casuística del Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (LPA), durante cerca de 20 años, ha mostrado que las aves de riña son las que largamente superan la presentación de brotes de la enfermedad, sin embargo, múltiples estudios han atribuido a las aves silvestres la responsabilidad de brotes, considerándolas reservorios naturales del virus. Estudios realizados en varios países sobre diversidad genética, encontraron que las cepas del virus de la ENC de aves silvestres estaban relacionadas con las recuperadas de brotes en aves domésticas (Jindal *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2009).

La avicultura peruana provee a la población de los principales requerimientos de alimentos de origen animal como son el pollo y los huevos, constituyendo la principal proteína de origen animal, con una importante participación de 26.9% (ave 22,6% y huevo 4,3%) dentro del valor bruto de la producción agropecuaria (MIDAGRI, 2022), por lo que los brotes de enfermedad por cepas velogénicas causan importantes consecuencias sanitarias y socioeconómicas con grandes pérdidas a los productores avícolas que se trasladan al consumidor de la población. Por otro lado, la avicultura peruana se concentra a lo largo de la costa del país, donde habitan numerosas especies de aves migratorias y residentes, por lo que es necesario el estudio de la presencia viral en las poblaciones de aves silvestres.

Por tal motivo, se planteó el presente estudio con los objetivos de: determinar si las aves silvestres migratorias y residentes de la costa peruana son portadoras de cepas patogénicas de Paramixovirus aviar; caracterizar genéticamente y patogénicamente los aislados obtenidos de aves silvestres del 2007 al 2022 y; caracterizar genéticamente y patogénicamente los aislados de aves domésticas con diagnóstico de ENC recibidas en el LPA desde el 2004 al 2022. De esta manera se espera identificar los virus que circulan en poblaciones de aves silvestres y domésticas en el país y contribuir a un mejor entendimiento de la epidemiología de la enfermedad en el país.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTORIA

Los primeros brotes de la enfermedad de Newcastle fueron observados en el año 1926, en la isla de Java, Indonesia y, casi al mismo tiempo en una granja cercana a la ciudad de Newcastle on Tyne, en Inglaterra (Miller y Koch, 2020), en donde la enfermedad fue diagnosticada por primera vez en el Laboratorio Veterinario del Ministerio de Agricultura en Weybridge. La enfermedad había sido identificada antes en las Indias orientales, Islas Filipinas, India, Ceilan Corea, Japón y Australia, y se suponía que hubo muchos otros brotes que no fueron reportados (Doyle, 1935).

2.1.1 Ocurrencia de la enfermedad de Newcastle en el mundo

La diseminación del virus de la ENC al mundo ocurrió a través de panzootias, fueron identificadas cuatro panzootias entre 1926 y 1981 (Koffi FX *et al.*, 2021). Para el Dr Alexander la primera panzootia ocurrió veinte años después del primer brote en 1926, los genotipos asociados con esta panzootia fueron I, III y IV (Suarez, 2013); la segunda panzootia se inició en el oriente medio a finales de los 60s del siglo pasado, esta se diseminó rápidamente en 1973, en una etapa que coincidió con el desarrollo de la avicultura. Se señala que el impacto que tuvo la enfermedad motivó el desarrollo de vacunas para su control (Koffi FX *et al.*, 2021). La diseminación de la segunda panzootia fue atribuida a virus del genotipo V detectados en psitácidas de importación que dieron lugar a la implementación de medidas de cuarentena y programas de vacunación para

controlar la enfermedad (Suarez, 2013). La tercera panzootia ocurrió a finales de los 70s del siglo pasado, detectándose cepas variantes aisladas en palomas (posiblemente procedentes de África y Oriente medio), las cepas fueron designadas como Pigeon Paramixovirus-1 (PPMV-1), y se determinó que, aunque estas cepas eran del mismo serotipo que las cepas APVM-1, tenían epítopes únicos que podían ser diferenciados con anticuerpos monoclonales (Miller P and G Koch, 2020), desde inicios de los 80s del siglo pasado, estas cepas se hicieron más prevalentes (Suarez, 2013). La cuarta panzootia ocurrió desde 1980 en adelante y se inició en el oriente medio, siendo ocasionada por cepas velogénicas viserotrópicas del genotipo VII que rápidamente se diseminaron a África, Europa occidental y Sudamérica en 2008 (Suarez, 2013). Actualmente la enfermedad es prevalente en países de Asia, África, América central y zonas de América del sur (WOAH 2021). Países de Asia y África como China, Indonesia, India y Egipto han sufrido a través del tiempo numerosos brotes con genotipos diversos. En China la enfermedad fue considerada enzoótica, la vacunación masiva logró disminuir considerablemente los brotes, la vigilancia continua mostró que los virus de clase II, genotipo VII han sido los causantes de la mayoría de los brotes, sin embargo, en el 2010 un virus del genotipo XII relacionado a la cepa aislada en Perú en el 2008, fue aislado por primera vez en gansos (Liu H. *et al*, 2009). En otro estudio se determinó que la mayoría de los aislamientos de virus recientes en Egipto fueron de virus de clase II, genotipo VII, subgenotipo d (Ellakany H F *et al*, 2019).

Durante los dos últimos años, se encuentran reportes de la enfermedad en WAHIS, 2023, solo en algunos países: en América en Belize (2021 y 2022) y Bolivia (2021); en Asia específicamente Pakistán (2021) y en Israel (2021 y 2022); en Europa específicamente Suecia (2021), en Rusia (2021 y 2022) y en Suiza (2022) (**WOAH, 2021**).

2.1.2. La Enfermedad de Newcastle en el Perú

En el Perú, la avicultura industrial está ubicada a lo largo de la costa y en menor proporción en la selva. En la sierra y selva predomina la crianza familiar de aves no tecnificadas, pollos, gallinas, pavos y patos. De otro lado, la crianza de aves de riña es común en todo el país, siendo legal la pelea de gallos.

La ENC fue reportada por primera vez en el Perú en el año 1951 (Phillips *et al.*, 1961). La gran afluencia de casos de aves de crianza industrial, de traspasío y de riña al LPA ha permitido durante todo el tiempo conocer la incidencia de la enfermedad en nuestro país. Cortez (1970), analizando la casuística de los años 1956 y 1969, reportó que la Enfermedad de Newcastle ocupaba el tercer lugar de importancia entre los diagnósticos de casos recibidos en el LPA, habiéndose diagnosticado durante ese periodo 82 casos que representaron el 8.79% de la

casuística. Posteriormente Inga 1991), en un nuevo estudio, analizando los casos del mismo laboratorio durante los años 1978 a 1987, refiere que la ENC ocupa el décimo lugar en importancia en los diagnósticos de aves de crianza tecnificada (2.2%) y el cuarto lugar en aves de traspatio y riña (26.5%).

Las estadísticas del LPD han demostrado que la ENC en el Perú es prevalente en aves de riña, es así como un nuevo análisis de la casuística durante los años 2002 al 2006, mostró un elevado porcentaje de casos diagnosticados en los años 2003 (24%) y 2004 (46.5%) en aves de riña y criollas (Cuadro 1 y Figura 1).

Cuadro 1. Casos de la enfermedad de Newcastle (%) sobre los diagnosticados en el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos entre 2002 -2006.

Tipo de ave	Año				
	2002	2003	2004	2005	2006
Aves riña y criollas	15.1 ± 3.5	24.7 ± 6.2	46.5 ± 9.8	8.26 ± 1.3	0.52 ± 0.2
Pollos de engorde	0.74 ± 0.3	6.12 ± 2.4	7.84 ± 3.5	1.16 ± 0.6	0.74 ± 0.1
Gallinas de Postura	0.00 ± 0.4	0.71 ± 0.2	1.69 ± 0.8	0.68 ± 0.1	0.00 ± 0.1

Fuente: (Guzmán *et al.*, 2009).

Yanayaco (1995), analizó 15 cepas de virus de la Enfermedad de Newcastle aisladas entre 1989 y 1990 en el LPA; usando el Índice de Patogenicidad Intracraneana (IPIC) e IVPI determinó que 14 eran patógenas y una no lo era; usando anticuerpos monoclonales se determinó que cuatro pertenecían al subtipo A, nueve al subtipo B y dos al subtipo E. Posteriormente se enviaron al Laboratorio de Weybridge en Inglaterra, dos cepas aisladas en el año 2004, una de casos de Arequipa fue identificada como subtipo A y la de casos de Lima, como subtipo B.

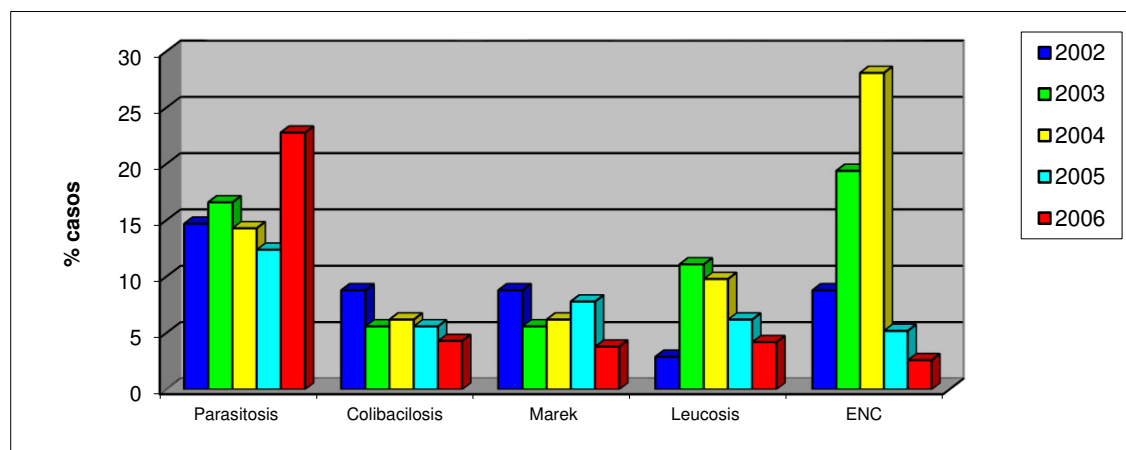


Figura 1. Principales enfermedades diagnosticadas aves de riña en el LPA-FMV-UNMSM del 2002 – 2006. (Fuente; Guzman *et al.*, 2009).

La ENC ha mostrado una tendencia cíclica de presentación en el Perú, tal como se aprecia en la Figura 2 (Mora, 2005).

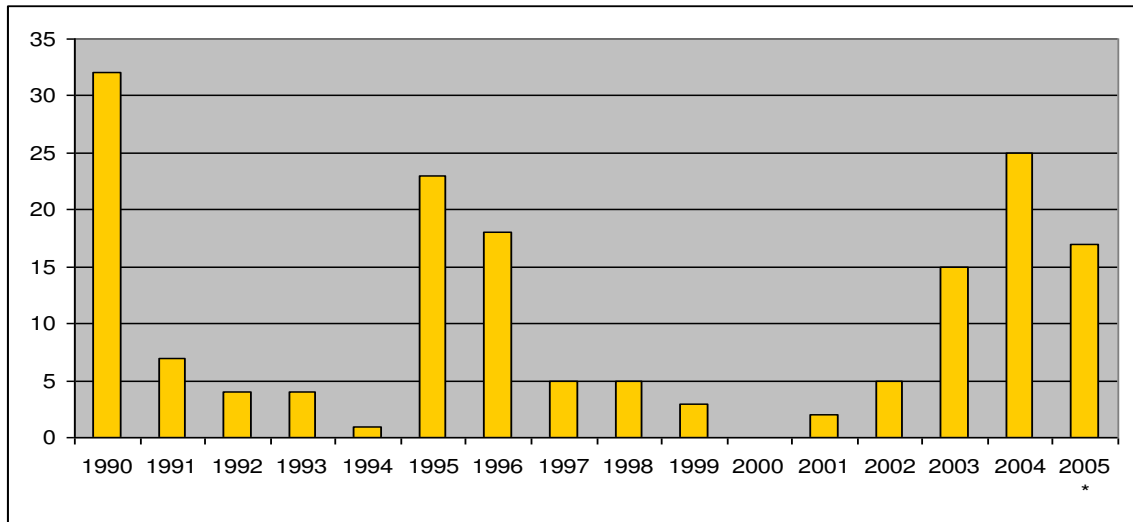


Figura 2. Casos de ENC diagnosticados en el Laboratorio de Patología Aviar – FMV-UNMSM de 1990 a 2005. (Fuente: Mora, 2005).

Durante los últimos años, debido a la inclusión casi generalizada de vacunas inactivadas en los programas de vacunación de pollos de engorde y pollitas durante los primeros días de vida, los brotes de la enfermedad han disminuido significativamente, no habiéndose detectado en el LAP, casos positivos a ENC, desde 2019; igualmente, tampoco existen reportes de brotes ante la OIE, desde ese mismo año y hasta la fecha.

2.2 ETIOLOGÍA

2.2.1 Taxonomía viral.

El virus de la ENC es un miembro de la familia Paramixoviridae, la que está dividida en cuatro subfamilias (ICTV, 2021):

- Subfamilia Avulavirinae
- Subfamilia Metaparamyxovirinae
- Subfamilia Orthoparamyxovirinae
- Subfamilia Rubulavirinae

La subfamilia Avulavirinae esta subdividida en tres géneros (ICTV, 2021):

- Metaavulavirus
- Orthoavulavirus
- Paraavulavirus

Los tres géneros de la subfamilia Avulavirinae pueden ser diferenciados en 22 serotipos de Paramixovirus, ya sea por serología o por comparación de la secuencia del genoma; estos infectan diferentes especies de aves domésticas y silvestres (Mundt, 2021).

El género Orthoavulavirus comprende nueve de las 22 especies o serotipos de la subfamilia Avulavirinae (ICTV, 2021):

- Paramixovirus aviar-1 (ENC),
- Paramixovirus aviar-9
- Paramixovirus aviar-12
- Paramixovirus aviar-13
- Paramixovirus aviar-16
- Paramixovirus aviar-17
- Paramixovirus aviar-18
- Paramixovirus aviar-19
- Paramixovirus aviar-21

La clasificación de especies de Paramixovirus es basada en la distancia en el árbol filogenético, comparando la secuencia de aminoácidos de la proteína L completa. El virus de la ENC pertenece a la familia Paramixoviridae, subfamilia Avulavirinae, género Orthoavulavirus (AOaV-1) (ICTV, 2021). Es el virus más importante dentro de las especies del género Orthoavulavirus. Anteriormente fue clasificado como avulavirus aviar 1 (AAvV-1), sin embargo, continúa siendo conocido como Paramixovirus aviar-1 (APMV-1) (Miller y Koch, 2020). Todos los virus de la subfamilia Avulavirinae poseen actividad de hemaglutinina y neuraminidasa (ICTV, 2021).

2.2.2. Estructura viral

El genoma del virus es un virus con envoltura con un genoma de ARN de cadena simple, no segmentado, de polaridad negativa; está compuesto por seis genes en orden 3'-NP-P-M-F-HN-L-5', que codifican siete proteínas virales: la nucleoproteína (NP), la fosfoproteína (P), la proteína de la matriz (M), la proteína de fusión (F), la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la RNA polimerasa, llamada la polimerasa grande (L); la edición del ARN de la proteína P produce una proteína adicional, la proteína V, con actividad anti interferón, que permite al virus contrarrestar la respuesta innata de la célula huésped (Miller y Koch, 2020) (Figura 3).

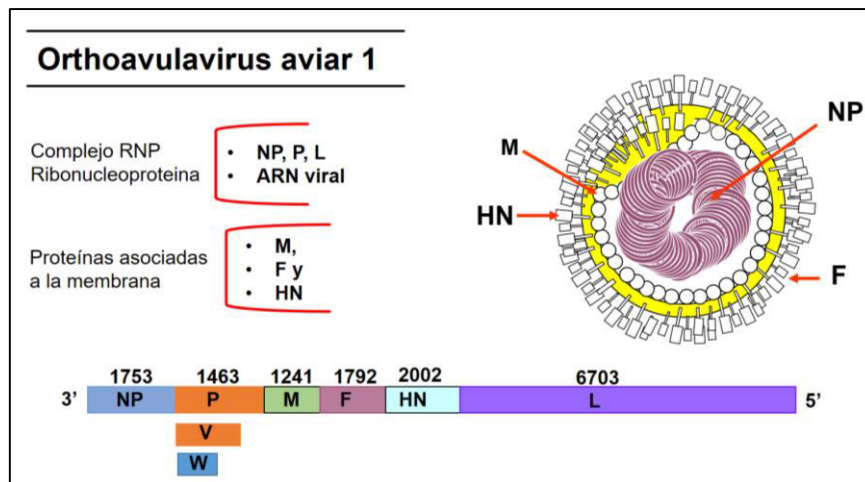


Figura 3. Representación esquemática del genoma del virus de la ENC y sus proteínas (Fuente propia).

El virus emerge por gemación de la membrana plasmática de la célula donde se replica. Los viriones son pleomórficos, pueden tener una apariencia redonda de 100 a 500 nm de diámetro o, filamentosa con un diámetro de 100 nm de longitud (Miller y Koch, 2020), descritos como de forma esférica a elongada elipsoidal, con rangos de tamaño de 100 a 250nm de diámetro ((*Cox RM and Plemper RK, 2017*).

Las glicoproteínas HN y F, se encuentran en superficie del virion y tienen 17 nm de longitud (Dortmans *et al.*, 2011; Miller y Koch , 2020). La proteína M es una proteína estructural que se encuentra en la superficie interna de la envoltura lipídica (Bergfeld, 2017). El genoma del virus está envuelto en la Nucleoproteína y conjuntamente con la proteína P y la proteína L, polimerasa larga, forman la ribonucleoproteína (RNP) que, al microscopio electrónico, muestran una conformación característica semejante a una espina de pescado (Miller y Koch, 2020) (Figura 2).

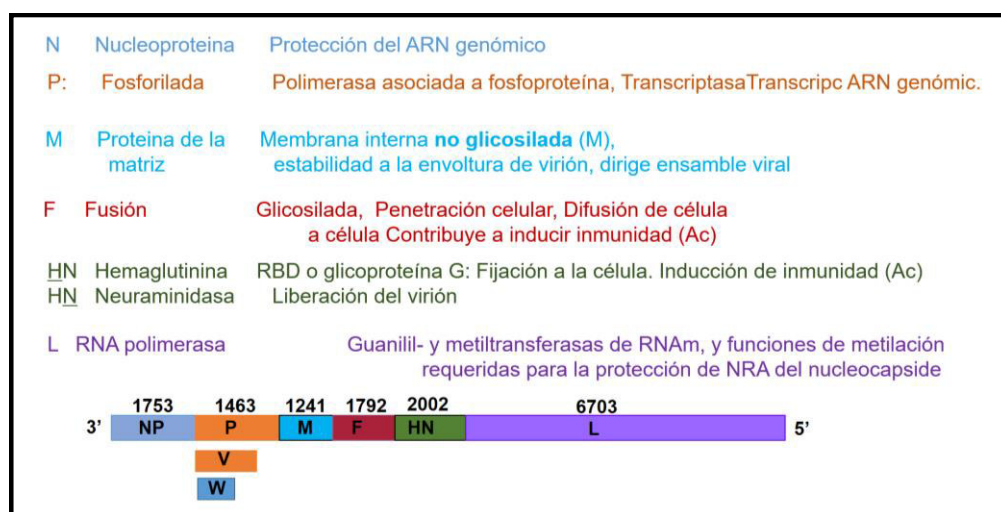


Figura 4. Función de las proteínas virales. (Fuente propia).

La caracterización de las cepas del virus de la ENC se realiza actualmente mediante el análisis filogenético de las secuencias del genoma, en base a este procedimiento, se ha determinado que el genoma del virus tiene aproximadamente 15kb de longitud, habiéndose determinado tres tamaños: 15185, 15192 y 15198 (Miller y Koch, 2020), se ha señalado que la mayoría de los aislamientos actuales tienen una longitud de 15192 nt o 15198 nt y que los virus aislados antes de 1960, tenían una longitud de 15185 n (Bergfeld, 2017; Czeglédi *et al.*, 2006). La variación en el tamaño del genoma es debido a la supresión/inserción de 6nt en las regiones intergénicas entre los genes N y P o, a supresión/inserción de 12nt en el gen P (Czeglédi *et al.*, 2006; Peeters y Koch, 2019).

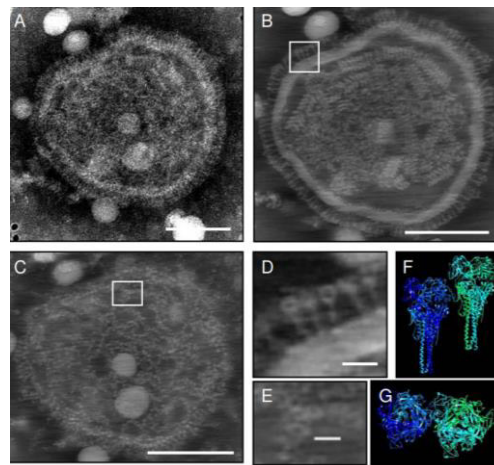


Figura 5. A: Microfotografía electrónica del virión del APMV-1 teñido con phosphotungstate acid (PTA). 2B y 2C son secciones digitales de 44 nm de espesor, 2C de la parte central y 2B de la envoltura del virus. 2D y 2E: la parte central y la envoltura vistas a mayor aumento. 2F y 2G representan la vista lateral y la vista superior de la glicoproteína F del virus de la ENC. (Fuente: Mast y Demeestere, 2009).

2.2.3. Propiedades biológicas del virus

Las cepas del virus de la ENC tienen cuatro propiedades biológicas de importancia:

- Actividad hemoaglutinante
- Actividad de neuraminidasa
- Fusión celular y hemólisis
- Efectos oncolíticos sobre células tumorales

Actividad hemoaglutinante: Con muy raras excepciones, ~~Todas~~ las cepas de virus de la ENC, al igual que otros paramixovirus, aglutinan los glóbulos rojos, y esto es debido a la acción de la proteína HN sobre los receptores de ácido siálico presentes en la superficie de los glóbulos rojos: hemoaglutinación (HA), esta actividad es la mejor herramienta de diagnóstico y determinación de presencia viral en cultivos virales y fluido alantoideo de embriones de pollo

(Miller y Koch, 2020) sin embargo la actividad hemaglutinante en fluidos libres de bacterias también puede ser debida a los virus de Influenza A (Brandon y Alexander, 2016), por lo tanto para confirmar la presencia del virus de ENC, la hemoaglutinación debe ser inhibida, y neutralizada por anticuerpos específicos, tal como ocurre en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) que permite además la cuantificación de anticuerpos del suero (Miller y Koch, 2020). El virus de ENC también causa la aglutinación de glóbulos rojos de anfibios y reptiles (Alexander, 2003). Se ha señalado que cuando se trata de virus ocasionales como los aislados de cormoranes, los glóbulos rojos de pavo producen mejor aglutinación (King, 2002).

Actividad de neuraminidasa: La proteína HN de los paramixovirus tiene también actividad de neuraminidasa cuya función es degradar los receptores del ácido siálico, evitando el reataque de partículas virales liberadas y la aglutinación. También es responsable de la elución viral de los glóbulos rojos aglutinados, o sea de la separación de los glóbulos rojos y el virus (Miller y Koch, 2020).

Fusión celular y hemolisis: La proteína de Fusión, induce hemolisis y fusión celular de otras células, la fusión depende del corte del precursor F0 en el heterodimero F1 y F2 por las proteasas del huésped, unidos por un enlace disulfuro; luego del ataque del virus al receptor se produce la fusión de las membranas viral y celular, lo que puede originar la fusión de las células vecinas formando sincitios. En el caso de los glóbulos rojos, cuando se fusionan las membranas se produce hemolisis debido a la rigidez que posee la membrana del glóbulo rojo (Miller y Koch, 2020).

El virus de la Enfermedad de Newcastle en la terapia antitumor en humanos: El virus de la enfermedad de Newcastle ha sido motivo de atracción a los virólogos no solo por su potencial patogenicidad para las aves, sino también por sus efectos oncolíticos sobre células tumorales y por su utilización cada vez más frecuente como vector en plataformas de vacunas vectorizadas para humanos y animales (Ganar *et al.*, 2014). Se considera que el virus de la ENC no es de riesgo para la salud pública por ser un virus de las aves, sin embargo, el virus ha logrado infectar y ocasionar conjuntivitis y resfriado leve en humanos, por otro lado, el efecto oncolítico sobre algunos tumores de humanos evidencia que este es capaz de replicarse en células humanas y por lo tanto no se podría descartar totalmente la posibilidad que los humanos u otros mamíferos puedan tener un rol limitado en algunos eventos de transmisión.

Desde principios del siglo XIX se descubrió que diversos tipos de virus podían causar remisión de los tumores en humanos, se realizaron numerosos estudios buscando virus con patogenicidad limitada que pudieran causar lisis de células tumorales humanas; en 1964 fue publicado el primer

reporte de leucemia tratada con virus de la enfermedad de Newcastle, a partir de allí, numerosos artículos han sido publicados demostrando la aplicación clínica en la terapia del cáncer (Meng *et al.*, 2021). El virus es usado como tratamiento contra el cáncer en humanos, gracias a las propiedades anticancerígenas e inmunomoduladoras que tiene y que están asociadas a la fuerte respuesta de interferón tipo I inducida en el hombre; la selectiva replicación que tiene el virus en células tumorales y, sus propiedades oncolíticas en huéspedes no aviares, se deben a defectos en la activación de las vías de señalización del IFN tipo I y en las vías apoptóticas entre otras (Schirrmacher, 2017). Las ventajas de su uso en la terapia antitumor son las siguientes:

- ✓ Replicación en el citoplasma, de ARN a ARN, no habiendo posibilidad de integración al genoma celular como podría ocurrir con virus ADN, por ello, los pacientes pueden tolerar incluso altas dosis de virus. Tres rutas de aplicación han sido ensayadas: Inyección intratumor, intravenosa e inhalación nasal. Ocurren pocos efectos colaterales, usualmente, fatiga, dolor de cabeza y fiebre. En el sitio de inoculación: eritema, hinchazón y prurito, ocasionalmente trombocitopenia o neutropenia, los efectos son temporales y desaparecen uno o dos días post vacunación (Meng *et al.*, 2021).
- ✓ Replicación eficiente y selectiva en células tumorales, los pasos de infección se observan en la Figura 6.

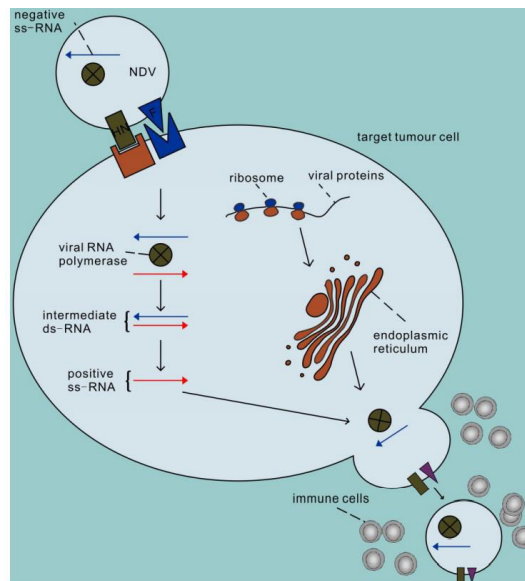


Figura 6. Unión de la proteína HN. (Fuente: Meng *et al.*, 2021).

La proteína HN se une al receptor celular, ácido siálico, activando a la proteína F a fusionar membrana celular y viral, el genoma entra al citoplasma de la célula por endocitosis para la transcripción viral, se desintegra el esqueleto incrementando el pH ácido. Se transcribe el ARNm de sentido positivo, se sintetizan las proteínas y la molécula de ARN completa de sentido negativo. Los virus producidos son liberados al espacio extracelular por gemación, para iniciar una nueva ronda de infección (Meng *et al.*, 2021) (Figura 6).

La infección por virus de la ENC induce una fuerte respuesta antiviral, que comienza por un reconocimiento de los patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs) por los dos tipos de receptores de reconocimiento de patógenos: Los receptores Toll (TLRs) como los receptores RIG-I (RLRs). Estos receptores reconocen dsRNA activando el factor regulatorio de interferon (IRF) 3, IRF 9 y el factor nuclear Kappa B (NF-kB) y subsiguientemente la producción y liberación de interferon tipo I/III (IFN). El IFN activa a la célula huésped de forma autocrina y, a las células que la rodean de una manera paracrina, a sintetizar proteínas antivirales, terminando la síntesis de proteínas celulares, promoviendo la rápida muerte celular y la eliminación del virus (Meng *et al.*, 2021).

A diferencia de las células no oncogénicas, las células tumorales muestran una señalización de interferón alterada, especialmente las del interferón tipo I. Este defecto permite al virus infectar selectivamente células tumorales, lo que puede deberse a la desregulación de la expresión del receptor interferón, originando daño a la señalización STATA1 y una respuesta a las enzimas antivirales, además el tratamiento con el virus no se opone a la quimioterapia o radioterapia.

Se ha demostrado que la proteína V, puede reducir la fosforilación de STAT1 para antagonizar el efecto de interferón (Meng *et al.*, 2021). Se ha demostrado el potencial oncológico de las cepas del virus de la ENC, tanto de las cepas patogénicas como no patogénicas (Tayeb *et al.*, 2015).

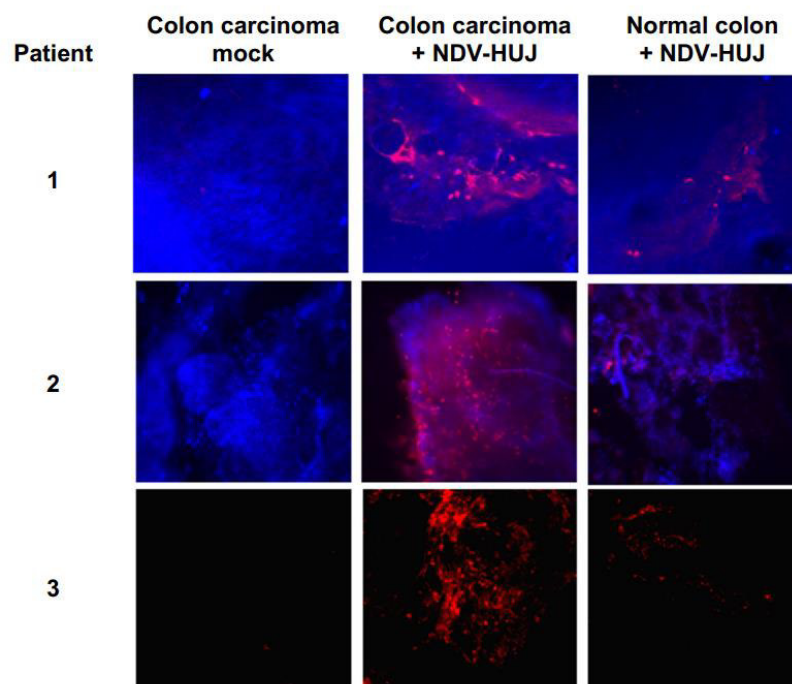


Figura 7. Infección selectiva del virus ENC en tejido de cáncer colorectal en humanos (Fuente: Tayeb *et al.*, 2015).

El virus de la ENC selectivamente infecta el tejido de cáncer colorectal de humanos. Cultivos de órganos y tejidos que fueron infectados con virus de la ENC (NDV-HUJ), usando anticuerpos policlonales contra el virus, infección viral en rojo, coloración celular en azul (Tayeb *et al.*, 2015) (Figura 7).

Otro mecanismo de acción oncolítica por parte del virus de la ENC es asociado a la cascada de apoptosis celular inducida por el virus (Tayeb *et al.*, 2015). La apoptosis o muerte celular programada es esencial para la sobrevivencia de los microorganismos multicelulares, actualmente el concepto se extiende a otros mecanismos como necrosis, necroptosis, pirofagia, entre otros (Figura 7).

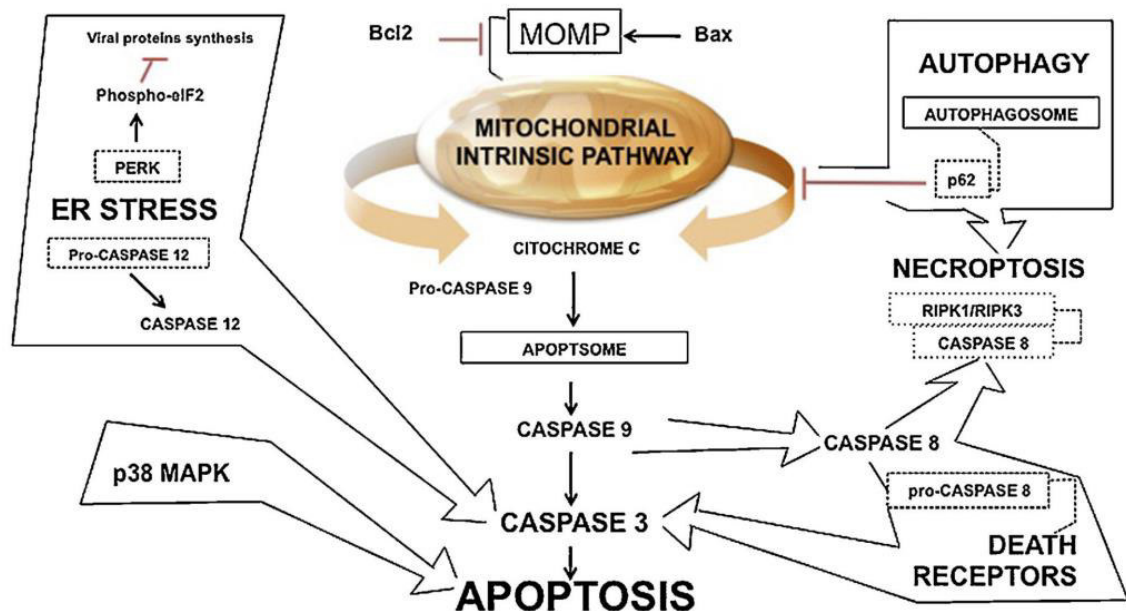


Figura 8. Apoptosis inducida por el virus de la ENC: Descripción general de la respuesta muerte celular. (Fuente: Cuadrado *et al.*, 2015).

El virus de la ENC es un virus actualmente considerado dentro de la terapia oncolítica, por su capacidad de causar la lisis de células tumorales, los componentes virales involucrados en la respuesta de muerte celular (Cuadro 2).

Cuadro 2. Componentes virales involucrados en la respuesta de muerte celular (Cuadrado et al., 2015).

Componente viral	Función biológica	Implicación/interacción en la muerte celular
HN	Hemaglutinina-neuraminidasa Hemaglutinación: ataque viral Receptor de reconocimiento en superficie de célula huésped Neuraminidasa: Remoción de ácido siálico Facilita la salida celular Previene agregación del virus después de salida	Sobre regulación de TRAIL (PBMCs) Sobrerregulación de caspasas 1, 9, 8, 3 (CEFs) Formación de sincitios, necrosis, incremento replicación Vacuolización: autofagia BH-1 like domain: potencial interacción con miembros de familia Bcl-2
F	Proteína de Fusión: Fusión de membrana del huésped y viral	Formación de sincitios: necrosis; incremento de replicación BH1 y BH3 like domain: potencial interacción con Bcl-XL Incremento de apoptosis en co-transfección con Bcl-xL
M	Morfogénesis viral; salida gemación, replicación	Apoptosis: activación vía intrínseca BH3-like domain: binding to Bax induce Bax translocation to the mitochondrial membrane
L	RNA-dependiente de RNA polimerasa Transcripción viral de mRNAs Replicación de RNA genómico	BH1 y BH3 like domains: potencial interacción con miembros de familia Bcl-2 (Bid, Bad, Bcl-2)
V	Proteína no estructural (P-ORF edition) Determinante viral del huésped (birds) No funcional en mamíferos	Incremento de la capacidad de replicación Bloqueo de la respuesta IFN: interacción con STAT-1 (birds)

TRAIL: Ligando inductor de apoptosis, relacionado al factor de necrosis tumoral. PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica. CEFs: Fibroblastos de embrión de pollo. ORF: Marco de lectura abierto. IFN: Interferón.

(Fuente: Cuadrado *et al.*, 2015).

Una explicación a los mecanismos de actividad oncolítica son lo que ocurre en células de melanoma, se ha visto una sobreexpresión de la proteína Livin, que pertenece a la familia de las proteínas inhibidoras de apoptosis. El corte de la proteína Livin en la posición 52 de su final terminal amino, por proteasas caspasa 3, convierte la actividad de la proteína de antiapoptótica en proapoptótica. Se comprobó que la infección por virus de la ENC en células de melanoma avanzado, cortaba Livin y estimulaba la cascada caspasa en eficiente apoptosis (Tayeb *et al.*, 2015) (Figura 9).

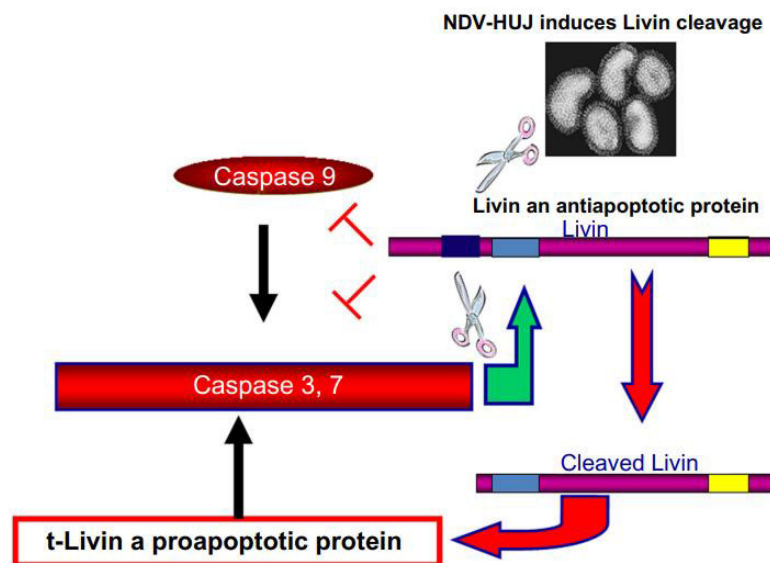


Figura 9. Actividad oncolítica del virus NDV-HUJ en melanoma. (Fuente: Tayeb *et al.*, 2015).

La actividad oncolítica del virus NDV-HUJ en melanoma, que depende de Livin. Las células de melanoma humano sobreexpresan la proteína Livin. Cuando Livin es escindido por el virus NDV-HUJ, su actividad antiapoptótica se vuelve proapoptótica (Figura 9).

Además de su efecto oncolítico directo, el virus de la ENC también promueve la activación del sistema inmune hacia una mayor actividad antitumoral, estimulando fuertemente las células inmunes asociadas al tumor, lo que conlleva a revertir el estado inmunosupresivo del microambiente del tumor a un entorno de activación inmunológica (Meng *et al.*, 2021). Fueron observadas en el entorno tumoral, un significativo incremento en la infiltración de células CD4+ y CD8+; fue observada una sobreexpresión de muchas moléculas de puntos de control inmune en las líneas celulares invadidas por el tumor. De otro lado, la infección de células tumorales por el virus induce a la producción de citocinas tales como IFN- α , IFN- β , TNF- α e IL-1; de tal forma que un gran número de células inmunes fuera del tumor, son inducidas a infiltrarse dentro del tumor, activando células inmunitarias inespecíficas que terminan matando a las células tumorales infectadas que aún no se han lisado o que son resistentes a la oncolisis viral (Meng *et al.*, 2021).

2.2.4 Replicación viral

La replicación de los Paramixovirus ocurre íntegramente en el citoplasma de la célula. Esta se inicia con el reconocimiento y unión de la hemaglutinina (HN) al receptor de ácido sálico de la célula blanco, lo que activa a la proteína F a fusionar las membranas viral y celular, para permitir la entrada del virus al citoplasma celular por endocitosis (Bergfeld, 2017; Miller y Koch, 2020). La proteína HN es una proteína oligomérica que consta de un dominio transmembrana N-

terminal, una región de tallo, que contiene determinantes de especificidad para las interacciones y la activación de F y, un dominio de neuraminidasa enzimáticamente activo, esta proteína realiza múltiples funciones en la entrada y salida del virus, incluyendo la unión a los receptores de ácido sálico de la membrana y activación de la proteína de fusión (Yuan *et al.*, 2011). La nucleocapside viral o complejo ribonucleoproteína (RPN) contiene el genoma de ARN envuelto con la nucleoproteína (NP) asociado al complejo polimerasa compuesto por la fosfoproteína (P) y la proteína grande (L); después de la entrada de la nucleocapside viral al citoplasma, esta se disocia de la proteína M y se libera para iniciar el proceso de síntesis del ARN genómico para producir un ARNm requerido para la traducción de las proteínas virales. La proteína P media la unión del complejo de polimerasa a la nucleocapside y la proteína L realiza las actividades catalíticas de la polimerasa (Dortmans *et al.*, 2011; Cox y Plemper, 2017).

Cada gen es identificado por la presencia de señales de inicio (GS: gene start) y al final del gen (GE: gen end). Además, la presencia de secuencias intergénicas (IGS) separan los genes unos de otros. Todos los genes codifican para una sola proteína principal, sin embargo, debido a la edición transcripcional o iniciación diferencial del gen P, el mRNA del gen P, puede resultar en la formación de dos proteínas no estructurales la proteína V y o la proteína W (Vilela *et al.*, 2022). La RNA polimerasa viral (Proteína L), inicia la transcripción del genoma viral en el nucleótido terminal 3', terminando y reiniciando secuencialmente en múltiples sitios de parada e inicio de genes. Al final de cada gen, una fracción de la ARN polimerasa se disocia del genoma, siendo incapaz de reiniciar la transcripción hacia abajo al siguiente gen, lo que da lugar a menores cantidades de ARNm para los genes ubicados más allá del fin 3' del genoma. Este mecanismo posibilita un equilibrio en la síntesis de proteínas que se necesitan en alta concentración (Vilela *et al.*, 2022).

Las proteínas virales son traducidas usando la maquinaria de la célula, después que el ARNm es traducido en proteínas virales, el genoma de polaridad negativa se replica, produciendo un ARN anti genómico que sirve como molde para la síntesis de un ARN genómico de longitud completa (Miller y Koch, 2020; Dortmans *et al.*, 2011). La proteína N se une a la cadena líder, en un proceso en donde la proteína P se comporta como un chaperon para entregar la proteína N al RNA generado recientemente (Cox y Plemper, 2017). Las proteína HN sintetizadas en la célula son transportadas a la membrana celular insertándose en ella, a ello sigue el alineamiento de la nucleocapside y el ARN viral a las regiones modificadas cercanas de la membrana celular, que contienen las glicoproteínas virales (Miller y Koch, 2020); la proteína M de la matriz, organiza el ensamblaje de las partículas virales a través de la interacción con las proteínas N del complejo RNP y los complejos glicoproteicos integrados a la membrana (Cox y Plemper, 2017). Las nuevas partículas virales salen por gemación brotando de la superficie celular, arrastrando la envoltura

lipoproteica de la célula (Miller y Koch, 2020; Cox y Plemper, 2017). La neuraminidasa de la proteína HN permite liberar al virus de la célula, removiendo el receptor celular (Bergfeld, 2017).

2.2.5. Patotipos y genotipos virales

Una de las características principales de las cepas del virus de la Enfermedad de Newcastle, son su gran variación en su patogenicidad. Las cepas de los APMV-1 han sido clasificadas en patotipos, y de acuerdo con los signos clínicos que se observan en las aves infectadas fueron clasificadas por la WOA (2021):

1. Cepas velogénicas viscerotrópicas: Que ocasionan una forma altamente patogénica en donde predominan las lesiones hemorrágicas intestinales.
2. Cepas velogénicas neurotrópicas: Que ocasiona alta mortalidad, después de una sintomatología respiratoria y nerviosa.
3. Cepas mesogénicas: Que ocasiona baja mortalidad después de signos respiratorios y nerviosos.
4. Cepas lentogénicas o respiratorias: Que ocasiona una leve infección respiratoria o subclínica.
5. Cepas subclínicas: Que ocasiona una infección entérica subclínica.

La Organización Mundial de Salud Animal (OIE), ha determinado que una cepa de APMV-1 es virulenta, cuando tienen un índice de patogenicidad intracraneana igual o mayor a 0.7 (teniendo en consideración los valores mínimos y máximos de 0 a 2) o, cuando el sitio de escisión de la proteína F es de múltiples aminoácidos básicos y tiene una fenilalanina en la posición 117 (WOAH, 2021).

La necesidad de clasificar los virus de la ENC ha dado lugar a una variedad de métodos para aislarlos, identificarlos y diferenciarlos. Las primeras técnicas de identificación viral se basaron principalmente en las propiedades biológicas del virus, como patogenicidad, formación de placa, termoestabilidad, análisis de péptidos estructurales y patrones de inhibición utilizando anticuerpos monoclonales (Dimitrov *et al.*, 2019).

La virulencia es asociada a la glicoproteína F, que es responsable de la fusión de la membrana celular con la viral, y es la clave de virulencia y patogénesis viral, debido a que la capacidad del virus de ingresar a la célula depende de la escisión de la proteína F0 en F1 y F2, por las proteasas del huésped. El tipo de proteasa capaz de escindir la proteína F0, depende de la secuencia de aminoácidos en el sitio de escisión de dicha proteína (Miller y Koch, 2020), los virus con una secuencia de aminoácidos monobásica en el sitio de escisión de F0 son a patógenos porque este

substrato es susceptible solo a enzimas proteolíticas extracelulares excretadas en la superficie de las mucosas, como la tripsina, por lo tanto ocasionan una infección localizada y asintomática, mientras que contrariamente los virus con una secuencia dibásica son patógenos porque son susceptibles a de enzimas proteolíticas intracelulares ubicuas, que permite al virus diseminarse y causar una infección sistémica y mortal (Czeplédi *et al.*, 2006; Miller y Koch, 2020). Las cepas de baja patogenicidad como la cepa La sota, tienen una secuencia de aminoácidos monobásica en el extremo C de la proteína F2 y una leucina en el N-terminal de la proteína F1 (112G-R/K-Q-G-R-L117), mientras que las cepas virulentas tienen una secuencia de aminoácidos multibásica en el extremo C-terminal de la proteína F2 y una fenilalanina en el extremo N-terminal de la proteína F1 (112R/G/K-R-Q/K-K/R-R-F117) (Miller y Koch, 2020; Wakamatsu *et al.*, 2006).

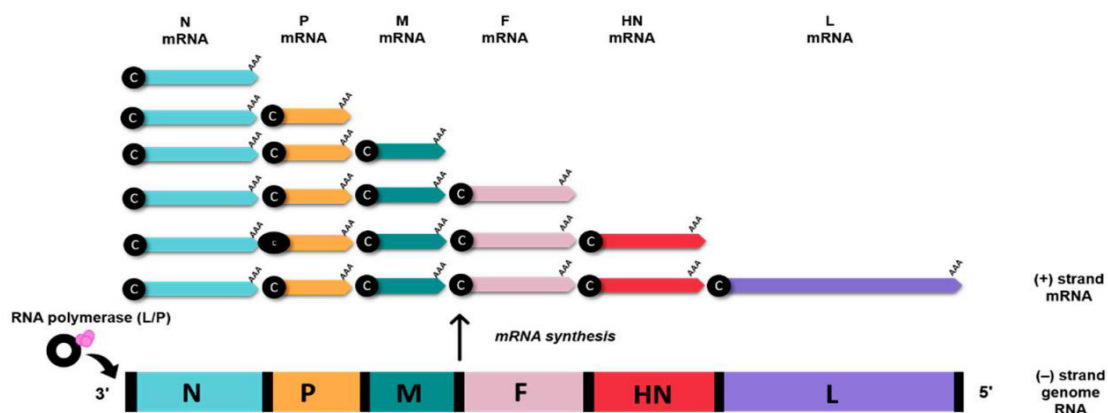


Figura 10. Síntesis del ARNm viral de los Orthoavulavirus-1. El genoma de polaridad negativa sirve como molde para la generación de ARNm subgenómicos. La ARNm polimerasa (L/P) inician la síntesis del ARNm al comienzo del gen N, cerca del extremo 3' del genoma viral. Las pequeñas esferas representan la cap y las AAA la cola poli A. (Fuente: Vilela *et al.*, 2022).

Diferenciación de cepas usando anticuerpos monoclonales: Antes que se conocieran las técnicas moleculares y de secuenciación, los estudios epidemiológicos fueron hechos agrupando a las cepas de acuerdo con su capacidad de reaccionar frente a 10 anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítopes específicos, que permitían diferenciarlas, los grupos y su virulencia son resumidos en el cuadro 3 (Alexander, 1989).

Cuadro 3. Agrupación y características de cepas del virus de la ENC, usando anticuerpos monoclonales de ratones.

Grupo	Tipo de virus	Huésped principal	Otras características	Ejemplo
A	VVNDV	Aves crianza tecnificada	Panzootia de 1970	NY parrot 70181
B	VVNDV	Aves crianza tecnificada	Vacunas mesogénicas	Hertz 33 Mukteswar

C1	Velogénica	Aves crianza tecnificada	Psitácidas	Aislamientos en Europa y Oriente Medio
C2	Lentogénica	Aves acuáticas		
D	Varios	Pollos	Aislados de USA	Texas GB, Roakin, Komarov
E	Lentogénica	Aves crianza tecnificada	vacunas	Hitchner, B1, La sota
F	Lentogénica	Pollos	Usados como vacunas	Cepa F
G	Lentogénica	Aves acuáticas	Algunas cepas usadas como vacunas	Ulster 2C, V4
H	Lentogénica	Aves acuáticas		MC 110
L	Lentogénica	Aves acuáticas		Loon/USA
P	PPMV-1	Palomas	Panzootia palomas de competencia	617/83

VVNDV: Viscerotrópico velogénico NDV

(Fuente: Alexander, 1989).

Determinación de patotipos virales: Los virus de la ENC se aíslan fácilmente huevos embrionados de pollo, y gracias a la actividad hemaglutinante de la hemaglutinina viral, es posible determinar la presencia viral en el fluido alantoideo de los embriones inoculados (DJ Alexander, 1989; DJ Alexander, 1998). Existen grandes diferencias en patogenicidad entre cepas del virus. El cuadro 2, resume el índice de patogenicidad de los diferentes patotipos usando diferentes pruebas (Alexander, 1989 y 1998).

Cuadro 4. Patotipos e índice de patogenicidad de virus de la ENC.

Patotipo	Rangos de índices			Ejemplos de virus
	MDT	ICPI	IVPI	
Viserotrópico velogénico	<60	1.5-2.0	2.0-3.0	Hertz '33, Milano
Neurotrópico velogénico	<60	1.5-2.0	2.0-3.0	Texas GB
Mesogénico	60-90	1-1.5	0.0-0.5	Roakin, Komarov
Lentogénico	>90	0.2-0.5	0.0	Hitchner B1, La Sota, Clone 30
Asintomático	>90	0.0-0.2	0.0	Ulster 2C, V4, MC110

(Fuente: Alexander, 1998).

El MDT, del inglés Mean Death Time, fue el método de clasificación más antiguo, que clasifica los patotipos virales como velogénicos, mesogénicos y lentogénicos, basándose en el tiempo en que mueren los embriones de pollo SPF, inoculados con el virus por la ruta saco alantoideo. Las cepas son clasificadas como lentogénicas, cuando matan al embrión en menos de 60 horas, mesogénicas, entre 60 y 90 horas y, velogénicas, en más de 90 horas (Miller y Koch, 2020; Bergfeld, 2017).

El índice de patogenicidad intracraneana (IPIC), es el mejor y mas usado método para determinar patogenicidad viral, los procedimientos incluyen la dilución del fluido alantoideo confirmado positivo por hemaglutinación y luego es inhibida la hemaglutinación usando un suero monoespecífico que contiene anticuerpos contra el virus de la enfermedad de newcastle, el titulo hemaglutinante del fluido debe ser mayor a 1:16. Una dosis de 0.05 mL del fluido diluido 1/10 en solucion salina, es inyectado intracranealmente en diez pollos SPF de 1 dia de edad. Las aves son examinadas diariamente durante 8 dias, asignandosele un score diario de: 0 si se observan normales, 1 si se muestran enfermas y 2 si mueren. Las aves muertas son registradas como 2 en cada uno de los dias siguientes hasta los 8 dias. El indice de patogenicidad intracraneana se calcula con el promedio de score diario por ave durante los ocho dias. Los virus mas virulentos se acercan al score maximo de 2.0 y los virus lentogenicos se acercan al 0.0. Se considera que un virus es patógeno cuando tiene un IPIC igual o mayor a 0.7 (WOAH, 2021). El Índice de Patogenicidad Intracraneana (IPIC) es reconocido como la mejor prueba, porque además de diferenciar virus virulentos de no virulentos, permite determinar grados de patogenicidad dando resultados con valores de 0.7 a 2 (Dortmans et al., 2011).

La prueba del Índice de Patogenicidad Intravenosa (IPIV) se realiza en aves de seis semanas y sirve para diferenciar cepas velogénicas de mesogénicas, los valores de la prueba van de 0 a 3, las cepas velogénicas se acercan al 3 y las mesogénicas y lentogénicas se acercan al 0; esta actualmente no es muy usada porque algunos virus que pueden producir enfermedad grave y dar valores de 0, (Dortmans et al., 2011). El MDT como el IPIV son consideradas pruebas imprecisas y no lo suficientemente confiables, principalmente cuando se pretende caracterizar cepas de virus aisladas de brotes sospechosos en especies distintas a pollos por ello, la prueba de IPIC es la más usada y recomendable para determinar patogenicidad viral.; la virulencia de las cepas de APMV-1 también es evaluada mediante técnicas moleculares como PCR o secuenciamiento (WOAH, 2021).

Se considera que todos los aislamientos de APMV-1 pertenecen a un solo serotipo, sin embargo, algunas variaciones antigénicas han sido demostradas entre diferentes aislamientos mediante pruebas de virus neutralización (VN), inmunodifusión en agar gel, anticuerpos monoclonales (mAb), y pruebas de inhibición de la heomaglutinación cruzada. A pesar de no existir variaciones antigénicas entre cepas, el análisis genético se ha convertido en el principal método de caracterización y ha reemplazado al uso de mAbs para tipificar los aislamientos de los virus de la ENC.

Genotipos virales: Los virus de ENC tienen bajas tasas de recombinación, sin embargo, a través del tiempo se han detectado ciertas diferencias antigénicas que han motivado la clasificación de las cepas dentro de linajes o genotipos. De acuerdo con esto las cepas son

agrupadas en dos principales clases, virus de clase I y virus de clase II; los virus de clase I son de baja patogenicidad y son encontrados en aves silvestres, mientras que los de clase II, están clasificados en múltiples serotipos y pueden ser no patógenos o virulentos. Para identificar nuevos genotipos, es usado un sistema basado en una distancia evolutiva media de 10% entre grupos genéticos (Dimitrov KM *et al* 2016; Dimitrov KM *et al*, 2019).

Las cepas de APMV-1 de clase I son genéticamente menos diversas, generalmente están presentes en aves silvestres acuáticas y son de baja virulencia; los virus de clase II son genéticamente y fenotípicamente más diversas, frecuentemente son aisladas de aves domésticas, tienen un amplio rango de virulencia y ocasionalmente son encontradas en aves silvestres; las aves acuáticas, cormoranes y palomas, son los reservorios naturales de APMV-1, excepto de los virus velogénicos viscerotrópicos, para los cuales, los reservorios no han sido totalmente identificados (Dimitrov *et al.*, 2016). Los genotipos I y II de clase II incluyen cepas de alta y baja virulencia, estas últimas frecuentemente son usadas como vacunas; los virus de los genotipos III y IX, que emergieron hace algunas décadas, actualmente son raramente aislados. Los virus de los genotipos V, VI y VII han sido aislados en diferentes continentes; contrariamente los virus virulentos de los genotipos XI (Madagascar), XIII (principalmente Asia), XVI (Norteamérica) y XIV, XVII y XVIII (África) parecen tener limitada distribución geográfica y han sido predominantemente aislados de aves domésticas (Dimitrov *et al.*, 2016).

Determinación del genotipo: La caracterización del genotipo del virus de la ENC, se realiza comúnmente secuenciando el gen F completo y otros segmentos de genes, lo que permite determinar la virulencia, sin embargo, actualmente este método muestra limitaciones en comparación con la secuenciación del genoma completo que permite estudiar mejor la evolución y epidemiología de las cepas virales; el método Sanger de uso común para secuenciamiento de genoma completo usando cebadores superpuestos, ha mostrado ser poco práctico por tener limitaciones significativas, como son el alto costo, producción reducida y largo tiempo de respuesta; otro problema es que el envío y transporte de un virus virulento requiere de muchas precauciones de bioseguridad y permisos especiales, a diferencia de muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina que pueden transportarse sin riesgo a través de fronteras, este método es el estándar de oro porque además permite observar la lesión (Butt *et al.*, 2019).

Las tarjetas Flinders Technology Associates (Tarjetas FTA®) permiten coleccionar y transportar muestras sin riesgo alguno, ya que inactivan al virus completamente sin alterar el ácido nucleico (Perozo *et al.*, 2006); se limitan solo a la detección y análisis genético del ácido nucleico, no permitiendo realizar pruebas más amplias que se requieran. La inmunohistoquímica (IHC), es usada para demostrar la presencia del antígeno en un tejido, determinando el tropismo celular,

pero no permite la caracterización completa del virus (Butt *et al.*, 2019). Ha sido reportado un método que facilitó el manejo del virus de la ENC en Pakistan, se basa en el uso combinado de dos técnicas, el RNA de los tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina, junto con el ensamblaje de novo, este método es muy confiable y seguro para realizar los estudios epidemiológicos y evolutivos (Butt *et al.*, 2019).

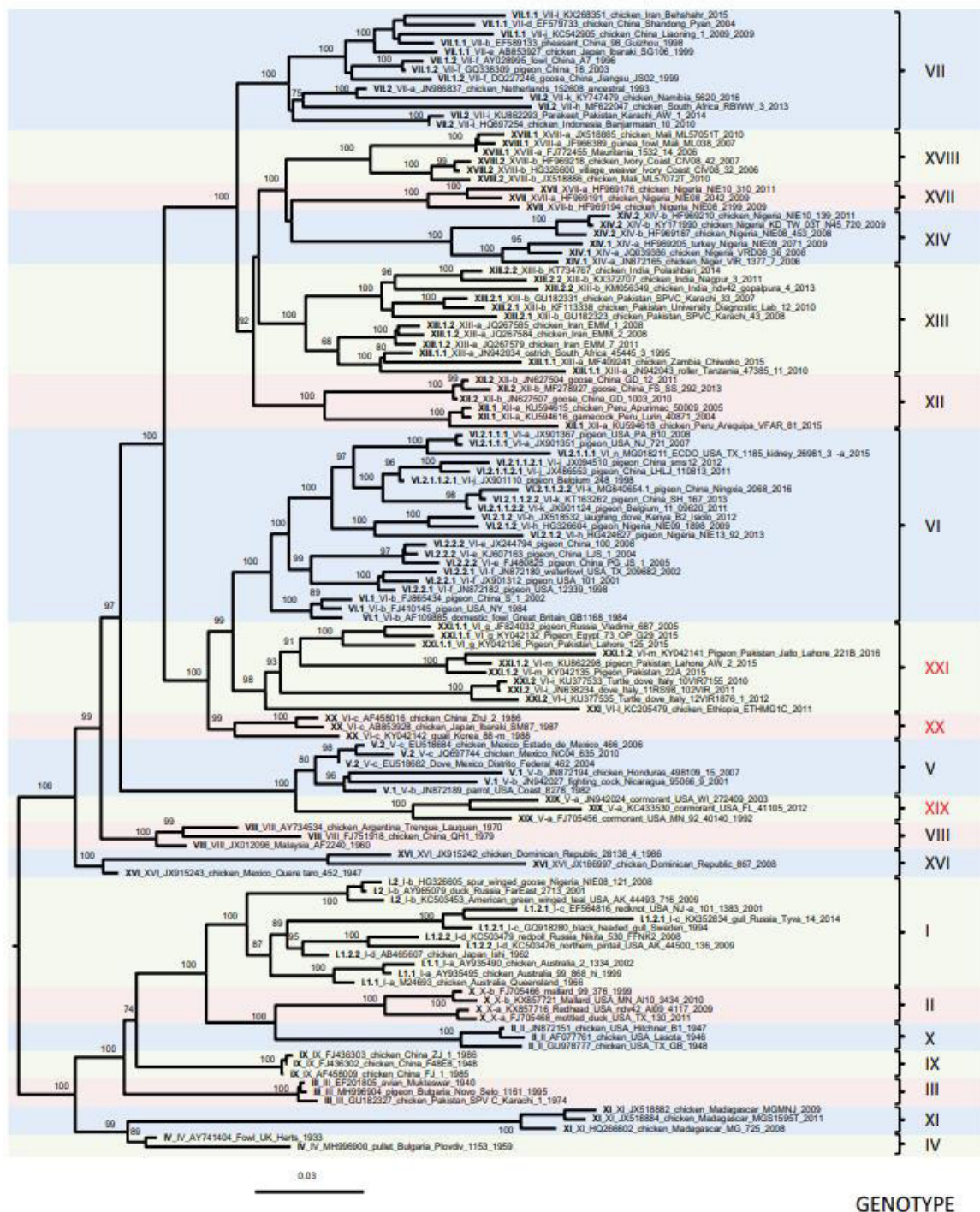
El desarrollo del método de secuenciación de próxima generación, en inglés Next-generation sequencing (NGS), ha surgido como una herramienta para la investigación y caracterización genética de agentes infecciosos, se ha mejorado la capacidad de secuenciar genomas completos, este método es ideal para los virus RNA que mutan rápidamente, no solo por reducir los costos, sino por evitar los problemas con los métodos de PCR y secuenciación Sanger (Butt *et al.*, 2019). Como consecuencia de esto, durante las últimas décadas, la inclusión de la caracterización genética en las investigaciones sobre APMV-1, ha mejorado enormemente la comprensión sobre la taxonomía evolucionaria de este virus y la comprensión sobre rangos geográficos y de huéspedes (Dimitrov *et al.*, 2019).

Se han propuesto varios sistemas de clasificación para diferenciar e identificar el genotipo de cepas de Paramixovirus aviares 1, sin embargo, ellos se basaban en enfoques diferentes creando discrepancias entre sistemas y generando discusiones difíciles de estudiar. Diel *et al.* (2012), propusieron un sistema que usó un criterio de clasificación objetivo, sin embargo, debido a la amplia circulación y evolución de cepas del virus de ENC en el mundo, y a la utilización de solo alguno de los criterios, originó que se asignara una nomenclatura incorrecta a nuevos subgenotipos. Para superar estos problemas, fue convocado un panel de expertos que analizara con profundidad la diversidad genética de los virus de ENC. Este panel generó para uso público, datos actualizados, curados, de todos los genes completos de fusión de los virus conocidos de clase I y clase II (Dimitrov *et al.*, 2019). El panel de expertos realizó una comparación de métodos de inferencia analizando la distancia de nucleótidos, teniendo en cuenta un modelo de máxima verosimilitud y estimación bayesiana, con esta información se desarrolló una clasificación actualizada de las cepas del virus de la ENC y un sistema de nomenclatura que incorpora la topología filogenética, la distancia genética, el soporte de ramas y la independencia epidemiológica. Este nuevo sistema mantuvo las dos clases de genotipos del virus, identificó tres nuevos genotipos y redujo el número de subgenotipos, además, para rastrear la ascendencia de

los virus, se introdujo un sistema de nombres dicotómicos para designar subgenotipos (Dimitrov *et al.*, 2019).

K.M. Dimitrov, *et al.*

Infection, Genetics and Evolution 74 (2019) 10391;



GENOTYPE

Figura 11. Árbol “piloto” de virus de enfermedad de Newcastle de clase II que incluye 21 genotipos virales. (Fuente: Dimitrov *et al.*, 2019).

La Figura 11 muestra el árbol filogenético piloto, que incluye tres nuevos genotipos (resaltados en rojo), haciendo un total de 21 genotipos virales dentro de los virus de clase II. En

la Figura 12 (Dimitrov *et al.* (2019), se comparan las nomenclaturas de Aldous *et al.* (2003) y Diel *et al.* (2012).).

Sub/lineage Aldous <i>et al.</i> , 2003	Sub/genotype Diel <i>et al.</i> , 2012a, 2012b	Current study
Class II		
1	I a	I.1.1
	I b	I.2.
	I c	I.1.2.1
	I d	I.1.2.2
2	II	II
3a, 3f	III	III
3b	IV	IV
3c	V b	V; V.1
	V c	V.2
	V d	V
4bii e	VI a	VI.2.1.1.1
	VI n	VI.2.1.1.1
4b, 4bi,	VI b	VI.1.1
4bii d	VI e	VI.1.2.2.2
	VI f	VI.1.2.2.1
	VI h	VI.1.2.1.2
4bii f	VI j	VI.2.1.1.2.1
	VI k	VI.2.1.1.2.2
4c	–	–
5a	VII a – one sequence	VII.2
	VIII	
5d	VII b	VII.1.1
	VII b	VII.1.1
	VII j	VII.1.1
	VII l	VII.1.1
5c	VII e	VII.1.1
	VII f	VII.1.2
–	VII g (RF)	–
5a	VII h	VII.2
–	VII k	VII.2
5e	VII	VII, VII.2
3d	VIII	VIII
3e	IX	IX
1	X a	X
	X b	X
3 g	XI	XI
5b	XII a	XII.1
	XII b	XII.2
5b	XIII a	XIII.1.1
	XIII a	XIII.1.2
	XIII b	XIII.2.1
	XIII b	XIII.2.2
5 h, 7d	XIV	XIV
5f, 7c	XIV a	XIV.1
	XIV b	XIV.2
–	XV (RF)	XV (RF)
3d	XVI	XVI
5 g, 7a	XVII a	XVII
	XVII b	XVII
7b	XVIII a	XVIII.1
	XVIII b	XVIII.2
3c	V a	XIX
4a, 4d	VI c	XX
–	VI l	XXI
–	VI i	XXI.2
–	VI g	XXI.1.1
–	VI m	XXI.1.2
Class I		
6	1a	1.1.1
	1b	1.1.2
	1c	1.2
	1d	1.2

Figura 12. Comparación entre los tres sistemas, linaje de Aldous *et al.* (2003), sistema genotipo desarrollado por Diel *et al.* (2012^a) y la clasificación actual. (Fuente: Dimitrov *et al.* 2019).

En el estudio de Dimitrov *et al.* (2019), además, se proporcionó un conjunto de datos piloto y una guía de raíces de subárboles para identificación preliminar rápida de nuevas cepas. Se incluyeron pautas para la curación de conjunto de datos de secuencias y la inferencia

filogenética, y una comparación detallada entre los sistemas actualizados y los anteriores. Para aumentar la velocidad de la inferencia filogenética y para garantizar la coherencia entre laboratorios, también se proporcionaron pautas para el uso de una supercomputadora. El sistema de clasificación unificado propuesto fue hecho para facilitar los estudios epidemiológicos y de evolución del virus de la ENC y los de comparación de resultados en todo el mundo.

Cuadro 5. Clasificación actual de genotipos del virus de ENC y virulencia

Clase	Genotipo	Tipo ave	Virulencia
I	1	Silvestres	Baja (exc Irlanda 90)
II	Genotipo	Tipo ave	Virulencia
	I	Silvestres	Baja (exc Aus 98) PhyLMV42
	II		B1, La Sota, VG-GA
	III-IX		Virulentas
	X	Silvestres/domesticas	Baja
	XI-XXI		Virulentas

2.2 EPIDEMIOLOGÍA

2.2.1 Resistencia a los agentes físicos y químicos

La infectividad de los Paramixovirus aviaries es destruida con el tratamiento con agentes físicos y químicos tales como calor, luz ultravioleta, procesos de oxidación, pH y varios compuestos químicos; la tasa a la cual la infectividad es destruida depende de la cepa de virus, tiempo de exposición, cantidad de virus, naturaleza de la suspensión y la interacción entre tratamientos, sin embargo, ningún tratamiento puede garantizar la destrucción total del virus (Alexander, 1991).

Bankowski y Reynolds (1975), evaluaron el tiempo en que una cepa de virus velogénico viscerotrópico persiste en la cama, después de una crianza con un brote de enfermedad de Newcastle, el experimento se realizó en la estación de verano y otoño, bajo una temperatura ambiental de entre 23 a 29°C y una humedad relativa de 64-78%, Cuadro 6.

Cuadro 6. Exposición de pollos susceptibles a la cama en donde hubo brotes de pollos con ENC velogénico.

Ensayo n°	Tiempo de remoción de las aves	N° y edad de pollos colocados	Tiempo de exposición de las aves	Signos y mortalidad (A)	Observación (B)
1	48 h	6 (6 sem)	--	Todos murieron 6-9 d	--
2	4 días	6 (10 sem)	--	Todos murieron 6-9 d	--
3	14 días	10 (13 sem)	30 días	Ninguno	Negativos Ac HI. Todos susceptibles a exposición por contacto
4	7 días	10 (7 sem)	--	A 5-6 d signos resp y depresión. 7-11d todos murieron	
5	10 días	10 (11sem)	30 días	Ninguno	Negativos Ac HI. Todos susceptibles a exposición por contacto

(Fuente: Bankowski y Reynolds, 1975).

El virus es muy sensible a la mayoría de los desinfectantes, sin embargo, existe una variación en las publicaciones referentes a los tiempos de supervivencia del virus fuera del huésped, siendo estas diferencias atribuidas a temperatura, humedad ambiental y el medio en el cual el virus fue analizado (Kinde *et al.*, 2004). Es conocido que después de eliminar los residuos de materia orgánica con un minucioso y lavado de las superficies con jabones y detergentes, los agentes oxidantes como hipoclorito de sodio, alcalinos como hidróxido de sodio y, ácidos como glutaraldehidos, formalina, gas formaldehido, se destruye la infectividad del virus (Miller y Koch, 2020). Kinde *et al.* (2004), realizaron un estudio de sobrevivencia del virus en la cama contaminada de galpones, mediante hisopados de arrastre colectados después de haberse removido la totalidad de las aves de un lote afectado por un brote por un virus exótico de la enfermedad de Newcastle; No se aisló virus exótico en ninguna de las muestras, a partir de los 16 días después de haber despoblado los galpones de la granja (Cuadro 7).

Cuadro 7. Detección de virus de la ENC, usando hisopados de arrastre, después de despoblar lotes de aves afectadas por un brote de virus exótico.

Días posterior a la despoblación	Galpón	Positivos/Total	Rango de Temperatura de la cama
0	3	2/5	No registrada
1	1	2/5	No registrada
1	3	1/5	13.9-15.5
2	1	1/5	13.9-15.5
2	3	2/5	15.59-19.4
3	1	2/5	15.59-21.1
4	3	1/5	15.59-26.6
7	3	1/5	15.59-26.6
10	3 ^A	1/4	15.59-26.6
12	3 ^A	1/6	10.9-15.5
13-14	1-3	0/14	8.89-15.5
16	1, 2, o 3	1/15	No registrada

^A Hisopos tomados de heces. (Fuente: Kinde et al., 2004).

2.2.2 Huéspedes y reservorios virales

La enfermedad de Newcastle continúa representando un problema sanitario principalmente en los países del Oriente Medio, África y Asia donde se han diseminado los virus velogénicos viscerotrópicos (Miller y Koch, 2020).

Se conoce que el virus tiene un amplio rango de huéspedes, siendo susceptibles al menos 250 236 especies clasificadas en 27 de 50 órdenes de aves, sin embargo, el mayor impacto de la enfermedad es sobre las aves domésticas en donde la enfermedad puede ocasionar grandes pérdidas económicas Kaleta EF and C Baldauf. 1988 (Sahoo *N et al.*, 2022). Algunas especies de aves requieren mayores dosis virales que otras para ser infectadas, como ocurre con los pavos; sin embargo, aun cuando muchas especies pueden ser infectadas, no solo de la dosis y la especie de ave depende la severidad de la enfermedad, sino también de la cepa de virus (Miller y Koch, 2020). La transmisión horizontal del virus es la forma más importante de diseminación, las aves infectadas eliminan el virus por las secreciones oro faríngeas y excreciones fecales; de otro lado, las aves se infectan por inhalación o ingestión del material contaminado (Miller y Koch, 2020).

Se ha señalado que la ecología del virus de la Enfermedad de Newcastle comprende dos tipos de hospederos: las aves acuáticas silvestres que son portadoras de cepas lentogénicas, y las aves domésticas que sufren de brotes por cepas mesogénicas/velogénicas; también se ha señalado que las cepas muy virulentas altamente patogénicas parecen surgir ~~surgen~~ durante la replicación del virus en poblaciones avícolas de alta densidad (citado por Sahoo *N et al.*, 2022). Las cuatro panzootias definidas por el Dr. Alexander desde 1926 en que se reconoció por primera vez a la

enfermedad, han involucrado en la diseminación del virus en el mundo, a palomas silvestres y psitácidas de importación (Miller y Koch, 2020). Sin embargo, los brotes de la ENC en los Estados Unidos de Norteamérica durante el año 2010, ocasionados por un virus virulento del genotipo V, que fue aislado en cormoranes ha sido motivo de preocupación para los productores avícolas de ese país (Diel *et al.*, 2012). Igualmente, se reportaron casos con morbilidad y mortalidad en cormoranes en el año 2007 en Chile, en donde se identificó a un virus virulento de tipo meso génico del genotipo V (Moreno *et al.*, 2009). Estos hallazgos resaltan la importancia de lo que representan, no solo las aves psitácidas y columbiformes, sino las aves silvestres en general, en la propagación de las cepas virulentas del virus, siendo actualmente este tipo de aves, una amenaza para la población avícola doméstica y comercial (Figura 13).

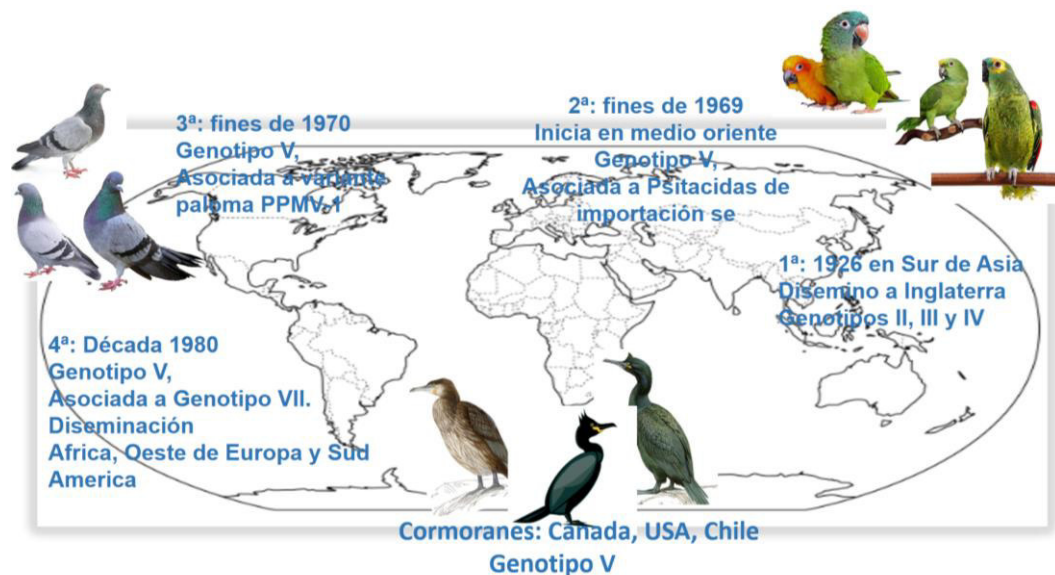


Figura 13. Aves silvestres relacionadas con brotes del virus de la Enfermedad de Newcastle.
Fuente: elaboración propia.

Las aves migratorias son consideradas un reservorio natural del virus, por ello, probablemente se observa un patrón estacional de brotes de la enfermedad, pero de otro lado, el movimiento del virus entre aves migratorias no explica como algunas cepas estrechamente relacionadas han sido detectadas en China, Nigeria, Reino Unido y Brasil donde la migración intercontinental natural de aves es poco probable; se ha señalado que un factor importante en la transmisión viral es la proximidad de granjas; los brotes han sido asociados al agua contaminada, al movimiento de aves afectadas o recuperadas y, al movimiento de equipo y camiones de alimento (Miller y Koch, 2020).

Es muy raro el aislamiento del virus de la ENC en humanos, y cuando ha ocurrido ha sido solo en personas que trabajan en estrecho contacto con aves, o por infecciones adquiridas por quienes manipulan el virus en el laboratorio o vacunas vivas; la presentación clínica de la

infección en humanos es como una conjuntivitis autolimitante, siendo raros otros síntomas, por lo tanto, el contacto con aves infectadas o vacunadas representa un muy bajo riesgo de infección para humanos (Miller y Koch, 2020).

Estudios sobre reservorios realizados en el Perú en aves silvestres: Durante 1994 y 1995, ocurrieron en el Perú, brotes severos de la ENC, los brotes ocurridos en la ciudad de Lima y Arequipa fueron identificados a ser causados por cepas del tipo B y A, respectivamente, sugiriendo que el virus estuvo presente en el país, en reservorios no identificados (Yanayaco A. 1995). La preocupación por determinar los reservorios del virus en nuestro país, motivaron la realización de estudios de vigilancia serológica en aves columbiformes que habitan los alrededores de granjas avícolas de la costa de Lima. En el primer estudio realizado por Chang *et al.* (1999), analizando 398 muestras de aves silvestres, 263 tórtolas y 135 palomas, por la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, no se logró detectar anticuerpos contra el virus de la ENC en ninguna de las muestras. Un segundo estudio realizado en la Provincia de Huaral, en una zona que estuvo sufriendo brotes de la enfermedad al momento del estudio, se capturaron 462 aves silvestres, entre palomas y tórtolas, las muestras fueron analizadas para detectar anticuerpos mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación, obteniéndose resultados 100% negativos a la prueba (Carrión *et al.*, 2000). Los resultados de estos dos estudios sugieren que, en el Perú, las aves muestreadas del tipo columbiformes no constituyen un reservorio principal del virus en el país. Por último, considerando el rol de las aves psitácidas en la segunda panzootia, se realizó un estudio serológico en las 255 aves del orden psitaciformes mantenidas en cautiverio en el principal Parque Zoológico de Lima, “Parque de la Leyendas”, no se detectaron anticuerpos contra el virus de la ENC por la prueba de HI en ninguna de las muestras, estos resultados sugirieron que estas aves no fueron expuestas al virus y, que aparentemente tampoco constituyen un reservorio del virus en el Perú (Shimabukuro e Icochea, 2000).

Varios experimentos fueron realizados en el LAP, para determinar la susceptibilidad de otras especies de aves al virus patógeno que circula en el país. La ENC fue reproducida experimentalmente en tórtolas de la especie *Eupelia cruziana* desafiadas con una cepa viscerotrópica velogénica del virus, ocasionando 40% de signos nerviosos y 20% de mortalidad (Vargas *et al.*, 2004). De otro lado en un experimento similar realizado por el LAP en palomas silvestres (*Columba livia*), el desafío ocasionó sintomatología respiratoria, digestiva y nerviosa, con mortalidad en el 43% de las aves (Caballero F *et al.*, 2005). En un tercer estudio se determinó la susceptibilidad de codornices, frente al desafío con una cepa viscerotrópica velogénica de la enfermedad, la que logró reproducir los signos clínicos respiratorios, nerviosos y digestivos con una mortalidad del 20% de las aves del grupo desafiado (Quevedo *et al.*, 2009). En los tres

experimentos, se comprobó la seroconversión, al ser detectados en las aves, anticuerpos por la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

Estudios sobre reservorios en el Perú en aves domésticas, de crianza industrial, de traspatio y riña: Durante el año 2001, fueron analizadas por la prueba de Inhibición de la hemaglutinación, 390 muestras de suero de aves de crianza tecnificada (pollos de engorde, ponedoras comerciales y reproductoras) y, 343 muestras de suero de aves de riña y traspatio del departamento de Lima; 3.7% de las aves de crianza tecnificada presentaron títulos sugestivos de un reto de campo haciendo una prevalencia de $1.8 \pm 1.3\%$, mientras que, 15.4% de las aves de crianza no tecnificada, de riña y traspatio, presentaron títulos sugestivos de un reto de campo haciendo una prevalencia de $9.9 \pm 3.2\%$. Estos resultados mostraron que las aves de riña y traspatio constituyeron un factor de riesgo ($p < 0.0001$) asociado a un reto de campo por virus de la ENC (Ferrer *et al.*, 2008). En otro estudio realizado en el LAP, se analizaron 299 muestras de suero de aves ponedoras comerciales y 1200 aves de crianza casera, colectadas por el SENASA, en los departamentos de Ica, Moquegua, Tacna, Junín, Ayacucho, Huancavelica, Cuzco, Apurímac, y Puno, durante los años 2001 y 2002; los resultados arrojaron una frecuencia de positividad compatible con desafío en 11.71% de las aves ponedoras y 3.9 de las aves de crianza casera. El análisis de regresión logística multinomial mostró al grupo de ponedoras comerciales de los departamentos incluidos en el estudio, como factor de riesgo, asociado al título de anticuerpos por la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, compatible con reto de campo (Ravina, 2005).

2.2.3 Vías de transmisión

La principal vía de transmisión del virus es horizontal, las aves infectadas eliminan el virus en las secreciones nasales y oculares, de otro lado, además que el virus de la ENC se replica en el tracto respiratorio, igualmente replica en el intestino, siendo transmitido a través de las heces (Alexander, 1998). Las aves se infectan por inhalación o ingestión de aerosoles o material contaminado; las aves vacunadas que son infectadas con el virus patógeno pueden eliminar el virus infeccioso por 6 a 9 días después del desafío, mientras que las aves silvestres no vacunadas como loros, cormoranes o palomas pueden tener una prolongada eliminación viral en las heces, en ausencia de signos clínicos (Miller y Koch, 2020).



Figura 14. Transmisión viral. Fuente: elaboración propia.

En un estudio, fue demostrada la diversidad genética de virus aislados de especies distintas que conviven en los mercados de aves vivas en China, el desafío experimental con virus de origen pollo, pato o paloma, mostró un tropismo de tejido y rango de huésped diferentes (Figura 14) (Kang *et al.*, 2016).

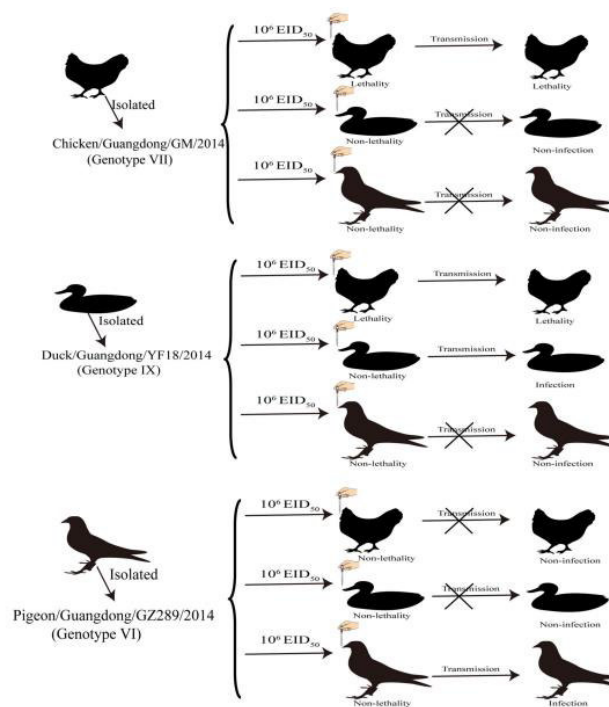


Figura 15. Transmisión de vENC entre pollos, patos y palomas, inoculados vía intraocular e intranasal con 10^6 EID_{50} de los virus de diferente origen, tres aves fueron colocadas en contacto en la misma jaula. (Fuente: Kang *et al.*, 2016).

Se considera difícil de probar la transmisión vertical del virus a la progenie por la posibilidad de contaminación a partir de heces de la cáscara o del ambiente, la contaminación de embriones con virus patógenos generalmente ocasiona la muerte antes de la eclosión, sin embargo, existen al menos dos reportes de virus virulento aislados de pollos de 1 día de nacido, o de embriones

mueritos a término (Jui-Pin et al, 2002; Miller y Koch, 2020), uno de ellos es el realizado en China, en donde debido a la ocurrencia de brotes de la enfermedad en pollos menores de dos semanas, que procedían de reproductoras con un brote de ENC, se realizó un experimento que confirmó que los embriones de pollo infectados con un título bajo del virus pueden llegar a nacer siendo portadores del virus como consecuencia de transmisión vertical (Chen y Wang, 2002).

Sa e Silva *et al.* (2016), demostraron que el virus virulento replica en el tracto reproductivo contaminando la cáscara y los componentes internos del huevo pero que la vacunación previene esta contaminación (Cuadro 8). En aves en producción, las heces contaminadas pueden contaminar la superficie de la cáscara del huevo, siendo una fuente del virus para la progenie (Chen y Wang, 2002), sin embargo, la transmisión vertical es controversial y la evidencia definitiva es muy pobre.

Cuadro 8. Distribución del antígeno de la nucleoproteína del virus de la ENC por IHC, en el tracto reproductivo de gallinas infectadas con 105.9 DIE50 de un vvENC (aves del 1 al 12) y controles (13 y 14).

Ave	Ovario	Infundíbulo	Magnum	Utero	Vagina
1	+++	++++	-	-	+
2	+	++++	++	++	+++
3	+	++++	++	++	+++
4	+	+	-	-	++
5	+++	++++	+++	++	+++
6	+++	-	+++	++	+
7	+++	-	-	++	++
8	+++	++++	++	++	++
9	+++	++++	+	++	+++
10	+++	++	-	++	++
11	+++	++++	-	++	+++
12	+++	++	-	-	+
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-

IHC: inmunohistoquímica. (Fuente: Sa e Silva *et al.*, 2016).

2.2 RESPUESTA INMUNE

Es ampliamente conocido que, además de la bioseguridad y la eliminación de aves infectadas, la vacunación es la herramienta crítica para el control de la enfermedad de Newcastle (Miller y

Koch, 2020). Es reconocido que las vacunas contra la ENC inducen una respuesta inmune que previene por completo o reduce el impacto de la enfermedad clínica y la mortalidad, además de disminuir la eliminación viral de las aves infectadas aumentando a la vez, la cantidad de virus necesaria para infectar a un animal vacunado (Miller y Koch, 2020).

Las políticas de control nacional e internacional de vacunación dependerán de los factores que afectan a cada sector de la producción avícola, respetando las normas de la OIE (Kapczynski *et al.*, 2013). En muchos países de Latinoamérica, donde circulan los virus velogénicos, existen reglamentos y leyes específicas para la prevención y control de la enfermedad de Newcastle, por ejempló en el Perú, el DECRETO SUPREMO N° 010-2003-AG obliga a vacunar contra la ENC a todos los pollos de engorde, ponedoras, reproductores, aves de pelea, crianza de traspatio y pavos (SENASA, 2003).

2.2.1 Respuesta innata

La respuesta innata del huésped representa la primera línea de defensa contra el virus, las células del sistema inmune del huésped pueden, a través de receptores de reconocimiento conocidos como “Receptores tipo Toll (RTL)”, reconocer componentes de los patógenos conocidos como “patrones moleculares asociados al patógeno” (Zhang *et al.*, 2018). Una vez que los patrones moleculares asociados al patógeno son reconocidos por los RTL, estos activan la respuesta inmune innata mediante la activación de factores de transcripción como el NF- κ B y proteínas kinasas, para inducir moléculas relacionadas con inmunidad, tales como péptidos de defensa (B-defensinas) y citoquinas, con la finalidad de defenderse de la invasión viral (Zhang *et al.*, 2018).

La respuesta innata del huésped a la infección viral es una reacción inmediata que tiene como objetivo retrasar la propagación del virus y contribuir a desarrollar la protección específica de la respuesta inmune adaptativa (Rue *et al.*, 2011). Después de seis horas post infección con virus virulento de la ENC, a diferencia de los virus de baja patogenicidad, las células del bazo producen alpha y beta interferón, e interleukina 6 (IL-6), lo que depende no solo de la virulencia del virus, sino también de la cantidad de virus que infecta la célula; el virus de la ENC induce a la producción de interferones de tipo I y II, citoquinas quimioquinas e iNOS; un día después de la infección, el IFN γ , secretado de células NK y Linfocitos T activa a los macrófagos y promueve el inicio de la inmunidad mediada por células (IMC) (Miller y Koch, 2020). En un estudio, se demostró que, a las 24 horas post infección, la cepa virulenta CA02 indujo una respuesta innata temprana estimulando a los leucocitos del bazo a aumentar la expresión de genes de una variedad de citokinas proinflamatorias (IL-6), para producir iNOS, IL-1B, IL-18, IL-8 e IFN γ . Además, se demostró un aumento de la expresión de genes efectores antivirales IFN y proteínas antivirales

como proteína kinasa, y la expresión de numerosas citokinas tales como K203, ah221, CXCL13/BCA-1, CCL21, MIP-3a y MIP-1b, principalmente estas dos últimas con una función de establecer una respuesta celular tardía de reclutamiento de heterófilos o leucocitos efectores (Rue *et al.*, 2011).

Los efectos de la respuesta innata corresponden con la reacción post vacunal observada después de la aplicación de cepas vacunales vivas como la cepa L sota y, con las severas lesiones inducidas al poco tiempo de desafiar a las aves con virus virulentos (Figura 16). La respuesta innata por sí sola no es suficiente para asegurar la sobrevivencia del huésped después de una exposición al virus virulento, aun cuando, la actividad de las NK, que son capaces de destruir las células infectadas con virus, mejora con la edad de los pollos, esto podría ser la explicación de la disminución de la susceptibilidad al virus, en aves mayores (Miller y Koch, 2020).



Figura 16. Efectos de respuesta innata, 48 h post infección con vvENC

2.2.2 Respuesta inmune humoral.

Una vez que el virus supera la respuesta innata, son iniciadas por el huésped las respuestas humoral y celular, lo cual se logra con la infección o con la vacunación de las aves (Miller y Koch, 2020).

La respuesta inmune humoral al virus de la ENC depende de los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra las glicoproteínas responsables de la unión al receptor y propagación viral, como son la hemaglutinina y la glicoproteína de Fusión. Sin embargo, las nuevas tecnologías han permitido un conocimiento más profundo de los genes que modulan la respuesta innata y mediada por células después de la infección (Kapczynski *et al.*, 2013).

Después de la exposición al virus de la ENC, los linfocitos B son diferenciados en células plasmáticas que secretan tres tipos de anticuerpos neutralizantes específicos para el virus, las IgM son producidas primero y pueden ser detectadas tan pronto como 4 horas después de la vacunación; después de 7 días, son detectadas las IgY y las IgA secretadas por la glándula de Harder y las tonsilas cecales. Los anticuerpos secretorios IgA son importantes para neutralizar al virus libre en el epitelio, respiratorio, digestivo o reproductivo, mientras que los anticuerpos neutralizantes IgG contra las glicoproteínas HN o F se unen al virus para prevenir el ataque a las células y reducir la replicación viral (Miller y Koch, 2020). Los IgG e IgM son detectados en el suero sanguíneo, mientras que las IgA pueden ser detectados en lágrimas, lavados traqueales o bilis (Miller y Koch, 2020).

Se ha sugerido que existe una relación directa entre títulos de anticuerpos y protección, habiéndose observado que aves con títulos mayores a 16, obtenidos después de múltiples vacunas, lograron sobrevivir después del desafío, mientras que, el 66% del lote murió cuando los títulos de las aves fueron menores a 16; asimismo, se reportó que títulos mayores a 32 fueron totalmente protectivos (Kapczynski *et al.*, 2013). Por otro lado, otros autores indican que los títulos de anticuerpos en suero medidos por pruebas de inhibición de la hemoaglutinación no correlacionan directamente con el grado de resistencia de los pollos al desafío experimental con virus de la ENC (Rauw *et al.*, 2009).

Otro aspecto de la protección vacunal es el que algunos autores consideran importante obtener una inmunidad de rebaño, lo que se logra solo cuando más del 85% del lote, presenta títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (HI) mayores a 3 log₂, u 8, después de haber sido vacunados con al menos dos vacunas, considerándose como un programa de vacunación exitoso (Van Boven *et al.*, 2008). Muchos factores determinan la mayor susceptibilidad de las aves a infectarse con el virus de la ENC, se ha reportado que las aves de postura comercial son más susceptibles que pollos de engorde, y que a su vez las ponedoras son más susceptibles en la etapa de inicio y hasta el pico de producción de huevos, por lo tanto, el inicio de la puesta es considerado un factor de estrés capaz de alterar el sistema inmunológico de las aves (Chukwudi E, Chukwuemeka E, 2013).

2.2.3 Respuesta inmune celular

La respuesta celular es detectada a los 2 a 3 días posterior a la infección o vacunación con una vacuna viva. La inmunidad adaptativa específica o mediada por células (IMC), es dependiente de los linfocitos T, y es considerada como el factor más importante que contribuye a lograr la protección vacunal y depuración viral. Las subpoblaciones de linfocitos T que incluyen las células

T helper CD4, secretoras de citoquinas y, los linfocitos T citotóxicos CD8, constituyen las principales células de la respuesta IMC; los procedimientos de medición de respuesta celular son más laboriosos de realizar y requieren más habilidades, experiencia y tiempo en comparación a las pruebas convencionales de evaluación de respuesta humoral como son las ELISA y HI. La medición de respuesta celular incluye la inducción de interferon- γ a partir de linfocitos estimulados, proliferación celular, citometría de flujo de linfocitos y evaluación de niveles de citotoxicidad por linfocitos T CD8 específicos en células blanco-infectadas con virus de la ENC (Kapczynski *et al.*, 2013).

Se considera que la inmunidad celular es inducida por las vacunas vivas, es así, que experimentos realizados mostraron que se obtiene un aumento en la medición de IFN y proliferación celular en esplenocitos de pollos vacunados con vacunas vivas en comparación a los vacunados con vacunas inactivadas, y esto se debe a que las vacunas vivas estimulan en el hospedero, ambos, el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I (CD8+) y II (CD4+). La inmunidad inducida por las vacunas inactivadas es estimulada por la presentación de linfocitos CD4+ y CMH II, que activan la producción de anticuerpos mediante la secreción de citoquinas (Kapczynski *et al.*, 2013).

Por otro lado, se ha señalado que las cepas más virulentas inducen una más intensa y prologada inmunidad mediada por células que las menos virulentas, y que esto se debería a que persisten más tiempo en el ave, pudiendo aumentar la magnitud y duración de la IMC (Kapczynski *et al.*, 2013). Asimismo, en otro estudio, se observaron diferencias en la intensidad y tiempos de expresión de citoquinas entre cepas de virus; se comparó la respuesta inmune de dos cepas vvENC, y a pesar de que la cepa GD de origen pato, tuvo menor IPIC que la cepa F48E9, de origen pollo, esta indujo mayor respuesta inmune y mayor ARN viral en los tejidos a un estadio temprano de infección, demostrando una regulación diferencial de la respuesta inmune por diferentes cepas del virus (Zhang *et al.*, 2018).

Vacunas inactivadas contra la Enfermedad de Newcastle: Numerosos estudios han demostrado que las vacunas inactivadas aumentan el nivel de anticuerpos inducido por las vacunas vivas y prolongan la persistencia de estos (Sialer *et al.*, 2020). Inicialmente, las vacunas inactivadas fueron usadas para ser aplicadas en aves de larga vida, ponedoras comerciales y las reproductoras pesadas o livianas, con la finalidad de proteger a las aves durante la etapa de producción de huevos, y en el caso de las reproductoras, lograr una buena transferencia de anticuerpos maternos a la progenie. Sin embargo, actualmente, en los países con alto riesgo de infección por cepas del virus velógenicas viscerotrópicas, las vacunas inactivadas son también usadas en pollos de engorde, aplicadas en planta de incubación al día de edad, con la finalidad es

potenciar la inmunidad inducida por las vacunas vivas (Sialer *et al.*, 2020). La ventaja de las vacunas inactivadas es que no ocasionan reacción post vacunal, pero tienen la desventaja de ser más costosas de producir y, que no pueden ser aplicadas en forma masiva, sino que tienen que ser aplicadas individualmente por la vía parenteral (Kapczynski *et al.*, 2013).

Inmunidad mucosal inducida por vacunas inactivadas: Las vacunas con cepas vivas de baja patogenicidad, protegen a las aves induciendo una respuesta inmune completa, siempre se ha reconocido que la aplicación mucosal de vacunas vivas induce una respuesta local y sistémica, pero que la aplicación de vacunas inactivadas induce solo inmunidad sistémica (Chimeno *et al.*, 2008).

La respuesta de anticuerpos humorales aparece en sangre y localmente a partir de los 6 a 10 días posteriores a la vacunación o infección; después de la vacunación local con una cepa del virus, los anticuerpos mucosales producidos localmente son secretados del epitelio hacia las mucosas y lágrimas, las inmunoglobulinas IgG son trasudadas del suero, mientras que las IgM e IgA son producidas localmente, en los agregados linfoides del tracto respiratorio, como glándula de Harder, o tracto intestinal, placas de Peyer o tonsilas cecales; los anticuerpos secretorios neutralizan al virus localmente pero no previenen la multiplicación viral después del desafío (Al-Garib *et al.*, 2003). Varios estudios han obtenido resultados que debilitan la teoría que las vacunas inactivadas no inducen una respuesta mucosal, porque 21 días después aplicar a pollos una vacuna inactivada a los 0 y 14 días de edad por vía intramuscular, Chimeno *et al.* (2008), demostraron una respuesta de anticuerpos mucosales del tipo IgG, no solo en el suero, sino también en los hisopados de tráquea e intestinos (Figura 17).

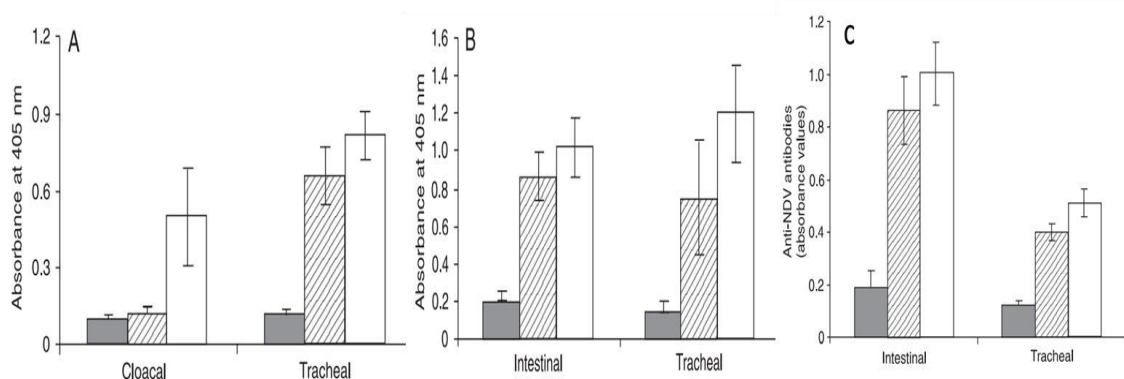


Figura 17. Respuesta de anticuerpos IgG por ELISA en hisopados (A) o lavados (B) de tráquea y cloaca y, en sobrenadante de cultivos de tejidos con las mismas muestras (C), en pollos 21 d.p.v. con vacuna viva (rallas), inactivada (blanca) o no vacunado (gris). (Fuente: Chimeno *et al.*, 2008).

Otro estudio realizado por Al-Garib *et al.* (2003), usando una prueba de ELISA de captura, para detectar IgA, IgM e IgG en suero sanguíneo, lavados traqueales y bilis de pollos inmunizados con una vacuna viva o inactivada, en los lavados traqueales y bilis de los pollos vacunados con inactivada, lograron detectar IgM e IgG, aun cuando no lograron detectar IgA.

2.2.1 LA ENFERMEDAD

Signos clínicos

La virulencia de los Paramixovirus aviar-1 varia ampliamente dependiendo de, la cepa de virus, el huésped, la edad de las aves, el nivel de protección inmune y la ruta de infección (Dzoghbea *et al.*, 2021). En base a su patogenicidad y a su capacidad de ocasionar signos nerviosos o viscerales, las cepas del virus de la enfermedad de Newcastle fueron originalmente clasificadas como formas Doyle, Beach, Beaudette y Hitchner. Las cepas menos patogénicas: “entéricas asintomáticas” o “lentogénicas” inicialmente llamadas Hitchner, “mesogénicas” (inicialmente Beaudette), y “velogénicas”. Las cepas velogénicas fueron subclasificadas en “viscerotrópicas” (inicialmente Doyle; velogénicas viscerotrópicas NDV (VVNDV) o neurotrópicas (inicialmente Beach; velogénicas neurotrópicas NDV (VNNDV) (Cattoli *et al.*, 2011). El periodo de incubación varia de 2 a 15 días, con un promedio de 5 a 6 días. Las cepas lentogénicas ocasionan una leve infección respiratoria; las cepas mesogénicas causan una infección respiratoria con baja mortalidad y, las cepas virulentas un severo cuadro respiratorio, con edema alrededor de los ojos (Fig. 18), cianosis de la cresta, hinchazón de la cabeza y, en aves en producción, disminución o cesación de la postura (Miller y Koch, 2020; Koffi X *et al.*, 2021). Las cepas velogénicas neurotrópicas causan signos neurológicos tales como torticollis, opistotónos, parálisis de patas y alas, mientras que las cepas velogénicas viscerotrópicas causan diarrea de coloración verdosa (Koffi X *et al.*, 2021). Las aves ponedoras con múltiples vacunas, dependiendo del nivel de protección, pueden presentar una disminución en la producción de huevos, una semana después de la infección y alteración en la calidad externa e interna de los huevos (Miller y Koch, 2020). Aves sin protección inmune infectadas con cepas virulentas, manifiestan severa depresión a partir del segundo día post infección, pudiendo alcanzar 100% de mortalidad al tercer o cuarto día post infección. Se ha señalado que no existen signos clínicos patognomónicos de la ENC (Miller y Koch, 2020).



Figura 18. Diarrea verde y edema facial en pollos de engorde a 5 días después del desafío

Lesiones macroscópicas

Las cepas viserotrópicas ocasionan necrosis y lesiones hemorrágicas en los agregados linfoides del tracto gastrointestinal: mucosa del párpado, tonsilas cecales y placas de peyer y proventrículo (Fig. 19 y 20); además, se puede observar agrandamiento, congestión y aumento de tamaño del bazo, congestión y atrofia del timo. El sistema nervioso central no suele mostrar lesiones macroscópicas. En aves adultas en producción puede observarse peritonitis por huevo, atrofia de folículos ováricos y degeneración del oviducto; en aves protegidas con muchas vacunas las lesiones pueden pasar desapercibidas, (Miller y Koch, 2020; *Koffi X et al*, 2021). Las aves infectadas con cepas velogénicas neurotrópicas pueden mostrar una inflamación y hemorragia en tráquea, acompañada de una secreción de exudado purulento en los bronquiolos (Dzogbema *et al.*, 2021).



Figura 19. Lesiones macroscópicas de mucosas a nivel ocular, faringe, molleja, intestinos de pollos de engorde desafiados.



Figura 20. Lesiones macroscópicas de mucosas a nivel ocular, faringe, molleja, intestinos de pollos de engorde desafiados.

2.5.2 Lesiones histopatológicas

Las lesiones histopatológicas dependen y están asociadas a la distribución sistémica de los virus patogénicos. Los cambios histológicos observados en aves infectadas con cepas lentogénicas, son mínimos y de severidad leve, se ha observado proliferación de folículos linfoides en la lámina propia de la tráquea, Infiltración linfocítica, pérdida de cilios, metaplasia escamosa de la porción

proximal de la tráquea e hiperplasia de folículos linfoides en bazo y sacos aéreos. Contrariamente, los cambios histopatológicos observados en pollos infectados con las cepas velogénicas viscerotrópicas son muy severos, lo principal es la necrosis de los agregados linfoides distribuidos en el cuerpo, especialmente los asociados al intestino y bazo, que corresponden con las hemorragias observadas al examen anatomopatológico, de otro lado, y principalmente en los virus velogénicos neurotrópicos, se observan severas lesiones en el sistema nervioso central, manguito perivascular, mononuclear multifocal asociado a hipertrofia e hiperplasia del endotelio vascular, gliosis y necrosis multifocal de células de purkinge (Cattoli *et al.*, 2011; Miller y Koch, 2020).

2.6. DIAGNÓSTICO

Es esencial el diagnóstico rápido y temprano para la implementación de medidas de control inmediatas. Las herramientas de diagnóstico incluyen: el aislamiento viral, las pruebas serológicas (hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación, ELISA, virus neutralización), los ensayos de inmunofluorescencia y oro coloidal inmune y, las pruebas moleculares: PCR convencional, PCR en tiempo real, qPCR y LAMP Comparando los métodos de diagnóstico de la enfermedad de la enfermedad de Newcastle, el aislamiento viral es la estrategia estándar considerada como la prueba “Gold standard” para el diagnóstico del virus, siendo usado universalmente desde los inicios de 1960 (Alexander DJ. 2003).

2.6.1 Aislamiento viral

(

El aislamiento puede ser realizado a través de la inoculación de huevos embrionados libres de patógenos específicos “Specific Pathogens Free” (SPF), fibroblastos de embriones de pollo (CEFs), células de riñón de embrión de pollo (CEKs), líneas celulares HELA y líneas celulares Vero, entre estos las CEFs e la más frecuentemente usada, después del aislamiento del virus en huevos, siendo útil para predecir y controlar epidemias y, para el desarrollo de vacunas y drogas antivirales (Mao *et al.*, 2022).

Cuadro 9. Ensayos disponibles para el diagnóstico de ENC y propósito de uso¹ solo con métodos adecuados para ese fin. Fuente: WOA 2021

Método	Propósito de uso				
	Población libre de infección	Contribución en políticas	Confirmación de casos clínicos	Vigilancia, prevalencia de infección	Evaluación respuesta

		de erradicación			inmune vacunal
Detección del virus ENC					
Aislamiento viral	-	+	+++	+	-
PCR convencional y secuenciamiento	+	+	+++	+	-
PCR tiempo real	++	++	+++	+	-
Evaluación de respuesta inmune					
ELISA	+	++	-	++	++
HI	-	-	-	++	+++

+++ = recomendado para confirmar casos clínicos; ++ también es recomendado, pero tiene sus limitaciones; + = adecuado en circunstancias muy limitadas; – = no apropiado para este propósito.

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa;

ELISA = ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas;

HI = inhibición de la hemaglutinación.

2.6.2. Evaluación de la respuesta serológica

Las pruebas serológicas basadas en la interacción entre el antígeno y anticuerpos son una importante estrategia usada como primera línea de pruebas (Mao *et al.*, 2022). La respuesta serológica se relaciona con el estado inmunológico esperado de las aves analizadas, sin embargo, para una correcta interpretación de resultados, en lotes de aves vacunadas, es indispensable contar con la información del programa de vacunación y la historia clínica del lote (OIE, 2021). Pueden ser usadas hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación, ELISA y virus neutralización, sin embargo, las dos primeras son las rutinariamente usadas en el mundo, para detectar anticuerpos contra el virus de la ENC.

Prueba de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación: Es basada en la propiedad biológica del virus de aglutinar *in vitro* los glóbulos rojos de diferentes animales, principalmente de pollos (Figura 21), esta propiedad nos sirve para identificar la presencia del virus en suspensiones biológica, detectar sus anticuerpos maternos y humorales, sin embargo, otros agentes como el virus de Influenza aviar, también tienen la capacidad de aglutinar glóbulos rojos, por ello, la prueba de hemaglutinación por sí sola no puede dar un diagnóstico definitivo de presencia viral, siendo necesario bloquear la aglutinación usando un antisero conocido para inhibir la aglutinación y lograr la identificación definitiva del virus de la ENC (Brandon y Alexander, 2016; Mao *et al.*, 2022; WOA, 2021).

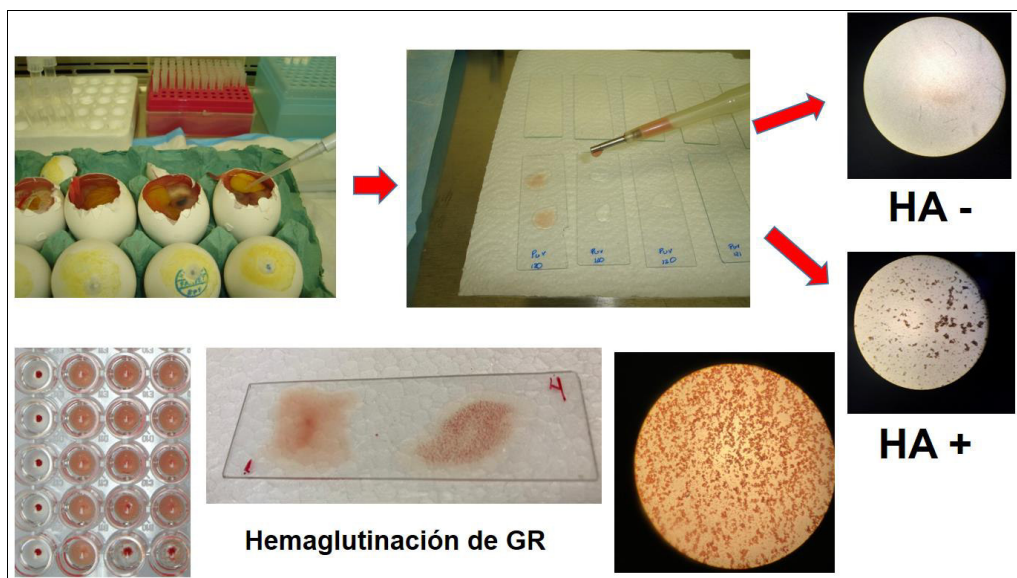


Figura 21. Hemaglutinación del fluido alantoideo de los embriones con aislamiento positivo al virus de la ENC.

La prueba de HA-HI también es usada rutinariamente para la titulación de anticuerpos en el suero de aves y determinar infección, respuesta inmune humoral a la vacunación o protección maternal.

En la prueba de HI se consideran títulos positivos cuando usando 4 unidades hemaglutinantes de antígeno (4UHA), se logra la inhibición del suero sanguíneo a una dilución de 1/16 o mayor (que equivale a 2^4 o $\log_2 4$ cuando se expresa como el recíproco). Algunos laboratorios prefieren usar 8UHA, esto debe ser indicado en el resultado WOA 2021.

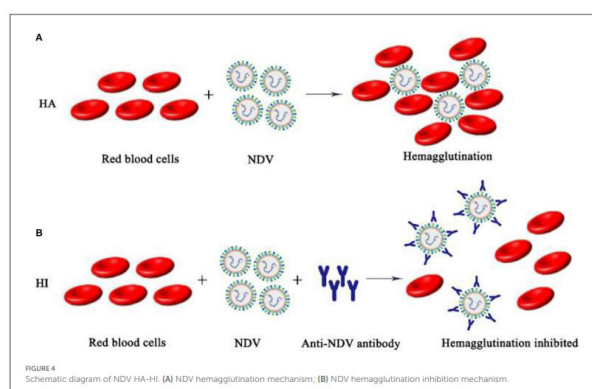


Figura 22. A: los mecanismos de hemaglutinación (HA) y B: de inhibición de la hemaglutinación del virus de la ENC. (Fuente: Mao et al., 2022).

Prueba de ELISA: La prueba de ELISA debe su nombre a las siglas en inglés “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”, y es basada en la detección cualitativa y cuantitativa de anticuerpos dirigidos contra la proteína HN, siendo altamente sensible y específica en detectar anticuerpos

específicos en suero sanguíneo, siendo ampliamente utilizada en la detección de anticuerpos contra el virus de la ENC (WOAH, 2021). Los resultados correlacionan con los obtenidos por HI. Varios tipos de ELISA han sido desarrollados para la detección de anticuerpos contra el virus de la ENC (Figura 23), existiendo disponibles varios kits comerciales que pueden ser utilizados en programas de vigilancia y evaluación de respuesta inmune (Brandon y Alexander, 2016). La desventaja de los ELISA convencionales solo sirven para las especies de aves donde se ha producido el anticuerpo secundario (WOAH, 2021).

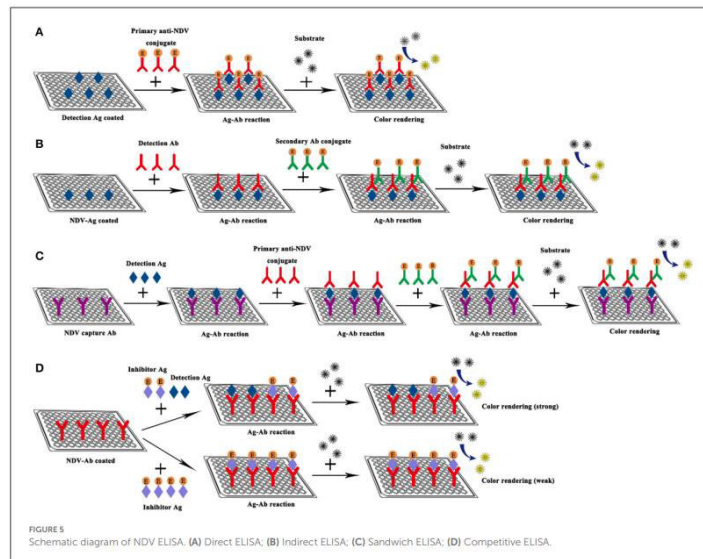


Figura 23. Representación esquemática de los tipos de ELISA, A: Directo B: Indirecto, C: Sandwich y D: Competitivo. (Fuente: Mao *et al.*, 2022).

2.6.3. Detección e identificación molecular del virus

Las reacciones cruzadas entre el virus de la ENC y otros paramixovirus aviaries, conduce a falta de confianza en los resultados que se obtienen con pruebas serológicas tradicionales, por lo tanto, los ensayos moleculares juegan un papel importante en la identificación del virus de la ENC y su diferenciación de otros patógenos relacionados (Higuchi *et al.*, 1992; Mao *et al.*, 2022), por ello, su uso para detección de APMV-1 en muestras clínicas se ha convertido en el método de elección en muchos laboratorios de diagnóstico, además, la RT-PCR y la secuenciación se utilizan para determinación de virulencia y para análisis filogenéticos (WOAH, 2021).

Las pruebas moleculares que pueden usarse en la detectar el ácido nucléico vel virus son: transcripción reversa seguida de-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) y amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Mao *et al.*, 2022).

Prueba de Transcriptasa reversa- Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR): Selecciona fragmentos de ARN in vitro, primero se realiza la transcripción inversa del ácido nucleico del virus (ARN), para sintetizar un cADN y luego realizar la amplificación por PCR. Es una prueba es una prueba de gran especificidad, rápida, sensible y simple. La secuencia procede del gen que codifica la proteína F y consta de 238 pb (WOAH, 2021; Creelan *et al.*, 2002).

El instituto de ciencias de India, (Desingu PA) desarrolló una nueva tecnología de RT-PCR basada en las características de hemadsorción del virus de la ENC, se agregan glóbulos rojos de pollo al sobrenadante de muestras clínicas para adsorber el virus en la superficie del glóbulo rojo, los glóbulos rojos que adsorben el virus se detectan RT-PCR. Este método aumenta 100 veces la sensibilidad que la extracción de ARN tradicional y que es útil para muestras que con baja carga viral (Creelan *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha reportado resultados de RT-PCR negativos en muestras fecales positivas al aislamiento viral, demostrando presencia de inhibidores en muestras clínicas, lo que demuestra que la prueba de RT-PCR es un buen complemento para el aislamiento en huevos embrionados por no puede reemplazarlo por completo (Creelan *et al.*, 2002).

qRT-PCR en tiempo-real: El desarrollo de la tecnología de tiempo-real qRT-PCR representa otro avance revolucionario en el campo del análisis del ADN. La ventaja del método es que se puede monitorear cuando ocurre el proceso de amplificación de ADN y genera una curva estándar para analizar cuantitativamente la muestra desconocida, además de su rapidez, alta sensibilidad y bajo número de falsos positivos. El ARN viral debe extraerse de muestras infectadas y agregarse a la mezcla de reacción para la amplificación (Creelan *et al.*, 2022; WOA, 2021), pudiendo utilizarse incluso para muestras fecales (Gohm *et al.*, 2000), La mezcla incluye colorantes fluorescentes, enzimas: transcriptasa inversa, ADN polimerasa, dNTP y cebadores específicos, a medida que el gen diana amplifica, aumenta la fluorescencia de la muestra. El CT representa el número de ciclos temperatura de PCR y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de cADN diana. La qRT PCR en tiempo real puede utilizar dos tipos de análisis químicos: sondas TaqMan o SYBR Green I. SYBR Green I es un colorante que se une a las moléculas de ADN de doble cadena, independientemente de la secuencia, este método es de bajo costo. Las sondas TaqMan son sondas de hidrólisis de alta especificidad, sensibilidad y reproducibilidad (Creelan *et al.*, 2022) (Fig. 24).

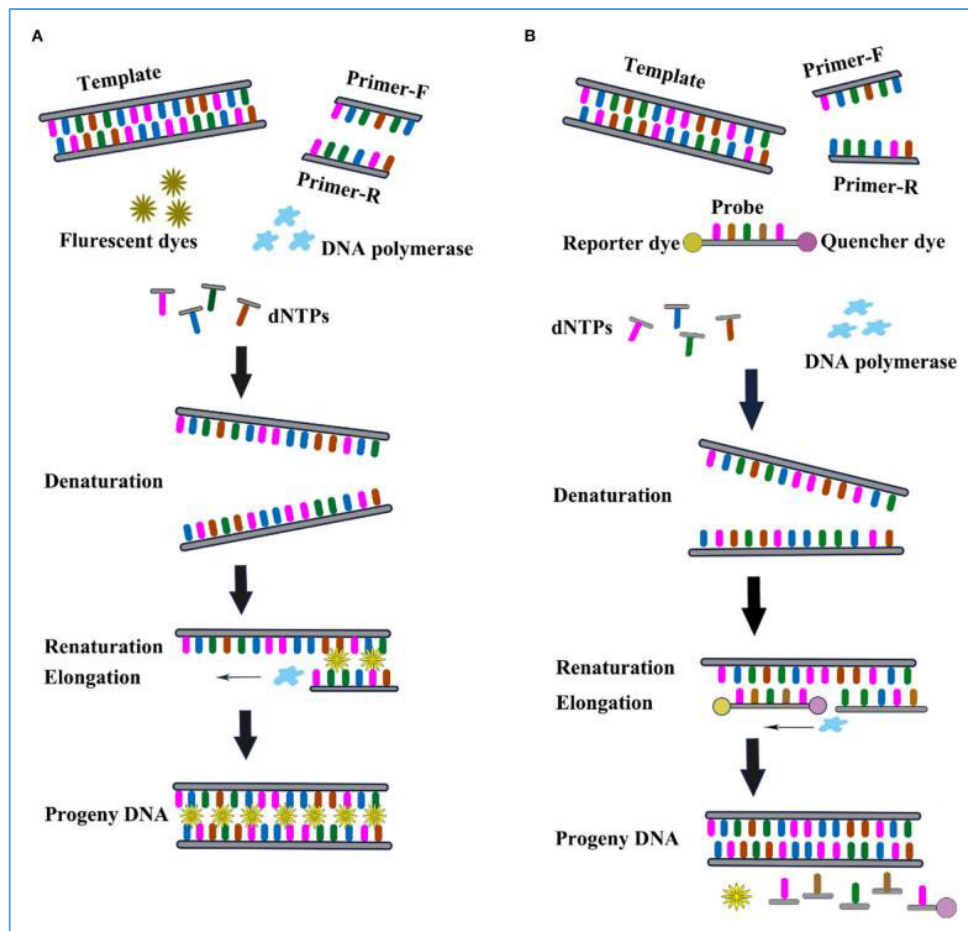


Figura 24. Representación esquemática de la prueba en tiempo real qRT PCR, A para ENC con SYBR Green y B: ENC con sondast TaqMan (Fuente: Creelan et al., 2002).

Algunos métodos de PCR en tiempo real diferencian la patogenicidad de los aislados analizando la curva de melting de alta resolución. La curva de disociación es resultado de la gradiente de temperaturas en la que el ADN se desnaturaliza cuando es sometido a una fuente de calor. Nos permite calcular la temperatura de disociación, la cual es variable de acuerdo con la secuencia de ADN (Ririe *et al.*, 1997). El empleo de moléculas fluorescentes que se unen al ADN de cadena doble en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación y detección simultánea de secuencias específicas de ADN en tiempo real. La PCR en tiempo real nos permite monitorear el gradiente de temperaturas que se aplica a una molécula de ADN lo que se conoce como curva de disociación, hasta que la molécula se desnaturalice y deje de emitir fluorescencia, a partir de estos datos podemos obtener la temperatura de disociación, la cual puede variar debido a la presencia de moléculas de guanina y citosina, esto nos permite identificar y caracterizar la presencia de amplicones con pequeñas diferencias en su secuencia. (Higuchi *et al.*, 1992).

Secuenciamiento de genes: Aun cuando la RT-PCR en tiempo real constituye un método muy útil para el diagnóstico y vigilancia de virus de la ENC, actualmente cada vez es más utilizado el secuenciamiento (WOAH, 2021). La metodología de secuenciamiento Sanger, ha sido usada desde hace muchos años y aún se continúa usando, este método permite en pocas horas, el análisis del gen F que determina el genotipo del virus y su virulencia. Sin embargo, con la tecnología de secuenciamiento de alto rendimiento y utilizando herramientas bioinformáticas, es posible realizar un análisis más amplio de los principales genes como los de neuraminidasa, fusión o HN, o el genoma completo; las secuencias obtenidas pueden ser comparadas con las secuencias disponibles en el banco de genes permitiendo conocer el origen del virus y el parentesco con otros de la región o de otras regiones por filogenia (WOAH, 2021).

El secuenciamiento de nueva generación (NGS), se refiere a la tecnología diseñada para para el análisis masivo de grandes cantidades de ADN, permite la lectura de millones de secuencias de ADN usando un panel de genes o un genoma completo, a bajo costo (Valderrama *et al.*, 2020). El desarrollo de esta técnica ha subsanado algunas desventajas de los métodos precedentes permitiendo la secuenciación directa del ARN, y obtener lecturas de mayor tamaño sin necesidad de amplificaciones previas de las muestras (Bashir M *et al.*, 2018). Sin embargo, para interpretar los resultados es necesario el análisis bioinformático hecho por parte de profesionales experimentados (Valderrama *et al.*, 2020). Nuevos métodos de secuenciamiento están siendo desarrollados, que ofrecen una más potente herramienta porque permiten detectar y secuenciar simultáneamente muestras clínicas a nivel de laboratorio o bajo condiciones de campo, como es el caso de la tecnología de nanopore, (WOAH, 2021). Era una necesidad detectar el virus y predecir su virulencia con la mayor rapidez posible, sin embargo la gran diversidad genética y evolución viral existentes han sido un impedimento para ello; durante los últimos años el secuenciamiento de tercera generación, incluyendo la tecnología introducida por Oxford Nanopore Technologies, constituye una herramienta muy útil para la vigilancia y caracterización de los virus en general, la secuenciación de amplicones usando el 1D MinION en muestras de aislados en huevos embrionados o hisopados clínicos de campo, ha permitido identificar a la vez genotipo y virulencia con resultados comparables a los obtenidos con el Illumina Miseq (Butt SL *et al.*, 2018).

2.6.4. Pruebas para determinar la patogenicidad viral

Las cepas del virus de la ENC difieren grandemente en su patogenicidad, por otro lado, el masivo uso de vacunas a virus vivo con cepas de baja virulencia, estos dos factores, hacen imprescindible que se determine la patogenicidad de los aislados del virus en el laboratorio. Varias

pruebas han sido desarrolladas para diferenciar la patogenicidad de las cepas, el tiempo de muerte del embrión, el índice de patogenicidad intracraneana, el índice de patogenicidad intravenosa y el índice de patogenicidad intraoal constituyen las pruebas biológicas más comunes; por otro lado, PCR y secuenciamiento son actualmente pruebas moleculares muy usadas con el mismo fin (Brandon y Alexander, 2016).

El método biológico más aceptado para la medición de virulencia es el Índice de Patogenicidad Intracraniana (IPIC), por ser el de mejor precisión y sensibilidad, (Dortmans *et al.*, 2011). La prueba utiliza pollos SPF de 1 día de edad, inoculados intracranalmente con el fluido alantoideo positivo al virus, los rangos van de 0.0, para los virus avirulentos a 2, para los más virulentos; las cepas lentogénicas tienen un IPIC menor a 0.7; las cepas mesogénicas tienen un valor igual o mayor a 0.7 y hasta 1.5; y, los virus velogénicos tienen un IPIC mayor a 1.5 (Miller y Koch, 2020; Bergfeld, 2017).

La prueba de RT-PCR es el método de rutina usado para la exportación, determinar el estado libre, además de ser la que tiene el mayor comercial, sin embargo, muchas de las pruebas con este fin, utilizan las regiones más conservadoras como el gen de la Matriz, no permitiendo determinar genotipo ni virulencia (citado por Butt SL *et al.*, 2018). Otras pruebas moleculares han sido desarrolladas como la de Wise *et al.*, 2004, quienes implementaron una prueba de RT-PCR que analiza un producto de 1195 pb de los genes de interés F y M, amplificando una región conservada del gen M para detectar todas las cepas de Orthoavulavirus 1, y, oligonucleótidos de una región del sitio de escisión del gen F para detectar a la vez la el ácido nucleico viral y determinar su patogenicidad.

2.7 PREVENCIÓN Y CONTROL

El principal objetivo es prevenir que las aves susceptibles se infecten, evitando introducir el virus en una población de aves susceptibles, lo cual se logra con estrictas medidas de bioseguridad a nivel de granja. Con ese fin, son implementados estrictos procedimientos de limpieza y desinfección y, protocolos de bioseguridad para el control de personas, vehículos, plagas y residuos, a todos los niveles del proceso productivo. Las medidas de bioseguridad también deben ser aplicadas a las crías de aves de traspatio. La segunda estrategia está orientada a disminuir el número de aves susceptibles mediante la vacunación (Miller y Koch, 2020).

2.7.1. Vacunación

La vacunación en combinación con estrictas medidas de bioseguridad, constituyen las herramientas fundamentales de prevención de la enfermedad, las vacunas tienen como principal objetivo inducir una respuesta inmune rápida y duradera para prevenir la enfermedad fatal en un huésped susceptible. La vacunación no evita la infección, pero tiene como objetivo reducir el impacto sanitario de la enfermedad, previniendo o disminuyendo las pérdidas por mortalidad, incrementa la resistencia a la infección y reduce la eliminación viral en las aves infectadas, de esta manera controla la diseminación del virus en los lotes infectados (Miller y Koch, 2020). En el Perú y en muchos países de Latinoamérica donde la enfermedad es endémica, existen reglamentos de control y prevención de la enfermedad, que obligan a la vacunación de todas las aves domésticas de crianza industrial y de traspatio, principalmente pollos y pavos (SENASA, 2003; OIRSA, 2015; ICA, 2012). Desde 1993, fue regulado por la Unión europea que las cepas de virus usadas como vacunas deben tener un IPIC menor o igual a 0.4 o 0.5. La comisión de estándares biológicos de la OIE establece que el virus debe tener un IPIC menor 0.7, pero para incrementar el margen de seguridad, el IPIC de la semilla madre no debe ser mayor a 0.4 ((Miller y Koch, 2020). La semilla del virus para una vacuna inactivada debe tener un IPIC menor a 0.7 (Orsi *et al.*, 2009). Por otro lado, la evaluación del IPIC de vacunas comerciales con cepas lentogénicas en Brasil, dieron resultados variables entre laboratorios (Orsi *et al.*, 2009), se demostró la variabilidad en el IPIC vacunal de diversas cepas lentogénicas B1 y La sota, sin embargo, esta variabilidad no interfirió con la respuesta inmune, porque todas las vacunas fueron del tipo no virulentas, lentogénicas, pero proporcionaron una protección similar (Cuadro. 10)

Cuadro 10. Índice de patogenicidad de vacunas comerciales contra la Enfermedad de Newcastle de diferentes laboratorios, con cepa La sota, B1, Ulster, VG-GA, Clone 30 y C2.

Vacunas comerciales Cepa La sota			Vacunas comerciales Cepa B1			Vacunas comerciales		
Laboratorio	IPIC	MDT	Laboratorio	IPIC	MDT	Cepa	IPIC	MDT
1	0.23	92	1	0.03	104	Ulster	0	>150
2	0.37	96	2	0.13	104	VG-GA	0.03	140
3	0.10	116	3	0	116	Clone 30	0.11	104
4	0.02	116	4	0.11	116	C2	0.04	>144
5	0.37	104	5	0.19	116	Ulster	0	>150
8	0.32	116	7	0.09	104			
Estándar	0.40	103	Estándar	0.20	120			

Fuente: adaptado de Orsi *et al.*, 2009.

Tipos de vacunas: Las vacunas a virus vivo y/o inactivado se han usado durante muchas décadas para el control de la enfermedad de Newcastle, las vacunas vivas conteniendo cepas no virulentas del tipo lentogénicas como B1 y la sota, logran proteger de la enfermedad de Newcastle, sin embargo, algunas veces, son capaces de causar una reacción respiratoria y reducir el rendimiento productivo (Butcher *et al.*, 2002).

Las vacunas vivas estimulan la inmunidad sistémica y local del tracto respiratorio, sin embargo, después de una vacunación primaria con solo una vacuna viva, la respuesta humoral de anticuerpos suele ser baja, aun cuando las aves puedan estar protegidas gracias a la inmunidad mediada por células inducida a nivel del tracto respiratorio. En el caso de aves adultas bajo condiciones de campo, las vacunas inactivadas en emulsión oleosa, administradas a aves previamente vacunadas con vacunas viva, inducirán una protección completa, incluyendo una disminución en la contaminación del virus en el huevo (Sà M *et al.*, 2016). También han sido desarrolladas nuevas estrategias de vacunación contra la enfermedad de Newcastle, vacunas recombinantes, virosomas, vacunas de subunidad y de genética reversa han logrado mejorar la protección contra la ENC que las vacunas convencionales (Abozeid, *et al.*, 2019; Miller y Koch, 2020). Además, que, en los últimos años, el virus de la enfermedad de newcastle, se ha convertido en un prometedor vector vacunal contra patógenos humanos y veterinarios (Kim SH, Samal SK., 2016).

Para el control de la enfermedad de Newcastle, se consideran imprescindibles dos componentes, la implementación de estrictas medidas de bioseguridad para evitar que las aves sean expuestas al virus virulento en campo y, la adecuada aplicación de vacunas que induzcan una efectiva protección. Por otro lado, son tres los principales objetivos que tiene la vacunación: disminuir o evitar el impacto patológico de la enfermedad, disminuir la eliminación viral e incrementar la dosis necesaria para causar infección (Dimitrov KM *et al.*, 2017). Las vacunas a virus vivo y/o inactivado se han usado durante muchas décadas para el control de la enfermedad de Newcastle, las vacunas más usadas son las vacunas vivas preparadas con cepas de baja virulencia como la cepa B1, La sota y VG/GA, aisladas entre los años 1940 y 1960, siendo todas genética y antigénicamente muy relacionadas entre ellas (Dimitrov KM *et al.*, 2017), se considera que la las vacunas en base a cepa La sota son capaces de causar una reacción respiratoria post vacunal y reducir el rendimiento productivo (Butcher *et al.*, 2002), además de ser más termolábiles, por ello son más usadas en países donde el virus virulento es endémico, contrariamente la cepa B1, mas atenuada es usada en zonas de bajo desafío o en aves a muy temprana edad (Dimitrov KM *et al.*, 2017).

Otro aspecto importante relacionado con la inmunoprotección, es que aun cuando las cepas del virus de la ENC han sido clasificadas en genotipos, estas pertenecen a un solo serotipo, por ello son ampliamente usadas vacunas con cepas lentogénicas heterólogas de genotipo, las cuales han demostrado inducir protección, disminuyendo o evitando el impacto de la mortalidad y signos clínicos de la enfermedad causada por las cepas virulentas, sin embargo, se ha demostrado que las vacunas preparadas en base a genotipos homólogos al virus que circula en campo, reducen significativamente a excreción viral en comparación con las vacunas tradicionales heterólogas, contribuyendo a un mejor control de brotes de la ENC al reducir la diseminación horizontal del virus que eliminan las aves infectadas (Miller PJ *et al*, 2007). Se ha atribuido que parte de las fallas en los programas de vacunación se debe a la presencia de anticuerpos maternos que interfieren con la replicación del virus vivo vacunal, afectando la respuesta inmune. Se ha demostrado protección contra el desafío con virus virulento con la aplicación in ovo a huevos embrionados de 18 días que poseen altos títulos de anticuerpos maternos contra el virus de la ENC, de una vacuna recombinante que usa como vector al virus de la ENC conteniendo una secuencia antisentido de interleucina aviar 4, con este método se logró la protección completa temprana, evitando la mortalidad embrionaria que la cepa La sota cuando es aplicada in ovo (Dimitrov KM,*et al*, 2021)

La vacunación de grandes poblaciones de aves es usualmente llevada a cabo usando vacunas vivas no virulentas, obteniéndose una muy variable respuesta inmune individual en las aves vacunadas (Miller y Koch, 2020); esto ha motivado a hacer estudios para saber si los virus virulentos son capaces de diseminarse en una población heterogéneamente vacunada (Van Boven *et al.*, 2008). Es así que para determinar si los lotes de aves están en riesgo de sufrir brotes de la enfermedad, se usó el concepto de “inmunidad de rebaño”, la teoría epidemiológica, considera que una población está protegida contra la epidemia, por el número de reproducciones del agente infeccioso en poblaciones con alto o bajo nivel de protección después de la vacunación; es así que, la ocurrencia de un brote después de la introducción primaria de un agente infeccioso en una población, está determinado por el número de reproducción básico (R), que representa, el número de infecciones secundarias causadas por un individuo infectado en una gran población, en la primera etapa del brote; si el número de reproducción R , supera el umbral de 1, es posible una reacción en cadena de eventos de infección y que ocurra una epidemia, si el valor de R esta debajo de 1, no ocurrirá un brote importante (Van Boven *et al.*, 2008).

III. MATERIALES Y METODOS

El estudio está conformado por dos ensayos, el Ensayo A comprendió la detección viral de paramixovirus aviar en aves silvestres residentes y migratorias de la costa peruana durante los años 2007 al 2022, para determinar si estas aves eran portadoras de virus patogénicos de la ENC y, su caracterización genética y patogénica de los aislados obtenidos. El ensayo B caracterizó genética y patogénicamente los aislados de Paramixovirus aviar de casos de aves domésticas remitidos al LPD con fines de diagnóstico. El estudio analizó la relación entre los aislados obtenidos de aves silvestres y domésticas, para determinar el rol de las aves silvestres como reservorios y fuentes de contaminación de virus patógenos de la ENC para las aves domésticas de crianza tecnificada y de traspatio. Además, el estudio incluyó el secuenciamiento del genoma completo de nueve aislados de aves domésticas y silvestres para analizar posibles modificaciones del genoma y eventos de evolución viral.

3.1 ENSAYO A: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE PARAMIXOVIRUS AVIAR EN AVES SILVESTRES DEL PERU.

Objetivos:

1. Determinar si las aves silvestres migratorias y residentes de la costa peruana son portadoras de virus de la familia Paramixoviridae,
2. Determinar la patogenicidad de las cepas aisladas de aves silvestres.
3. Identificar el genotipo viral al que pertenecen las cepas aisladas de aves silvestres.

3.1.1 Lugar de ejecución

El ensayo A se inició con la colección de muestras de heces frescas de aves silvestres que habitan las áreas más importantes de concentración de aves migratorias y residentes de seis humedales de la costa peruana (Cuadro 11), dichos humedales forman parte del corredor biológico del Pacífico, que se encuentra próximo a las granjas de avícolas ubicadas cercanas a la playa del litoral. Estas áreas sirven como áreas de descanso y alimentación de aves que llegan principalmente desde el continente americano y desde los Andes (Lannacone *et al.*, 2010). Los humedales incluidos en el estudio se detallan a continuación.

Los Pantanos de Villa: Se localizan en el distrito de Chorrillos, departamento de Lima, la capital del Perú (12°12' LS 76° 19' LW) y, constituyen una importante zona reservada de refugio de aves

silvestres migratorias y residentes, los Pantanos de Villa se establecieron como área natural protegida en 1989, siendo reconocidos como sitio RAMSAR mediante resolución ministerial NI 00144-89-AG/DG (Lannacone *et al.*, 2010).

Las lagunas de Puerto Viejo: Están conformadas por dos lagunas que constituyen área de descanso de aves migratorias, están ubicadas en los distritos de San Antonio de Mala y Chilca, provincia de Cañete, departamento de Lima, a la altura del kilómetro 71 de la Panamericana Sur (12°34S y °42' W). Las lagunas albergan más de 60 especies de aves silvestres, siendo las más importantes la gallareta *Fulica ardeisaca* y la polla de agua *Gallinula chloropus* (INRENA, 2007).

Laguna Paraíso: Ubicados a la altura del km 140 de la Panamericana Norte, Huacho. Geográficamente se encuentra entre los paralelos 11°13'- 11°10' S; y los meridianos 77°36'- 77°35'W. Se reporta que habitan en este lugar 81 especies de aves silvestres, siendo la *Gallinula chloropus* “polla de agua” y *Fulica Ardesiaca* “gallareta” las especies más abundantes, pero también habitan las de las familias Scolopacidae, Ardeidae, Laridae, Anatidae, Charadriidae y Columbidae (Cruz Z y col, 2007).

Albufera de Medio Mundo: Ubicada en el distrito de Vegueta, provincia de Huaura a la altura del km 175 de la Panamericana Norte. GeoGráficamente se encuentra entre las coordenadas 10°56' de latitud sur y 18°15' de longitud oeste. En la Albufera viven numerosas especies de aves silvestres residentes y migratorias, siendo las más numerosa la garza real, pero también se encuentran patos colombianos, gallaretas, cormoranes y zambullidores entre otros (Criales, 2014).

Playa de Piura:

Los humedales de Sechura en Piura son un área ecológica con una gran biodiversidad de fauna silvestre, dentro de ellos, el estuario de Virrilá, que se encuentra en el distrito de Sechiura a 78 Km de la ciudad de Piura habiendo sido reconocido como lugar Ramsar del Perú. En Virilá habitan una diversidad de especies de aves migratorias y residentes, algunas procedentes de Norteamérica y otras del sur: islas galápagos y Chile. (Céspedes C, 2005).

Playa Chancay

La playa de chancay se encuentra ubicada a 78 kilometros al norte de Lima, en el distrito de Huaral del departamento de Lima. No es considerada una reserva natural de principal

importancia, pero ahí se encuentran muchas especies de aves migratorias y residentes en cercanía a granjas avícolas de aves de crianza tecnificada.

3.1.2 Animales

Fueron colectadas un total de 6393 muestras de heces frescas de aves silvestres de seis humedales de la costa peruana, durante los años: 2007(401), 2008(1136), 2009(900), 2010(1260), 2012(731), 2020(475) y 2021-2022(1490). Las muestras proceden de 22 especies diferentes de aves silvestres. Los humedales incluidos en el estudio y las especies de aves analizadas se detallan en los Cuadros 11 y cuadro 12.

Cuadro 11. Humedales de la costa peruana incluidas en el monitoreo

Humedal	Ubicación	Provincia	N° muestras
Lagunas de Puerto Viejo	San Antonio de Mala	Cañete	1496
Pantanos de Villa	Chorrillos	Lima	300
Laguna Paraíso	Huacho	Huaura	600
Albufera medio mundo	Vegueta	Huaura	1840
Playa Chancay	Huaral	Chancay	1190
Playa de Piura	Piura	Piura	967
Total			6393

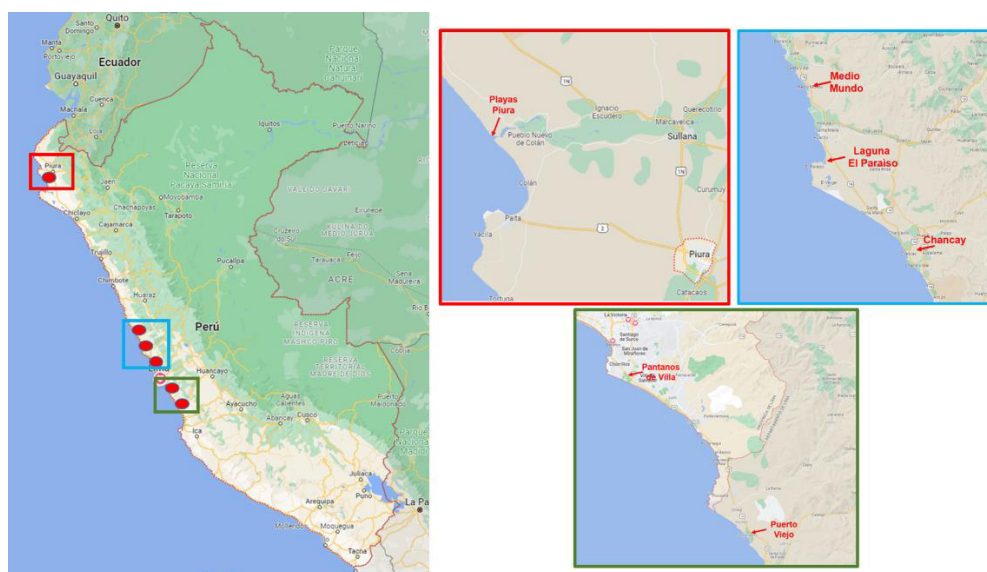


Figura 25. Ubicación de humedales de la costa peruana incluidos en el estudio

Cuadro 12. Especies de aves silvestres comprendidas en el estudio

Nombre común	Nombre científico	Porcentaje (%)
Ostrero negro	Haematopus ater	0.8
Garcita	Egretta thula	3.6
Zarapito trinador	Numenius phaeopus	0.4

Gaviota peruana	Larus belcheri	8.8
Gaviota gris	Larus modestus	3.1
Ostrero americano	Haematopus palliatus	5
Vuelvepiedra	Arenaria interpretes	0.6
Gaviota dominicana	Larus dominicanus	0.4
Gaviota de capucha gris	Chroicocephalus cirrocephalus	0.6
Gallineta común	Gallinula chloropus	8.4
Cormorán neotropical	Phalacrocorax brasilianus	20.1
Chorlo gritón	Charadrius vociferus	1.5
Garza blanca grande	Ardea Alba	6.1
Pato gargatilla	Anas bahamensis	5.4
Siete colores	Tachuris rubrigastra	0.4
Gaviota de Franklin	Leucophaeus pipixcan	13.4
Pelicano peruano	Pelecanus thagus	10.5
Pato colorado	Anas Cyanoptera	6.5
Pato silvestre	Anas platyrhynchos	2.5
Pato zambullidor grande	Oxiura ferruginea	0.4
Chorlo gris	Pluvialis squatorola	0.2
Columbidae	Columba palumbus	
	Euphelia cruziana	1.3

3.1.3. Colección de muestras

En aves silvestres, la muestra biológica consistió en heces frescas, las muestras fueron colectadas de aves encontradas en los humedales naturales o artificiales y zonas adyacentes a las playas de la costa, con la finalidad de encontrar un mayor número de aves, la colecta se realizó en las primeras horas de la mañana, iniciando la colecta al amanecer entre 6 a 8 de la mañana. Se esperaba la llegada de aves conformadas por una sola especie, se observaba a cierta distancia cuidando de no ahuyentarlas, se fotografiaba e identificaba la especie; las heces frescas se colectaban del suelo inmediatamente las aves se retiraban, fueron colectadas solo heces frescas libres de tierra, arena u otro material contaminante que pudiese alterar o interferir con el aislamiento. Para la colecta se utilizaron hisopos estériles, colocados en tubos de transporte viral UTM, rotulados y transportados al laboratorio a 4°C para ser conservados a -20°C hasta su procesamiento. Las muestras fueron analizadas en pools de 10, de encontrarse un pool positivo, este fue analizado nuevamente por separado.

El procedimiento de colecta de muestras se muestra en la figura 26. El protocolo ha sido aprobado por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la Facultad de Medicina

Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Autorización N° 2021-33), así como en base al acuerdo de colaboración (NCRADA-NAMRU-6-18-10410) con el Naval Medical Research Unit N°6 (NAMRU-6).

Aislamiento e identificación viral

Todas las 6393 muestras de heces frescas de aves silvestres fueron inoculadas para el aislamiento viral en huevos embrionados SPF, libres de patógenos específicos de 1° día de edad, inoculados vía cavidad alantoidea. Todo el trabajo fue realizado en una cabina de bioseguridad II del área de aislamiento viral y siguiendo los protocolos de bioseguridad del LPA.

El procedimiento realizado fue el descrito en el Manual de aislamiento de virus aviares de la American Association of Avian Pathologists (AAAP), (*Wakenell PS et al, 2016*), tal como se detalla a continuación:

- a) Las muestras fueron colectadas en tubos UTM, re suspendidas en PBS y homogenizadas en un vortex aproximadamente durante 15 segundos.
- b) Se colectaron 500 uL de cada una de 10 muestras de una misma especie de ave, para ser trabajadas en pool/volumen de 5 mL. Los pools positivos fueron analizados nuevamente en forma individual.
- c) Se procedió a centrifugar los tubos a una velocidad de 100g/10'.
- d) Se colectó el sobrenadante y se añadió una solución conteniendo gentamicina 50 ug/mL, micostatina 1000 unit/mL. 1000 U/mL Penicillin G, 1 mg/mL Streptomycin y 10 µg/mL amphotericin B,
- e) Las muestras fueron incubadas por 3 horas a 4°C, filtradas a través de filtros millipore de 0.22 um, para finalmente inocular 0.2 mL del filtrado a los embriones vía saco alantoideo en el punto de inoculación previamente identificado y desinfectado con alcohol yodado.
- f) Los huevos fueron sellados con parafina e incubados a 37°C durante 5 días
- g) Los embriones fueron examinados diariamente al ovoscopio, registrándose el tiempo de muerte posterior a la inoculación y la identificación de la muestra.
- h) Los embriones muertos antes de los 5 días fueron mantenidos en refrigeración hasta la evaluación final. Los embriones sobrevivientes fueron sacrificados por enfriamiento a 4°C durante 24 horas.
- i) Prueba de hemoaglutinación (HA): El virus hemaglutina los glóbulos rojos de ave, por ello la prueba de HA se realiza como primer indicador de presencia viral en el fluido alantoideo de los embriones inoculados con la muestra sospechosa.

- j) Preparación de la solución de Glóbulos rojos al 0.7%: Se colectò 5mL de sangre de la vena alar de un ave SPF mayor a 40 días, en un tubo estéril con 1mL de anticoagulante (EDTA), se mezclò con cuidado y centrifugó por 5 minutos a 1200 rpm, se descartò el sobrenadante. Se lavaron los glóbulos rojos con solución salina, mezclando cuidadosamente para luego centrifugar por 5 minutos a 1200 rpm. Se repitió tres veces hasta que el sobrenadante se volvió claro. Se preparó la solución con 0.7 mL de glóbulos rojos y luego completando hasta 100 mL con solución salina.
- a) Con el uso de una pipeta estéril, se colocó 45 uL del fluido alantoideo de los embriones en una lámina porta objetos, luego se adicionó 45uL de la solución de glóbulos rojos al 0.7%. Inmediatamente se homogenizó y mezclò por dos a tres minutos hasta visualizar o no los grumos de aglutinación de los glóbulos rojos por el antígeno viral.
- k) Las muestras con hemaglutinación positiva, fueron analizadas por inhibición de hemaglutinación, enfrentándolas con un suero de referencia conteniendo anticuerpos contra el virus de la ENC. Fueron consideradas positivas a presencia de Paramixovirus aviar, las muestras positivas a la inhibición de la hemaglutinación (IHA). Las muestras negativas a la prueba de IHA fueron analizadas para determinar la presencia de virus de Influenza aviar usando una prueba comercial inmunocromatográfico de detección de antígeno, QUICKVUE® INFLUENZA TEST. Las muestras con hemaglutinación negativa fueron analizadas en un segundo pasaje antes de ser descartadas.

3.1.4. Determinación de patogenicidad y genotipo viral de aves silvestres.

La evaluación de patogenicidad de las cepas aisladas se realizó por la prueba biológica de Índice de patogenicidad intracraneana (IPIC). La determinación del genotipo de los aislados se basó en la amplificación de la secuencia nucleotídica parcial o completa del gen Fusión (F).

Prueba biológica: Índice de patogenicidad intracraneana (IPIC)

La prueba de IPIC fue realizada con pollos SPF de 1 día de edad, los mismos que fueron inoculados con las muestras confirmadas positivas a AMPV-1 por HA e IHA. Se confirmó que el fluido tenga un título > a 1:16, y que sea libre de Influenza A analizándolo en una prueba rápida inmunocromatográfica que detecta el antígeno del virus de Influenza A y, libre de bacterias y hongos por cultivo en agar sangre y agar abouraud. El protocolo se detalla a continuación:

- El fluido diluido en solución salina estéril y sin antibióticos fue inoculado con 0.05 mL intracerebralmente en 10 pollitos SPF de 1 día de edad.
- Cada una de las aves fue examinada diariamente durante 8 días a partir de la inoculación.
- Fue asignado un score de 0: si normales, 1: si enfermas y, 2: si muertas.

- Las aves muertas fueron diariamente registradas con el grado 2 hasta finalizar los 08 días de la prueba.
- El IPIC es la puntuación media por ave por observación durante 8 días.
- Los rangos de patogenicidad oscilan entre 2 (los más virulentos) y 0 (los avirulentos).
- Los valores ≥ 0.7 indican virus patógeno.
- Se asigna el score 0 cuando las aves se muestran aparentemente normales, score 1 cuando muestran cualquier signo clínico (nervioso, depresión, dificultad respiratoria o postración) y se asigna un score de 2 si el ave se encuentra muerta

Técnicas moleculares usadas en la identificación de muestras de aves silvestres:

El aislamiento viral en embriones de pollo SPF, determinó que los 31 aislados fueron del tipo no virulento por el tiempo de muerte del embrión. Posteriormente, 17/31 aislados fueron seleccionados para:

Para confirmar patogenicidad por RT-PCR:

- Nueve cepas aisladas del 2007 al 2009, fueron analizadas amplificando porción del gen de fusión por RT-PCR (Wang Z *et al.*, 2001)

Identificar el genotipo en base a la secuencia del gen F o del genoma completo:

- Seis cepas aisladas del 2007 al 2009 fueron sometidas al análisis de la secuencia completa del gen Fusión (Diel *et al.*, 2012).
- Dos genomas completos de aislados de aves silvestres del año 2022 analizados.

Amplificación del gen de fusión por RT-PCR:

El fluido alantoideo de las muestras positivas al aislamiento viral en los embriones SPF inoculados, fue centrifugado a 4000 g por 5 minutos. El ARN viral fue extraído de 140ul del sobrenadante usando un kit comercial de extracción de ARN (QIAGEN, Alem), siguiendo las instrucciones del fabricante y disuelto en 50uL de agua de ultra calidad, estéril libre de RNasa.

Nueve muestras aisladas entre los años 2007 al 2009, fueron analizadas por la prueba de RT-PCR, adaptada según el protocolo descrito por que usa una prueba triple de un solo paso que amplifica una región del gen F y que permite simultáneamente identificar al virus y determinar si es virulento o no (Wang *et al.*, 2001).

Para la amplificación fueron usados tres sets de primers específicos sintetizados por Gibco BRL; usa primers que hibridizan y amplifican todas las cepas de Paramixovirus aviar -1 (ALLs y ALLe) y, primers que hibridizan y amplifican con las cepas virulentas y avirulentas (VLte y AVLe, respectivamente). Los resultados de PCR positivo con los primers ALLs & ALLe indican

presencia del virus de ENC. Positivo con los primers ALLs & VLTe indican cepa virulenta y, positivo con los primers ALLs & AVLe indican cepa avirulenta (Cuadro 13).

Cuadro 13: Primers específicos para virus de la Enfermedad de Newcastle

Primer	Secuencia (5'-3')	Sitio de hibridización en el gen F	Amplicon (pb): ALLs
ALLs	TTGATGGCAGGCCTCTTGC	141-159	
ALLe	GGAGGATGTTGGCAGCATT	503-485	ALLe: 362
VLTe	AGCGT(C/T)TCTGTCTCCT	395-380	VLTe:254
AVLe	G(A/G)CG(A/T)CCCTGT(C/T)TCCC	395-380	AVLe: 254

(Fuente: Wang *et al.*, 2001)

Para la reacción fue usado un buffer Promega RT (1x; 50 mM Tris-HCl pH 8.3 a 25°C, 50 mM KCl, 10mM MgCl₂, 0.5 espermidina, 10 mM DTT), el que fue añadido a una mezcla de 1uL de AMV Rtase (8 unidades/ul), 1uL de DyNaZYME polimerasa (5 unidades/ul), 0.5 uL dNTP (10mM nucleotide mix, Gibco BRL), 3 unidades de inhibidor de RNase (HPRI, Amersham), 20 pmol de cada uno de los primers ALLs y ALLe juntamente con 5 uL del ARN viral aislado. La reacción fue llevada a cabo en un equipo Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 como sigue: Inactivación de la RTase a 94°C por 2'. La amplificación fue realizada en 25 ciclos de 94°C/30s, 50°C/30s y 72°C/30s y, un paso final de 5 minutos de elongación a 72°C. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y visualizados con bromuro de etidio.

Determinación del genotipo del virus de la ENC basado en la secuencia nucleotídica del gen Fusión (F).

Para la determinación del genotipo se usó un protocolo que analiza la secuencia del gen de fusión completo y que permite identificar el genotipo de todas las cepas de Orthoavulavirus-1 (Diel *et al.*, 2012). Las cepas primero fueron propagadas en embriones de pollos libres de patógenos específicos (SPF), el ARN fue extraído del fluido alantoideo con trisol LS siguiendo las

instrucciones del fabricante (Invitrogen, CA). Para la amplificación se usó un set de primers específicos del gene F:

Primers	Secuencia	Posición en el genoma
F1 (Forward)	TTGCTTATAGTTAGTTCGCCTGTC	4463 4485
F2 (Reverse)	ACCCGTGTATTGCTCTTTGG	6313 6332

Los productos fueron enviados a MacroGen para su secuenciación (Sanger). Se realizó la revisión y ensamblaje de los segmentos del gen F usando el programa “DNA Baser”; se realizó el alineamiento múltiple de las secuencias usando el programa “Clustal X”; se compararon las secuencias con las usadas por Diel *et al.* (2012); se realizó el análisis filogenético de los aislados usando el programa “Mega” por Neighbour-Joining.

El procedimiento de colecta de muestras, y procesamiento de las mismas se ilustra en la Fig 25.

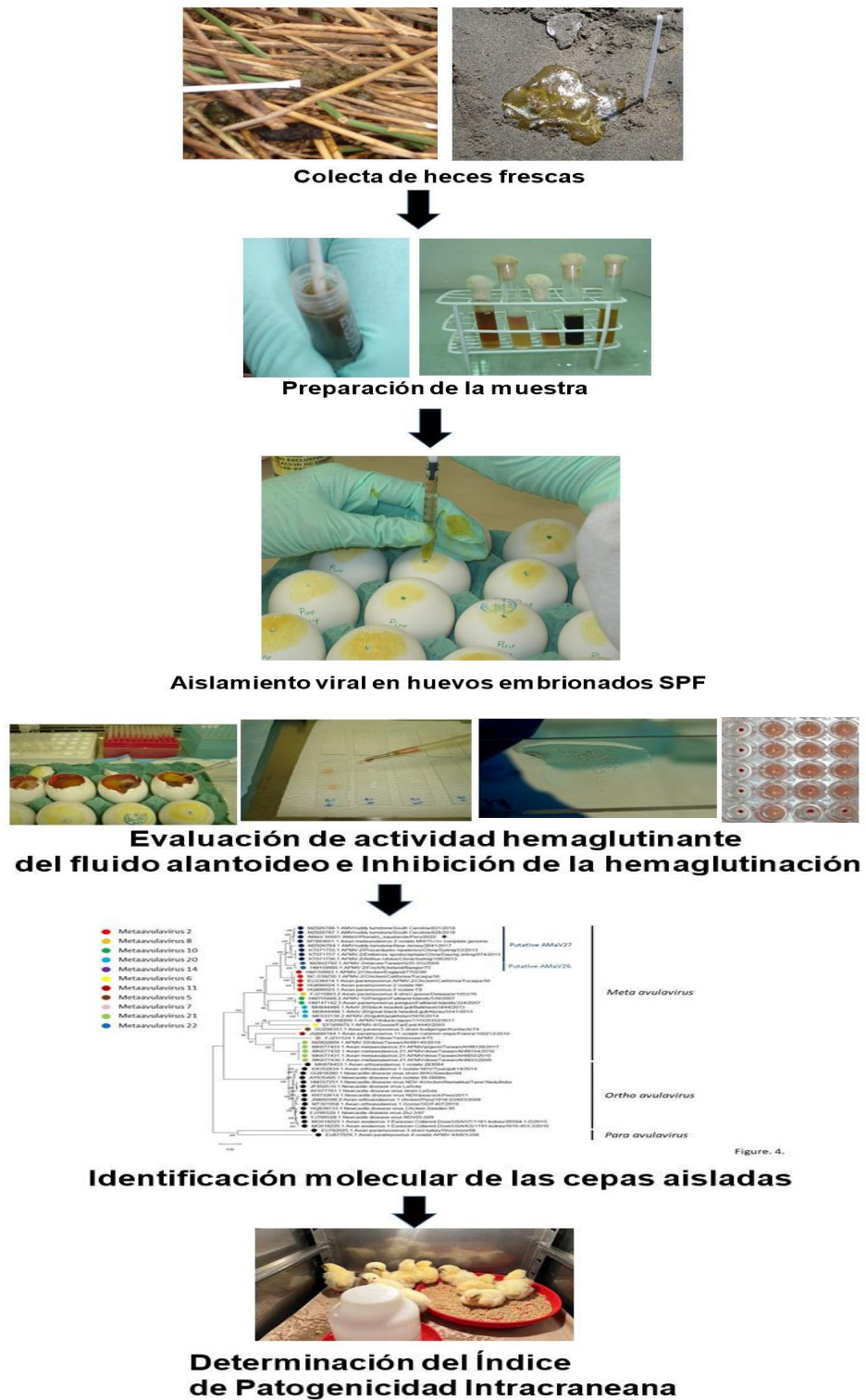


Figura 26. Procedimiento de colecta, aislamiento e identificación de paramixovirus en aves silvestres.

3.2 ENSAYO B: AISLAMIENTO VIRAL Y DETERMINACION DE PATOGENICIDAD DE CEPAS DE PARAMIXOVIRUS AVIAR EN AVES DOMÉSTICAS DEL PERÚ.

Objetivos:

4. Caracterizar genéticamente los aislados de 21 casos de aves domésticas con signos clínicos sospechosos de ENC recibidos en el LPA desde el año 2004 al 2022.
5. Determinar la patogenicidad de las cepas aisladas a través del tiempo en aves domésticas del LPA.
6. Identificar el genotipo viral al que pertenecen las cepas aisladas.

3.2.1 Lugar de ejecución:

Este ensayo se realizó íntegramente en el LPA, está ubicado en la Avenida Circunvalación 2800, distrito de San Borja, Lima, Perú. Este laboratorio recibe diariamente con fines de diagnóstico aves domésticas de crianza tecnificada, crianza no tecnificada y mascotas de aves silvestres. Los lugares de procedencia de las muestras positivas se señalan en los mapas de las Figuras 27, 28 y 29.

3.2.2 Animales:

El estudio en aves domésticas se realizó analizando las muestras de tráquea, pulmones y cerebro de 21 casos de aves domésticas con signos y lesiones compatibles con ENC que fueron recibidos entre los años 2004 al 2022.

La necropsia y colección de muestras fue realizada con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Autorización N°2021-33).

Los 21 casos de aves domésticas que fueron analizados corresponden a diez casos de aves de riña, seis casos de pollos de engorde, tres casos de aves de postura y dos casos de aves de traspatio (uno de aves criollas y otro de un pavo real). Las muestras proceden de cinco departamentos del Perú: Piura, Ancash, Lima, Arequipa y Apurímac.

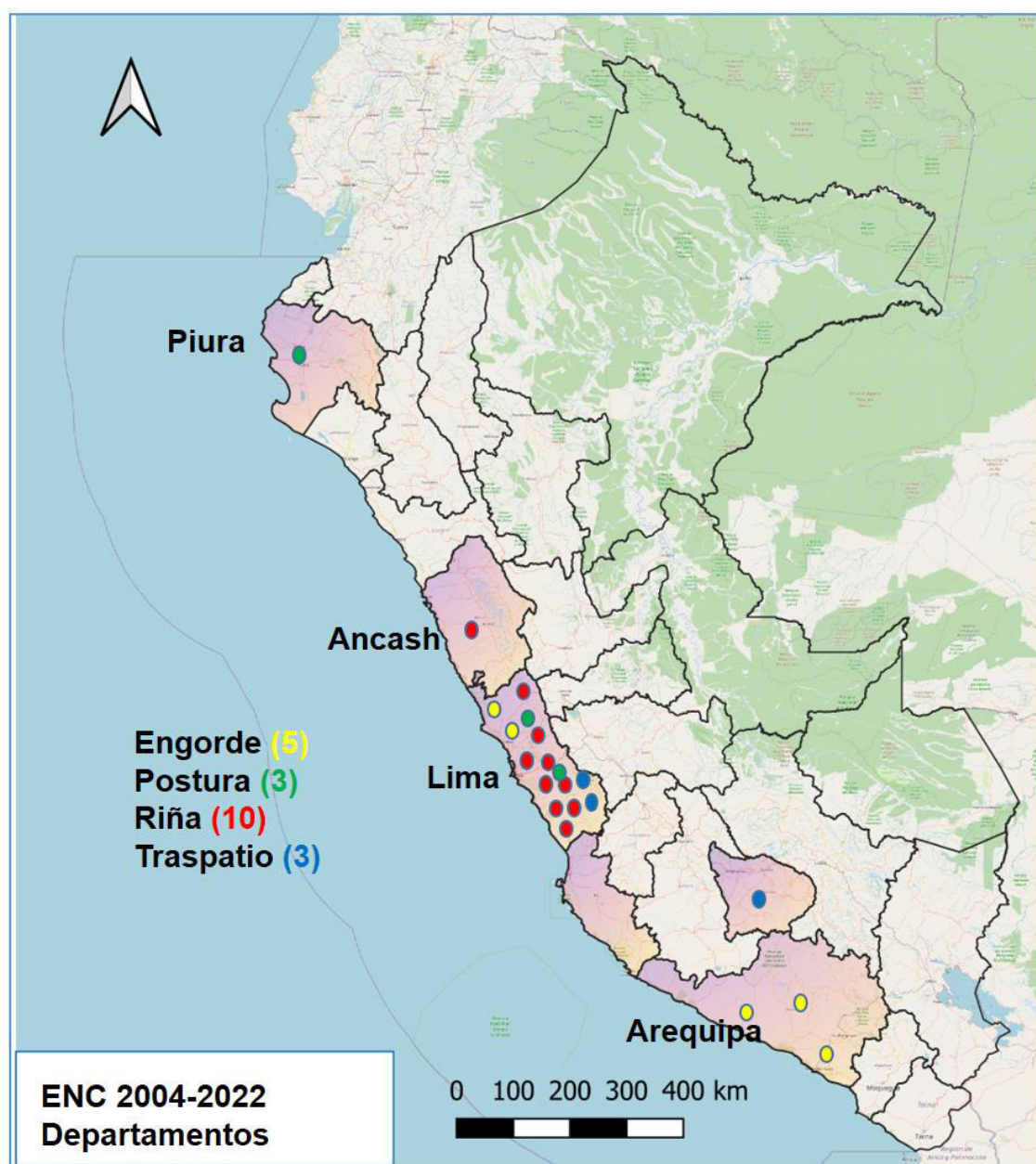


Figura 27. Casos ENC por tipo de explotación y departamento de procedencia

La mayor cantidad de casos (15/21), proceden del departamento de Lima, donde se encuentra el LAP. La distribución de muestras en el departamento de Lima se muestra en la Figura 27.

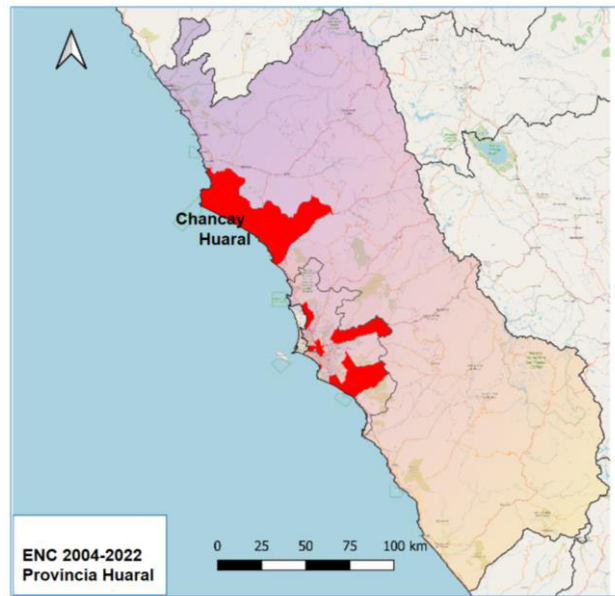


Figura 28. Lugares de aislamiento viral (en rojo), Provincia de Huaral, departamento de Lima

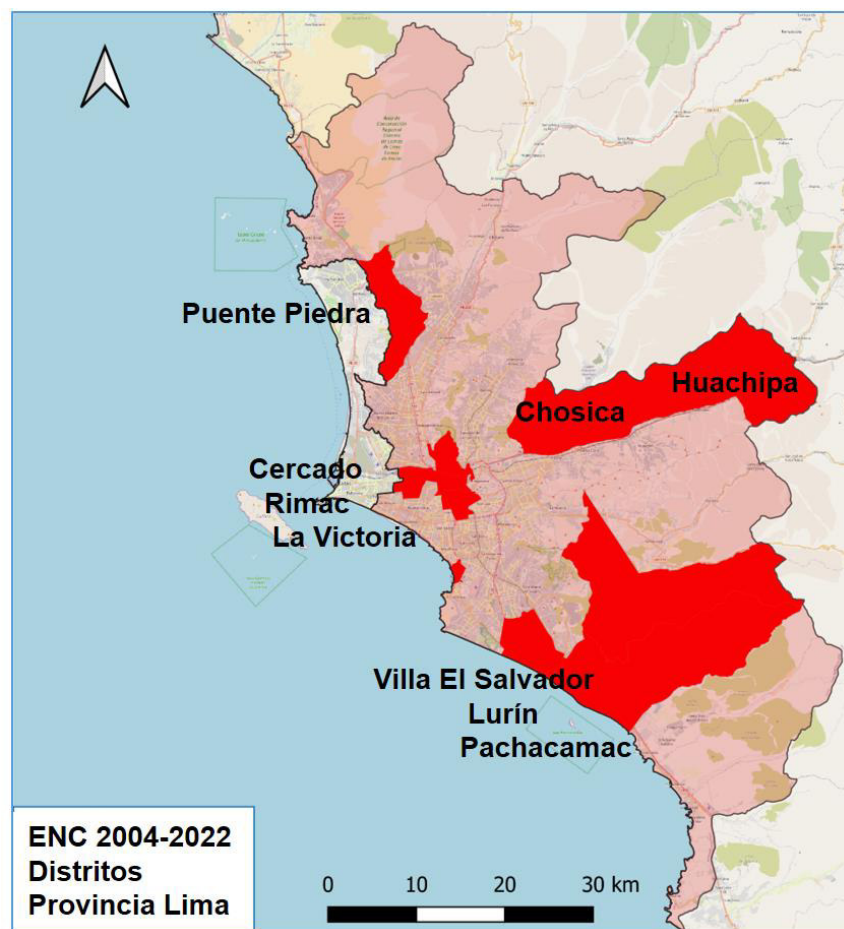


Figura 29. Lugares de aislamiento viral (en rojo), por distritos de Lima Metropolitana

3.1.3 Detección, aislamiento e identificación viral:

Los protocolos de detección o aislamiento viral fueron de dos tipos. Antes del 2015 las muestras de los casos sospechosos fueron primero analizados por aislamiento viral en huevos embrionados SPF. A partir del 2015, con el uso cada vez mas masivo del RT-PCR en tiempo real, las empresas avícolas medianas o grandes, empezaron a enviar muestras a analizar por RT PCR en tiempo real para detectar varios virus respiratorios, esto debido a que aves (con programas de vacunación fuertes) suelen presentar signos respiratorios no patognómicos y necesitan resultados urgentes para la toma de decisiones. Las muestras positivas al PCR fueron inoculadas en huevos embrionados SPF para obtener el aislado respectivo, tal como se muestra en la figura 31.

Todas las muestras de aves de riña y de traspatio que presentaban signos clínicos respiratorios y nerviosos sospechosos de la enfermedad, así como las de crianza industrial recibidas hasta el año 2013, fueron primero inoculadas en huevos embrionados SPF, la muestra biológica colectada fueron tráquea y pulmones analizados en un pool de estos órganos todas las aves remitidas cuyo número variò de 1 a 5 aves. Los aislados positivos fueron conservados en crio congelación y refrescados o sea reinoculados en huevos SPF para confirmar su viabilidad y ser analizado por PCR y secuenciamiento; previamente fue evaluada la viabilidad del virus de los aislados recuperados del banco histórico de muestras mantenidas en la congeladora menos 80 del Lab de Patología aviar, evaluando la actividad hemaglutinante y el título de cada aislado siguiendo el protocolo de la WOA, 2021.

Determinación del título hemaglutinante de un aislado viral APMV-1:

1. Se utiliza una columna de una microplaca con fondo en U para titular cada uno de los aislados.
2. Son adicionados 25 uL de solución salina a cada una de las celdas de la microplaca.
3. Se adiciona 25 uL del fluido alantoideo solo en la primera hilera de celdas.
4. Usando una micropipeta multicanal con tips para 25uL se pasan y se mezclan 25 uL de la primera hilera a la segunda hilera de celdas y así sucesivamente hasta llegar a la última hilera, descartando al final los 25 uL sobrantes. Con este procedimiento se obtienen diluciones seriadas de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 hasta 1:128.
5. Se adicionan 35uL de la solución de glóbulos rojos al 0.7% a cada una de las celdas de la microplaca.

6. Se requieren dos controles: El de virus adicionando a una celda 25uL de fluido alantoideo y 25uL de glóbulos rojos. El de glóbulos rojos adicionando a una celda 25uL de solución salina y 25uL de solución de glóbulos rojos al 0.7%.
7. Se incuba a medioambiente por 30 minutos.
8. Es positiva la hemoaglutinación cuando se forma una malla en el fondo de la celda; es negativa cuando se forma un botón rojo de glóbulos rojos no aglutinados.
9. El título hemoaglutinante de cada aislado es la dilución más alta en la que se observa hemoaglutinación.

Protocolo de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA)

Esta prueba permite titular anticuerpos contra paramixovirus aviar-1, pero en este estudio se realizó con la finalidad de confirmar que el aislado con actividad hemaglutinante es un paramixovirus aviar-1 (Fig 30). El procedimiento es como sigue:

1. Se utiliza una columna de una microplaca con fondo en U para cada uno de los aislados que se desea confirmar que es un paramixovirus aviar-1.
2. Con la ayuda de una micropipeta multicanal colocar 25uL de solución salina a todas las celdas de una columna de la microplaca con fondo en U.
3. Adicionar 25uL de suero sanguíneo monoespecífico conteniendo anticuerpos contra APMV-1 a la primera celda de la columna.
4. Con una micropipeta mezclar y pasar 25 uL de la primera a la segunda celda y así sucesivamente para obtener diluciones seriadas de 1:2, 1:4, 1:8 y hasta 1:16
5. Adicionar a todas las celdas 25uL del aislado que se está analizando
6. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
7. Adicionar a todas las celdas 35 uL de la solución de glóbulos rojos
8. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.



Figura 30. Evaluación de la viabilidad viral y título hemaglutinante de tres cepas aisladas de aves domésticas y 02 de aves silvestres.

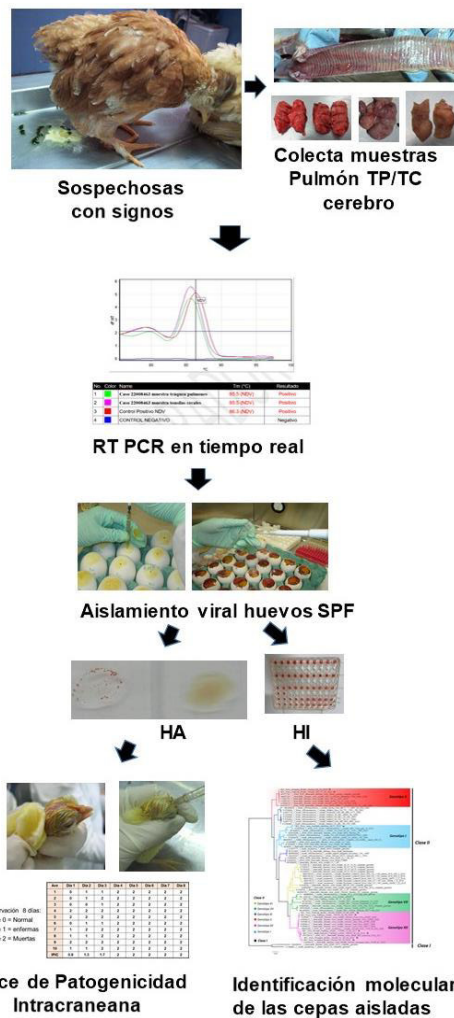


Figura 31. Procedimiento de aislamiento e identificación de cepas en aves domésticas

Prueba de PCR en tiempo real con análisis de la curva de melting

Para la detección del ácido nucleico viral en muestras sospechosas se usó la prueba de PCR que analiza la curva de disociación en alta resolución descrito por Pham *et al.* (2005), la cual permite diferenciar la temperatura de disociación de cadenas por pequeños cambios en la secuencia de ADN que corresponden a un genotipo particular, de manera que diferentes secuencias pueden ser detectadas simultáneamente, tal como se observa en la muestra del caso 15009787 cuya TM fue de 85.5° en comparación a 87.5° de la cepa La sota control (figura 32).

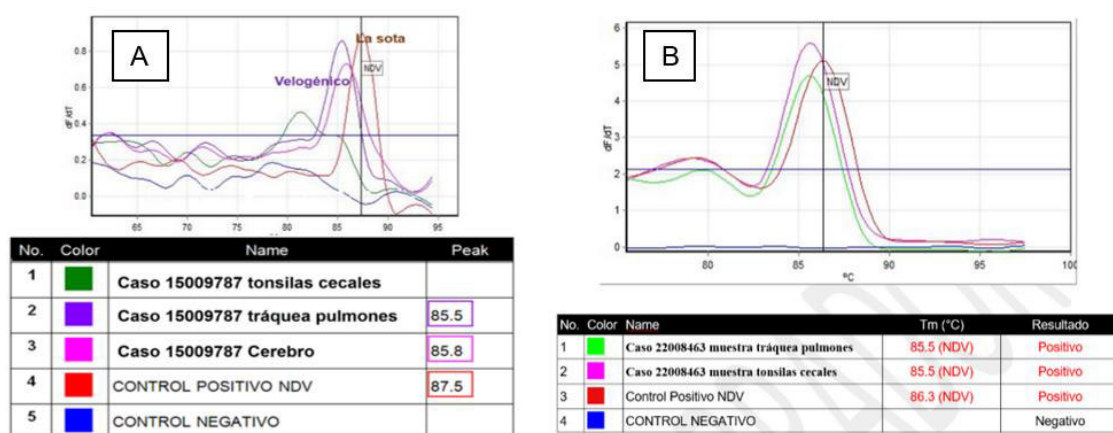


Figura 32. PCR en tiempo real HRMC: caso 15009787 (A) y caso 22008463 (B)

Para la prueba, el ARN fue extraído con trizol (Invitrogen, CA) directamente de 100g de homogenizado de órganos: pulmones, tráquea, cerebro y tonsilas cecales. Se usaron un set de primers que amplifican un fragmento de 196 pb de la región que codifica el sitio de escisión del gen de fusión:

F2-S: 5'-AACAGGACACTGACCACT-3 y F2-AS: 5'-TGGCAGCATTCTGGTTGGCT-3'

La mezcla de reacción en la prueba de RT- PCR utilizada se detalla en el cuadro 14 y cuadro 15.

Cuadro 14. Mezcla de reacción de PCR por tubo de reacción

Componente	Volumen (μl)	Concentración Final
Agua	6,25	—
2X (X) Mezcla maestra con SYBR Green	12,5	1 X
F2-S (25 μM)	0,5	1 μM
FS-SA (25 μM)	0,5	1 μM
Transcriptasa inversa*	0,25	
Muestra de ARN	5,0	—
Total	25,0	

Cuadro 15. Programa de PCR

Ciclos	(X) Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Transcripción inversa*	10 min	48 °C
1	Activación†	3 min	95 °C
40	Desnaturalización†	5 s	95 °C
	Hibridación‡	5 s	55 °C

3.1.4 Determinación de patogenicidad viral por la prueba de IPIC.

Para la caracterización patogénica por la prueba IPIC, se seleccionaron 14 de los 22 aislados de aves domésticas. Con tal fin se usaron 10 pollos SPF de un día de edad, que fueron inoculados con las muestras confirmadas positivas a Paramixovirus aviar-1 por HA e IHA. El fluido fue comprobado libre de Influenza A y otros agentes y se verificó que tuviese un título mínimo de HI > 1:16, tal como lo exige el protocolo usado (WOAH, 2021). El procedimiento fue el mismo descrito para las cepas aisladas de aves silvestres tal como se ilustra en la Figura 33.

Inoculación intracerebral 0.05 mL (1:10)
del fluido alantoideo libre de bacterias,
sin antibióticos a 10 pollos SPF de 1 día.



110181	Aves de riña/Rimas-Lima/2011							
04/01/05	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Sanos	8	0	0	0	0	0	0	0
Enfermos	2	0	0	0	0	0	0	0
Muertos	0	10	10	10	10	10	10	10
ICPI=1.78	0.2	2	2	2	2	2	2	2

- Aves diariamente observadas/ 8 días:
- Score 0 = Normal
- Score 1 = enfermas
- Score 2 = Muertas



Valor de ICPI = 1.78 (Promedio del score) x (ave) (observación)

Figura 33. Protocolo de determinación de patogenicidad por IPIC.

3.1.5 Determinación del genotipo viral por secuenciamiento del gen F o por secuenciamiento de última generación

La identificación del genotipo viral se realizó con dos diferentes métodos, 13/21 muestras de los casos recibidos durante los años 2004, 2005, 2006, 2011 y 2015 fueron analizadas en base al gen completo de la proteína de Fusión y, 08/21 muestras de los casos recibidos durante los años 2005, 2011, 2013, 2015 y 2022 analizando el genoma completo.

El secuenciamiento del genoma completo, logró detectar la presencia de dos cepas virales en una misma muestra de un caso de pollos de engorde del año 2015, por ello, terminaron siendo

secuenciadas 22 cepas de Paramixovirus aviar-1. Entre las aves domésticas incluimos el caso de un lote de pavos reales del distrito de Pachacamac-Lima 2022.

Determinación del genotipo de los aislados virales de aves por secuenciamiento del gen F

La determinación del genotipo viral de los 13 aislados de aves domésticas durante el primer periodo del estudio, años 2004 al 2015, fue realizada siguiendo el mismo protocolo descrito en el capítulo que corresponde a aves silvestres (Diel *et al.*, 2012); Ocho de dichos aislados se analizaron por Sanger usando la secuencia completa del gen F (1662pb), mientras que en los cinco aislados restantes por una porción del gen F (538 a 745pb).

Secuenciamiento de genoma completo (NGS).

Nueve aislados, ocho de aves domésticas y uno de aves silvestres obtenidos en el LAP durante los años 2005 al 2022, fueron analizadas por secuenciamiento de genoma completo por NGS.

Las muestras aisladas en huevos embrionados fueron procesados para extracción de ARN total usando el kit QIAamp Viral RNA (Qiagen, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. El ARN obtenido fue procesado para síntesis de ADN complementario y preparación de la librería genética usando el kit Nextera XT DNA Library preparation kit y secuenciado en una plataforma MiSeq (Illumina, USA) para la obtención de lecturas pareadas de 150 nucleótidos. Posterior al secuenciamiento, se evaluó la calidad del secuenciamiento usando el programa FastQC v.0.11.9 basado en el score Phred, mientras los adaptadores fueron removidos usando el programa Trimmomatic v. 0.32. Los genomas fueron ensamblados usando el programa SPAdes Genome Assembler v. 3.13.1 y la anotación se realizó usando el programa Prokka genome annotation v.1.14.6.

La metodología de extracción de ARN se basó en lo definido por el fabricante del kit QIAamp Viral RNA (Qiagen, USA). No se realizaron cambios al procedimiento establecido.

Las muestras de aves con enfermedad clínica o asintomáticos pueden contener una variedad de virus con capacidad de propagarse en huevos embrionados. Por tal motivo, los aislados virales de huevos embrionados podrían contener más de una forma viral de paramixovirus aviar, incluyendo aquellos tan distantes a los orthoavulavirus como los meta- y para-avulavirus. Un secuenciamiento metagenómico dirigido de aislados virales permite determinar no solo un agente hemaglutinante sino la posible coexistencia de más de un aislado viral en una sola muestra. Esto fue también observado en el estudio, en la que, a partir de una muestra clínica de un ave doméstica, se logró propagar 2 aislados virales de origen uno vacunal y uno de campo. Este hallazgo difícilmente pudo determinarse por metodología convencional como qPCR, por lo que se plantea que el secuenciamiento podría ser una alternativa en casos donde se requiera determinar

específicamente los agentes involucrados. Los análisis realizados en los casos de aves domésticas se detallan en el Cuadro 16.

Cuadro 16. Listado de casos sospechoso de ENC, seleccionados de los recibidos entre 2004 al 2022, según tipo de ave, lugar de procedencia y método de análisis.

Código	Fecha	Procedencia	Tipo de ave	Edad	PCR	AV*	IPIC	Secuen
040369	10/05/2004	Pte Piedra-Lima	Postura	12 sem	x	X	x	Gen F
040642	16/08/2004	Huachipa-Lima	Criollos	45 días	x	X	x	Gen F
040785	30/09/2004	Barranco-Lima	Riña	8 meses	x	X	x	Gen F
040871	26/10/2004	Lurín-Lima	Riña	2 y 3 sem	x	X	x	Gen F
040796	04/10/2004	Lurín-Lima	Postura	11 sem	x	X	x	Gen F
040931	22/11/04	La Victoria-Lima	Riña	14 meses	x	X	x	Gen F
050009	04/01/2005	Apurímac	Traspatio		x	X	x	Gen F
050566	23/06/2005	Chancay-Lima	Engorde	29 días	x	X	-	NGS
060087	25/01/06	Piura-Piura	Postura	11 sem	x	X	x	Gen F
110181	09/03/2011	Rímac-Lima	Riña	3,7,14 mes	x	X	x	Gen F
110511	19/09/2011	Pachacamac	<i>Pavo cristatus</i>		x	X	x	Gen F
110277	08/04/2011	Huaral-Lima	Riña	2 meses	x	X	x	Gen F
110288	13/04/2011	Ancash	Riña	14 meses	x	X	-	NGS
110319	28/04/2011	Huachipa-Lima	Riña	3 edades	x	X	x	Gen F
130432	30/04/2013	V. Salvador-Lima	Riña	11 meses	x	X	-	NGS
1509506	17/06/2015	Arequipa	Engorde	34 días	x	X	-	NGS
1509787	23/06/2015	Arequipa	Engorde	33 días	x	X	x	Gen F
150795	26/08/2015	Cercado-Lima	Riña	17 meses	x	X	-	NGS
2201165	31/05/2022	Chancay-Lima	Engorde	30 días	x	X	-	NGS
2208463	05/09/2022	Arequipa	Engorde	37 días	x	X	-	NGS
221003	03/10/2022	Ate-Lima	Riña	14 meses	x	X	-	NGS

*Aislamiento viral en huevos embrionados SPF, hemaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación.

IV. RESULTADOS

AISLAMIENTO VIRAL, DETERMINACION DE PATOGENICIDAD Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CEPAS DE PARAMIXOVIRUS AVIAR

4.1 ENSAYO A: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE PARAMIXOVIRUS AVIAR EN AVES SILVESTRES DEL PERU.

4.1.1 Aislamiento viral en aves silvestres

Fueron aisladas 31 cepas de Paramixovirus aviars, a partir de las 6393 muestras de heces frescas procedentes de 22 diferentes especies de aves silvestres, que fueron colectadas durante los años 2007 al 2022 (Figuras 34 y 35), el fluido alantoideo de los embriones positivos a la hemaglutinación (HA) fue analizado por la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) usando un antisero monoespecífico contra los virus APMV-1 y, por RT-PCR.

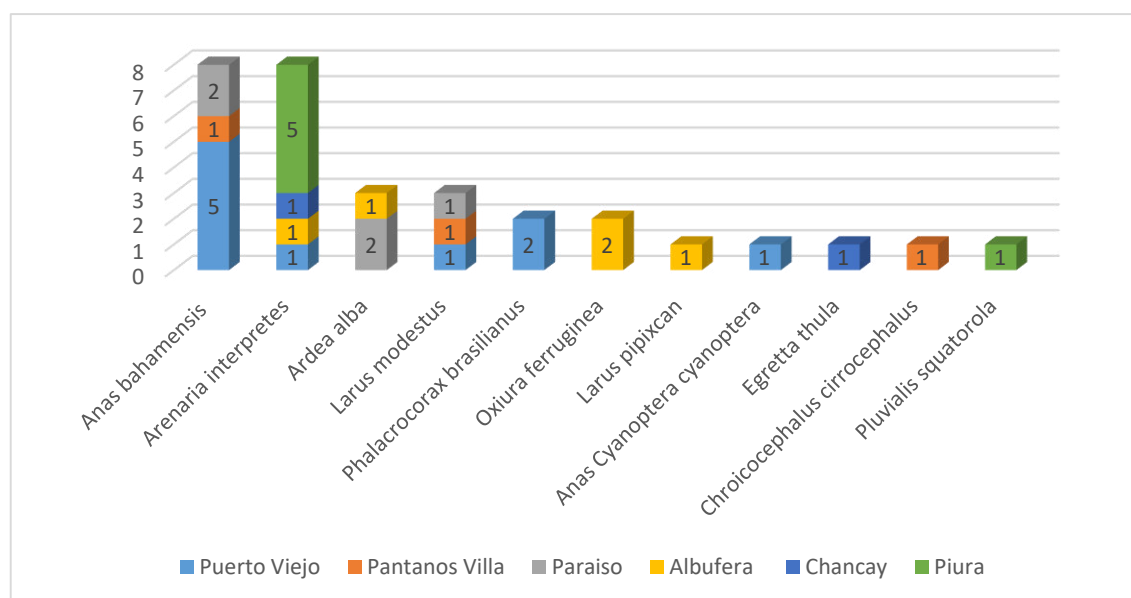


Figura 34. Aislamientos de Paramixovirus aviar en aves silvestres por especie de ave y lugar de detección.

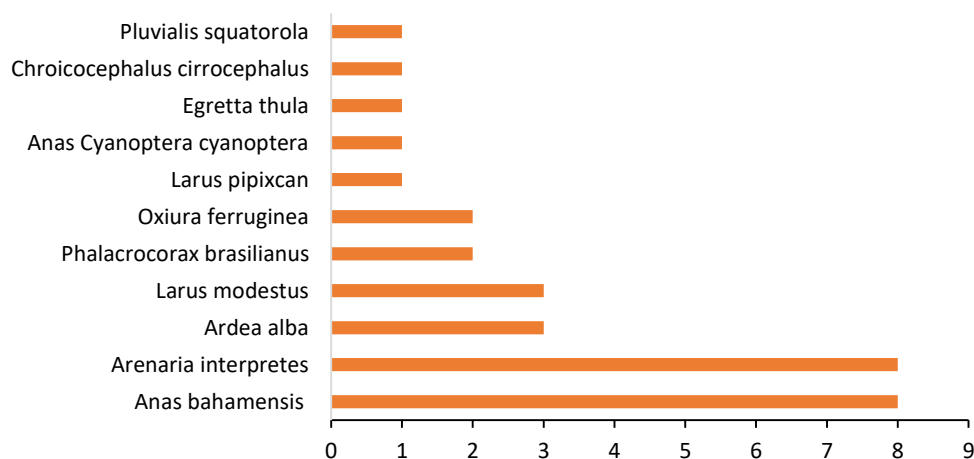


Figura 35. Frecuencia de aislamientos de Paramixovirus aviar en huevos embrionados SPF obtenidos de heces frescas por especie de aves silvestres.

De las 31 cepas positivas a la HA, 30 fueron identificadas como género Paramixovirus aviar-1; una cepa no logró ser identificada por dar negativo a las pruebas de IH y RT-PCR. Posteriormente fue secuenciada por NGS siendo identificada como género Metaavulavirus (Figuras 36 y 37).

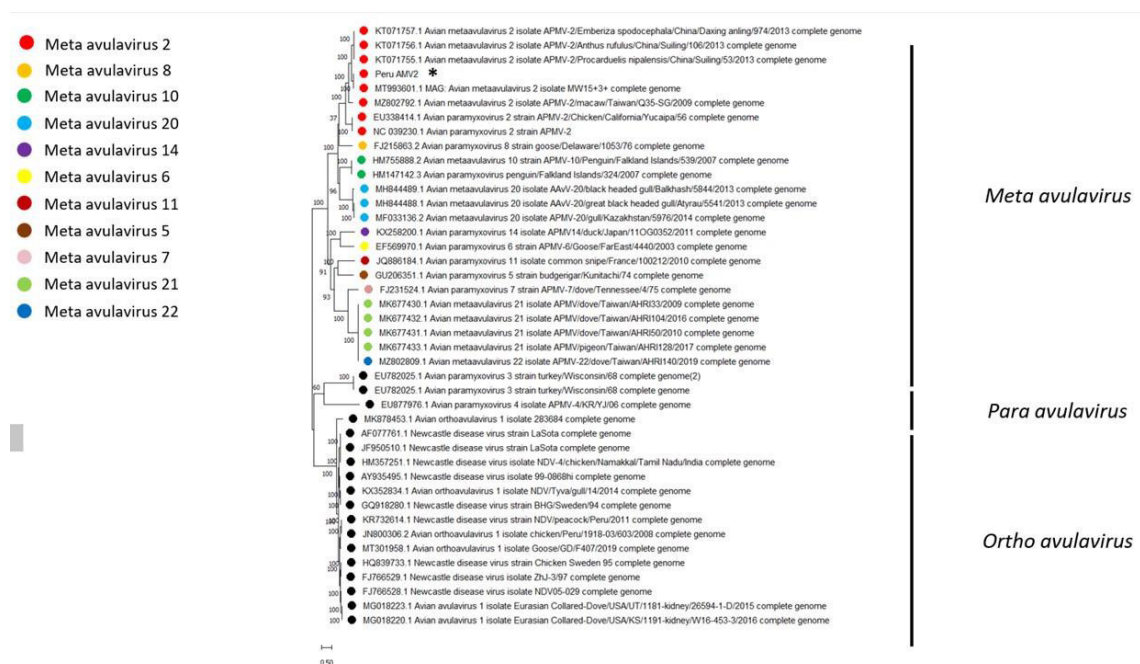


Figura 36. Genotipificación de la cepa de Metaavulavirus aviar.

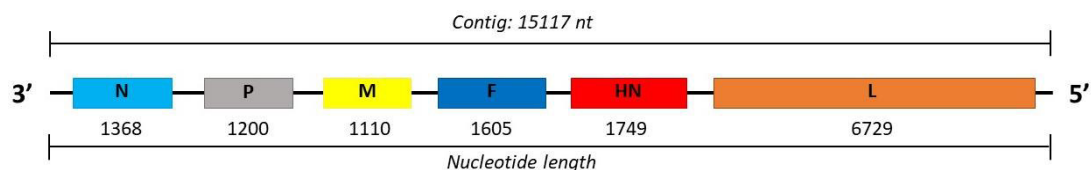


Figura 37. Representación esquemática del genoma de la cepa peruana de Metaavulavirus aviar

4.1.2 Patogenicidad y genotipo viral de aislados de aves silvestres

La totalidad de cepas de aves silvestres fueron obtenidas por aislamiento en embrión de pollo SPF, la mayoría de ellas no ocasionó muerte embrionaria y si lo hicieron la mortalidad ocurrió a partir de las 120 h de incubación, tiempo de muerte que corresponde con los virus no virulentos, por lo tanto, las 31 cepas de APMV-1 de aves silvestres, aisladas a lo largo del estudio fueron preliminarmente identificadas como avirulentas.

Adicionalmente nueve cepas aisladas del 2007 al 2009 fueron confirmadas como no patogénicas por la prueba de RT-PCR de Wang *et al.*, 2004. La prueba de Índice de Patogenicidad Intracraneana (IPIC) realizada con la cepa de Metaavulavirus aviar y con cuatro de las cepas aisladas del 2007 al 2009 dio un valor de IPIC de 0 (Cuadro 17 y figura 38). Asimismo, el análisis de la secuencia completa del gen Fusión (F), determinó que las siete cepas de Paramixovirus aviar-1 seleccionadas para esta prueba pertenecen al genotipo I (Cuadro 18).

Cuadro 17. IPIC O, Orthoavulavirus 1 y Metavulavirus aviar de aves silvestres.

IPIC	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Sana	10	10	10	10	10	10	10	10
Enferma	0	0	0	0	0	0	0	0
Muerta	0	0	0	0	0	0	0	0
IPIC=0	0	0	0	0	0	0	0	0

*Índice de Patogenicidad Intracraneana (IPIC)



Figura 38. Índice de patogenicidad intracraneana de pollos de 1 día de edad.

Cuadro 18. Tiempo de muerte del embrión (TME), Índice de Patogenicidad Intracraneana (IPIC) y genotipo de de ocho muestras positivas a Paramixovirus aviar seleccionadas a partir de los 31 aislados de aves silvestres.

año	Procedencia	Nombre Común	Especie	Aislamiento viral en huevos SPF			IPIC	Clase II Genotipo
				TME n=5	HA	IHA		
2007	Puerto Viejo	Pato Gargantillo	<i>Anas bahamensis</i>	1	+	+	0	II.1
2007	Puerto Viejo	Cormorán	<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	3 (96 y 120h)	+	+	0	II.1
2007	Puerto Viejo	Pato Colorado	<i>Anas Cyanoptera</i>	0	+	+	nr	II.1
2007	Paraíso	Garza blanca Grande	<i>Ardea alba</i>	1(120h)	+	+	nr	II.1
2009	Puerto Viejo	Pato Gargantillo	<i>Anas bahamensis</i>	1(120h)	+	+	0	II.1
2009	Puerto Viejo	Gaviota Gris	<i>Larus modestus</i>	1(120h)	+	+	0	II.1
2022	Chancay	Vuelve Piedra	<i>Arenaria interpres</i>	1(120h)	+	+	0	II.1
2022	Piura	Chorlito	<i>Pluvialis squatorola</i>	1 (120h)	+	-	0	Metavulavirus
nr: No realizado								

4.2 ENSAYO B: RESULTADOS DEL AISLAMIENTO VIRAL, DETERMINACION DE PATOGENICIDAD Y CARACTERIZACIÓN GENETICA DE CEPAS DE PARAMIXOVIRUS AVIAR EN AVES DOMÉSTICAS DEL PERU.

En el presente trabajo se seleccionaron 21 casos clínicos recibidos en el LAP con fines de diagnóstico, en todos los casos, las aves presentaron signos y lesiones sospechosas de la ENC. Los 21 casos de aves domésticas estuvieron conformados por: 10 de aves de riña, cinco de pollos de engorde (de un caso se aislaron dos cepas distintas), tres de aves de postura y tres de aves de traspatio (dos de aves criollas y uno de un pavo real). Las muestras proceden de 5 diferentes departamentos del Perú: Piura, Ancash, Lima, Arequipa y Apurímac.

Los 10 casos de aves de riña y los tres de traspatio proceden de aves no vacunadas, mientras que los cinco casos de pollos de engorde y los tres casos de ponedoras comerciales proceden de aves vacunadas con un programa que incluye al menos una vacuna viva y una vacuna inactivada.

En todos los casos de aves de riña la historia clínica refirió mortalidad, depresión y signos nerviosos, manifestados como postración o incoordinación, mientras que en los pollos de engorde el reporte de la historia clínica refería depresión, disminución del consumo, incremento de la mortalidad y en pocos casos, signos neurológicos manifestados por postración, parálisis o temblor de la cabeza, (Anexos 3, 6 y 7). Cuatro de los 10 casos de aves de riña presentaron también lesiones características de Laringotraqueitis infecciosa, indicando co-infección por estos dos agentes al mismo tiempo. Asimismo, dos casos presentaron severa parasitosis intestinal con presencia de *Ascaridia galli*, *Tetrameres americana* y *Raillietina tetragona*.

A la necropsia, el examen anatomopatológico mostró un predominio de lesiones hemorrágicas en los agregados linfoides del tracto intestinal, que en su mayoría incluyeron, proventrículo, placas de peyer y tonsilas cecales. Por otro lado, cuatro de los cinco casos analizados de pollos de engorde (050566, 15009506, 15009787 y 22008463), presentaron severas lesiones hemorrágicas en la mucosa de la bursa de Fabricio, tal como se señala en el Cuadro 19, que detalla la historia clínica, signos clínicos y lesiones macroscópicas de los casos positivos a ENC analizados en el estudio.

A diferencia de las aves de riña, los pollos de engorde presentaban aerosaculitis torácica o abdominal, con presencia de material caseoso en sacos aéreos, esto debido a que, en aves vacunadas con protección inmune, el progreso de la enfermedad es lento y permite la contaminación con bacterias oportunistas como es principalmente la *Escherichia coli*.

Los signos y lesiones de cada uno de los 21 casos analizados en el estudio se describen en el Cuadro 19. En anexo están las imágenes de lesiones de 15 de los 21 casos de este estudio.

Cuadro 19. Historia clínica, signos clínicos y lesiones macroscópicas de los casos seleccionados de los positivos a ENC en aves domésticas 2004-2022.

Nº	Caso	Tipo ave	Edad	HC y Signos	Lesiones	Anexo Imágenes
1	040369	Postura Puente Piedra	12 sem	Signos nerviosos Mortalidad, depresión, parálisis, tremor y diarrea verde	Leve aerosaculitis, traqueítis, material caseoso en glotis, queratitis ocular, Petequias en proventrículo y erosión molleja.	X
2	040642	Criollas Huachipa	45 días	Mortalidad, depresión y signos nerviosos	Opacidad de córnea, aerosaculitis hemorragias TI.	X
3	040785	Riña Barranco	8 meses	Mortalidad. Severo depresión ronquera, cianosis de cresta.	Traqueítis hemorrágica hemorragias en agregados linfoides TI	X
4	040871	Riña Lurín	2 y 3 sem	Mortalidad solo en las jóvenes	Hemorragias en agregados linfoides TI	X
5	040796	Postura Lurín	11 semanas	Ronquera, no comen, han muerto 2 de 2500.	Presencia de áscaris y esquizontes de <i>Eimeria necatrix</i>	No imágenes

6	040931	Riña La Victoria	4 meses	Diarrea, ojos rojos, queratitis, mortalidad, postración	Sin registro	No imágenes
7	050009	Taspatio Apurimac	8 sem	congeladas	Sin registro	No imágenes
8	050566	Engorde Chancay	29 días	Depresión disminución consumo y mortalidad	Lesiones hemorrágicas de tejido linfóide, incluyeron el proventrículo, placas de peyer y bursa de fabricio.	X
09	060087	Postura Piura	11 sem	Postura Mortalidad	Sin registro	No imágenes
10	110181	Riña Rimac	3, 7 y 14 mes	Mortalidad, depresión, parálisis,	Hemorragias en proventrículo, p. peyer. Tonsilas cecales, presencia de parásitos intestinales. LTI	X
11	110511	Pavo real Pachacamac	Pavo cristatus	Signos nerviosos Hisopados	Sin registro	No imágenes
12	110277	Riña Huaral	02 meses	Mortalidad, depresión, parálisis,	Hemorragias en párpados, cavidad torácica, en proventrículo y p. peyer. Parasitosis tetrameres. LTI	X
13	110288	Riña Carhuas Ancash	14 meses	Mortalidad, depresión, parálisis,	Hemorragias Traqueal, proventrículo, P. peyer. Intestino grueso. LTI	X
14	110319	Riña Huachipa	Diferentes edades	Conjuntivitis	Hemorragia en mucosa de párpado, hemorragias en glotis, esófago, proventrículo, TC y p. peyer. LTI	X
15	130432	Riña Vila El salvador	11 mes	Mortalidad, decaimiento edema facial, inapetencia, boqueos, diarrea blanca	Mucosidad traqueal, Hemorragias en proventrículo.	X
16	1509506	Engorde Arequipa	34 días	Mortalidad, diarrea verde disminuye consumo, postración	Congestión general, traqueítis hemorrágica, hemorragias proventrículo, placas de peyer y	X

					bursas hemorrágicas	
17	15009787	Engorde Arequipa	33 días	Mortalidad, diarrea verde disminuye consumo, postración	Congestión general, traqueítis hemorrágica, hemorragias proventrículo, placas de peyer y bursa	X
18	150795	Riña Jn Ancash Lima	17 meses	Diarrea verde, mortalidad	Úlceras cavidad oral, traqueítis hemorrágica Hemorragia en proventrículo, Tonsilas Cecales y Placas de peyer	No imágenes
19	2201165	Engorde Rio Seco-Huaral	30 días	Diarrea leve, menor peso	Se observó una de 5 aves con hemorragias en proventrículo	X
20	2208463	Engorde Arequipa	37 días	Mortalidad, diarrea verde	Hemorragias en proventrículo, aerosaculitis torácica, mucosidad traqueal, hemorragias en bursa	X
21	221003	Riña Ate	14 mes	Mortalidad 1 a 2/d, depresión, disnea, diarrea verde	Traqueítis hemorrágica, Petequias en proventrículo	X

Los casos sospechosos de ENC de pollos de engorde recibidos durante los años 2015 al 2022, fueron primero analizados por RT-PCR en tiempo real y no por aislamiento viral, como se realiza rutinariamente para aves de riña y traspatio; además que la prueba de RT PCR en tiempo real usada (Pham H *et al*, 2005), permitía simultáneamente detectar el ácido nucleico viral y al mismo tiempo determinar su virulencia mediante la curva de melting que generaba la muestra, al compararla con la de dos controles positivos, uno de una cepa lentogénica y otro de una cepa velogénica; sin embargo, aproximadamente a partir del 2017, las temperaturas de melting de muestras positivas a virus velogénicos no calzaban exactamente con el control positivo velogénico respectivo, por lo que a partir de ese entonces, se determinó inocular las muestras positivas al PCR en huevos SPF para confirmar la virulencia de la cepa detectada por tiempo de muerte del embrión; esto hecho permitió contar con el fluido alantoideo del aislado y poder analizar esas muestras por NGS. El número de muestras con resultados de PCR en tiempo real confirmados positivos a ENC, se puede ver en la Figura 39 donde se observa el número total de muestras analizadas (en azul) y el porcentaje de positivos del total de muestras analizadas (en

aranja). En dicha gráfica se puede ver un elevado porcentaje de positivos al RT-PCR durante los años 2015 al 2018 en comparación con los años 2019 al 2023; a la vez se evidencia un incremento en la demanda de diagnósticos por RT-PCR en tiempo real durante los últimos años, lo que coincide con la implementación de programas de vacunación más fuertes reforzados con la aplicación de una vacuna inactivada a pollos de engorde y que por lo tanto exigen una vigilancia genómica que evidencie la circulación o no del virus en los planteles avícolas vacunados.

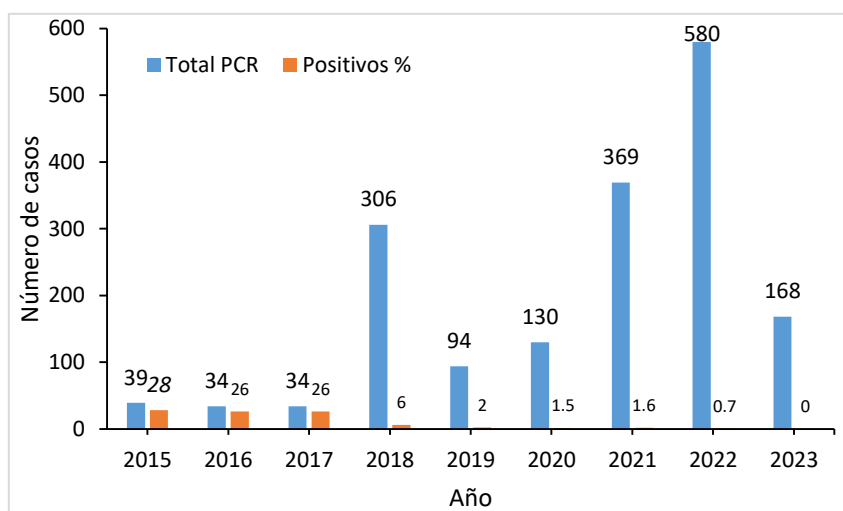


Figura 39. Número de casos (azul) y porcentaje de positivos (naranja), a la detección de Paramyxovirus aviar 1, por PCR en tiempo real en aves domésticas de casos clínicos durante los años 2015-2023.

Uno de los objetivos del estudio fue la identificación de los genotipos virales a los cuales pertenecían las 22 cepas aisladas de los 21 casos. El análisis del genotipo se realizó tomando en cuenta la secuencia completa del gen F que es considerado determinante de patogenicidad y que permite además identificar al genotipo viral. A diferencia de los aislados de aves silvestres, que fueron todas identificadas como avirulentas de Clase II genotipo 1, los aislados de aves domésticas fueron agrupadas en tres diferentes genotipos. En lo que respecta a los 10 aislados de aves de riña, con excepción del aislado del caso 221003, de Ate del año 2022, que fue identificado como Clase II genotipo VII, los nueve aislados restantes, fueron del tipo virulentas del genotipo XII, cinco del genotipo XII propiamente dicho y cuatro del sub-genotipo XII.1. Por otro lado, las aves de postura fueron de tres genotipos diferentes: genotipo II (1), XII (1) y subgenotipo XII.1 (1); asimismo, en pollos de engorde, solo cinco fueron de genotipo virulento: XII (4) y XII.1 (1); los dos restantes fueron identificadas como GII (2) que corresponde con los tipos no virulentos. Por último, la cepa de las aves criollas fue identificada como XII.1 y, la de pavo real como XII, ambas virulentas.

La prueba de Índice de Patogenicidad Intracraneana (IPIC), fue realizada en 13 de las 22 aislados de aves domésticas, la prueba arrojó valores superiores a 1.5 en 12 de las 13 cepas, valores que corresponden con las cepas velogénicas viscerotrópicas, mientras que un aislado proveniente de uno de los tres lotes de postura comercial tuvo un IPIC de 0, coincidiendo este resultado con el del genotipo, que fue identificado como GII (caso 040796), que corresponde con los virus avirulentos.

Los valores de IPIC obtenidos en la mayoría de aislados (12/13), fueron de alta virulencia, obteniéndose en pollos de engorde valores de: 1.78, 1.88; en aves de riña: 1.75, 1.78, 1.8, 1.84, 1.85; en aves de postura comercial: 1.78, 1.83 y, en aves de traspatio: 1.8 y 1.85. El cuadro 20 y cuadro 21, muestran los resultados del IPIC 0 del aislado del caso 04796 de postura y del IPIC 1.85 del aislado del caso de ave de riña 040785 (En anexo 17 y anexo 18 se muestran los resultados del IPIC, registros de mortalidad y signos durante los 8 días de evaluación de las 13 aislados inoculados a 10 pollos SPF de 1 día de edad).

Cuadro 20. Día 8: IPIC 0, caso postura Lurín 04796

040796	Aves de postura/Lurin-Lima/2004							
04/10/04	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
Sanos	10	10	10	10	10	10	10	10
Enfermos	0	0	0	0	0	0	0	0
Muertos	0	0	0	0	0	0	0	0
ICPI=0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 21. Día 2: IPIC 1.85 caso ave de riña Barranco 040785

040785	Aves de riña/Barranco-Lima/2004							
30/09/04	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
Sano	2	0	0	0	0	0	0	0
Enfermo	8	0	0	0	0	0	0	0
Muerto	0	10	10	10	10	10	10	10
ICPI=1.85	0.8	2	2	2	2	2	2	2

En el Cuadro 22 se muestran los resultados del genotipo de 09 cepas de aves domésticas aisladas entre los años 2005 al 2022 y analizadas por secuenciamiento del genoma completo (NGS).

Cuadro 22. Resultados del secuenciamiento del genoma completo (NGS) de cepas aisladas en aves domésticas del Perú entre 2005 y 2022.

Código/año	Procedencia	Tipo de ave	Edad	Pb	Genotipo (Gen F)	Estado
050566	Chancay	Engorde	29 días	15192pb	XII.1	En preparación
110288	Ancash	Riña	14 meses	15121pb	XII	
130432	Lima Villa Salvador	Riña	11 meses	15257pb	XII	
15009506	Arequipa 1°	Engorde	34 días	13169pb	XII	
	Arequipa 1°	Engorde	34 días	15172pb	II	
150795	Lima Cercado	Riña	17 meses	15192	XII.1	
22001165	Rio Seco-Huaral	Engorde	30 días	15201pb	II	
22008463	Arequipa	Engorde	37 días	14237pb	XII	
221003	Ate	Riña	14 meses	15228pb	VII.d	

En el Cuadro 23 se muestran los resultados de índice de patogenicidad por IPIC y el genotipo de cada una de 13 cepas aisladas entre los años 2004 al 2015 y que fueron analizadas por secuenciamiento únicamente del gen F completo.

Cuadro 23. Resultados de IPIC y secuenciamiento del Gen F de cepas aisladas de brotes en aves domésticas del Perú entre 2004 y 2015.

Código/año	Procedencia	Tipo de ave	Edad	IPIC	Pb	Genotipo (Gen F)	Estado
040369	Puente Piedra	Postura	12 sem	1.78	749pb	XII.1	En preparación
040642	Huachipa	Criollo	45 días	1.85	749pb	II.1	En preparación
040785	Barranco	Riña	8 meses	1.85	1662pb	XII	Chumbe <i>et al.</i> , 2017
040871	Lurín	Riña	8 meses	1.75	1662pb	XII	
040796	Lurín	Postura	11 semanas	0	1662pb	II	
040931	La Victoria	Riña	4 meses	1.84	1662pb	XII	Chumbe <i>et al.</i> , 2017
050009	Apurímac	Engorde	8 sem	1.78	1662pb	XII	
0600087	Piura	Postura	11 sem	1.83	1662pb	XII	Chumbe <i>et al.</i> , 2017
110181	Rímac	Riña	3, 7 y 14 mes	1.78	538 pb	XII.1	En preparación
110511	Pachacamac	<i>Pavo real</i>	<i>Pavo cristatus</i>	1.8	1662pb	XII	Chumbe <i>et al.</i> , 2015,
110277	Huaral	Riña	2 meses	1.8	548pb	XII.1	En preparación
110319	Huachipa	Riña	Diferente s edades	1.78	554pb	XII.1	En preparación
15009787	Arequipa	Engorde	33 días	1.88	1662pb	XII	Chumbe <i>et al.</i> , 2017
050006	Madre de Dios	Madre De Dios			741	II	En preparación

ANÁLISIS GENÉTICO Y FILOGENÉTICO DE CEPAS AISLADAS EN AVES DOMÉSTICAS DEL PERÚ

Los 22 aislados de paramixovirus aviar obtenidos de 21 casos de aves domésticas con signos clínicos sospechosos de ENC, fueron caracterizadas en el estudio. Los amplicones del gen F de 13/22 aislados fueron secuenciados por el método Sanger, mientras que los 9 aislados restantes fueron analizados por secuenciamiento de última generación. Este último método permitió detectar dos virus distintos correspondientes a los genotipos (II y XII) en una misma muestra de pollos de engorde, logrando obtener 10 genomas completos de paramixovirus aviares. Asimismo, el secuenciamiento del genoma completo de dos muestras de aves silvestres permitió identificar un nuevo Paramixovirus aviar del género Metaavulavirus aviar, que constituye el primer aislamiento en el Perú de este tipo de virus.

Solo 8/13 aislados analizadas por Sanger fueron exitosamente secuenciadas, en los 5 aislados restantes se logró recolectar solo una porción del gen F (de entre 538 a 749pb), que permitió por comparación (BLAST) identificar el genotipo. El análisis del genotipo mostró un predominio del XII dentro de los virus virulentos, solo un virus del genotipo VIIId fue identificado en este estudio a partir de un brote de aves de riña del año 2022. Dos aislados no patogénicos fueron detectados en pollos de engorde siendo agrupados dentro del genotipo II; asimismo uno de los tres aislados de postura comercial fue también identificado como II que corresponde con las cepas vacunales lentogénicas (Cuadro 24). Todos los aislados de aves silvestres fueron identificados como Paramixovirus aviar-1, clase 1, genotipo I, avirulentas.

Análisis genómico de las cepas aisladas de aves domésticas en Perú

En primer lugar, se compararon las secuencias ensambladas de los aislados del virus de la ENC en aves domésticas del estudio con secuencias referenciales del virus depositadas en el GenBank (RefSeq) utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST)

Luego, con la finalidad de determinar la presencia de mutaciones que determinen cambios significativos, se analizaron los genes completos de los genes F y HN de los 10 aislados, por ser los genes que realizan las funciones más importantes, HN responsable del reconocimiento celular, entrada y salida viral de la célula, así como de la antigenicidad y, el gen F por ser determinante de patogenicidad.

El análisis de las secuencias del gen HN se realizó tomando el modelo y el orden de las mismas cepas de referencia usadas en el trabajo de Ogali IN, et al, 2020, que determina las variaciones de

aminoácidos que han ido observándose a partir de las cepas de los genotipos I y II, así como de las cepas de los genotipos virales virulentos de mayor importancia dentro de los Orthoavulavirus-1, tal como se muestra en el Cuadro 25.

Por otro lado, se analizó la secuencia del sitio de clivaje de la proteína F para determinar virulencia y, posibles cambios entre cepas de diferente o un mismo genotipo (Cuadro 24).

Cuadro 24. Secuencia de aminoácidos en la región de clivaje de 17 aislados peruanos de Paramixovirus aviar-1 obtenidos de aves domésticas y 01 de aves silvestres

Código	Lugar	Año aislamiento	Tipo ave	Sitio de clivaje	Genotipo Clase II	Patotipo
Chicken/Lima-Perú/40931/2004	Lima	2004	Riña	SGGRRQKR*FI	XII	Velogénico
Chicken/Lima-Perú/40785/2004	Lima	2004	Riña	SGGRRQKR*FI	XII	Velogénico
Chicken/Lurin-Perú/40781/2004	Lima	2004	Riña	SGGRRQKR*FI	XII	Velogénico
Chicken/Lurin-Perú/40931/2004	Lima	2004	Postura	SAGGKQGR*LI	II	Lentogénico
Chicken/Apurimac-Perú/50009/2005	Apurimac	2005	Traspatio	SGGRRQKR*FI	XII	Velogénico
Chicken/Piura-Perú/60087/2006	Piura	2006	Engorde	SGGRRQKR*FI	XII	Velogénico
NDV/Peacock/Perú/2011	Lima	2011	Pavo real	SGGRRQKR*FI	XII	Velogénico
Chicken/Arequipa-Perú/VFAR81/2015	Arequipa	2015	Engorde	SGGRRQKR*FI	XII	Velogénico
NDV Peru Arequipa Broiler chicken 06 23 2015 C2	Arequipa	2015	Engorde	SGGRRQGR*LI	II	Lentogénico
NDV Peru Chancay Broiler chicken 265 31 05 2022	Chancay Lima	2022	Engorde	SGGRRQGR*LI	II	Lentogénico
NDV Peru Lima Arenaia interpres SILV 2022	Piura	2022	Silvestre	SAGGKQGR*LI	II	Lentogénico
NDV Peru Lima Fighting rooster N2 31 10 2022	Ate Lima	2022	Riña	SGGRRQKR*FI	VII.d	Velogénico
NDV Peru Arequipa Broiler chicken 06 23 2015 C1	Arequipa	2015	Engorde	SGGRRQKR*FI	XII.1	Velogénico
NDV Peru Chancay Broiler chicken 50566 23 06 2005	Chancay Lima	2005	Engorde	SGGRRQKR*FI	XII	Velogénico
NDV Peru Rimac Fighting rooster 110181 09 03 2011	Rimac Lima	2011	Riña	SGGRRQKR*FI	XII	Velogénico
NDV Peru VillaElSalvador Fighting rooster 130432 30 04 2013	Vsalvador Lima	2013	Riña	SGGRRQKR*FI	XII	Velogénico
NDV Peru Arequipa Broiler chicken N1 05 09 2022	Arequipa	2022	Engorde	SGGRRQKR*FI	XII	Velogénico
NDV Peru Lima Fighting rooster 150795 26 08 2015	Cercado Lima	2015	Riña	SGGRRQKR*FI	XII.1	Velogénico

Cuadro 25. Comparación de residuos de aminoácidos en sitios antigénicos de la proteína HN de los aislados peruanos del virus de la enfermedad de Newcastle con los genotipos de referencia

Genomas referenciales y muestras	años	Coordenadas (nt)	1035	1539	1542	1563	1707	789	861	963	999	1068	1482	1548	1041	1050	1059	579	582	603
		Coordenadas (aa)	345	513	514	521	569	263	287	321	333	356	494	516	347	350	353	193	194	201
		Genotipos																		
AY935499_2_6412_8148_Newcastle_disease_virus_isolate_I_2	2006	I	P	R	I	S	D	N	D	R	K	K	D	R	E	Y	R	L	S	H
AF077761_1_6412_8145_Newcastle_disease_virus_strain_LaSota	1999	II								K			G							
EF201805_1_6412_8127_Newcastle_disease_virus_strain_Mukteswar	2007	III					G	K		K	R									
AY741404_1_6412_8127_Newcastle_disease_virus_strain_Herts_33	2005	IV						S		K	R									
MK583011_1_6418_8133_Avian_orthoavulavirus_1_isolate_chicken_Tanzania_Mbeya_MT15_2012	2012	Vd					N	R		K			N							
MN685354_1_6418_8133_Avian_orthoavulavirus_1_isolate_NDV_chicken_Kenya_KE001_2015	2015	SS					N	R		K	R		N							
MN685355_1_6418_8133_Avian_orthoavulavirus_1_isolate_NDV_chicken_Kenya_KE0811_2016	2016	SS					N	R		K	R		N		K					
MN685356_6_6418_8133_Avian_orthoavulavirus_1_isolate_NDV_chicken_Kenya_KE0698_2016	2016	SS					N	R		K	R		N							
AY562990_1_6418_8133_Newcastle_disease_virus_isolate_mixed_species_US_Largo71	2004	Vb					N	K		R	R		N							
GQ429292_1_6418_8133_Pigeon_paramyxovirus_1_strain_AV324_96	1996	VI			V			K		K					G					
FJ751918_1_6418_8133_Newcastle_disease_virus_isolate_QH1	1979	VIII			M			K		D	R									
JN400896_1_6418_8133_Newcastle_disease_virus_strain_Chichen_China_SDSG01_2011	2011	VII			V			K		K										
GU585905_1_6418_8133_Newcastle_disease_virus_strain_chicken_Sweden_97	1997	XIII			V		A	K		K				Q						
JN800306_2_6418_8133_Avian_orthoavulavirus_1_isolate_chicken_Peru_1918-03_603_2008	2008	XII			V			K		K			G							
NDV_Peru_Arequipa_Broiler_chicken_06_23_2015_C2	2015	II								K			G							
NDV_Peru_Chancay_Broiler_chicken_265_31_05_2022	2022	II								K			G							
NDV_Peru_Lima_Arenaia_interpres_SILV_2022	2022	I								K			N		D					
NDV_Peru_Lima_Fighting_rooster_N2_31_10_2022	2022	VII			V			K		K					K					
NDV_Peru_Lima_Fighting_rooster_150795_26_08_2015	2015	XII			V			K		K			G							
NDV_Peru_Arequipa_Broiler_chicken_06_23_2015_C1	2015	XII			V			K		K			S							
NDV_Peru_Chancay_Broiler_chicken_50566_23_06_2005	2005	XII			V			K		K			G							
NDV_Peru_Rimac_Fighting_rooster_110181_09_03_2011	2011	XII			V			K		K			G							
NDV_Peru_VillaElSalvador_Fighting_rooster_130432_30_04_2013	2013	XII			V		A	K		K			G							
NDV_Peru_Arequipa_Broiler_chicken_N1_05_09_2022	2022	XII			V			K		K			S							

(adaptado de Ogali IN, et al., 2020).

Las Figuras 40 y 41. representan el alineamiento y el árbol filogenético resultante de la concatenación de los nucleótidos específicos (SNPs) del genoma completo de 14 genotipos referenciales y de los 9 aislados peruanos de aves domésticas y uno de aves silvestres usando como genoma de referencia la cepa I2 (AY935499) de aves silvestres.

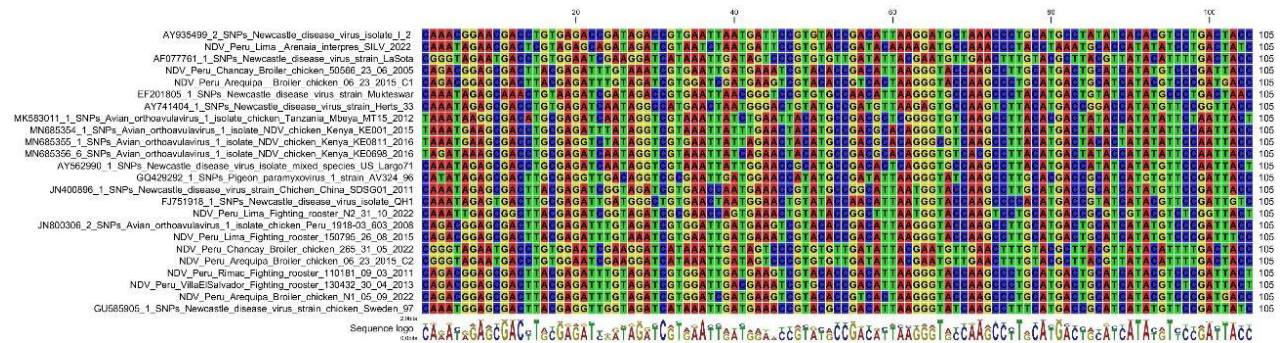


Figura 40. Concatenación de SNPs del genoma completo de las 10 cepas peruanas aisladas de del estudio y las 14 referencias de los diferentes genotipos.

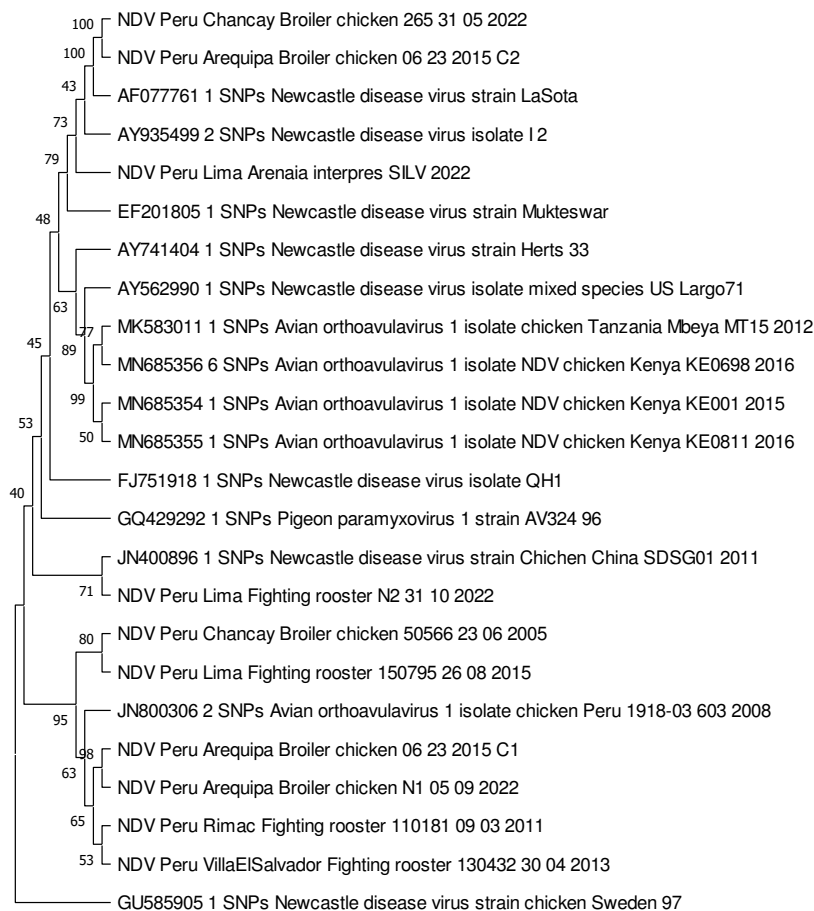


Figura 41. Árbol construido mediante la concatenación de SNPs se realizó con método de NJ con 500 de Bootstrap.

La figura 42 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región de escisión del gen F de los 10 aislados peruanos de Paramixovirus aviar-1 obtenidos de aves domésticas (9) y silvestres (1) entre el 2005 al 2022 y las secuencias de las cepas de referencia de genotipos de mayor importancia.

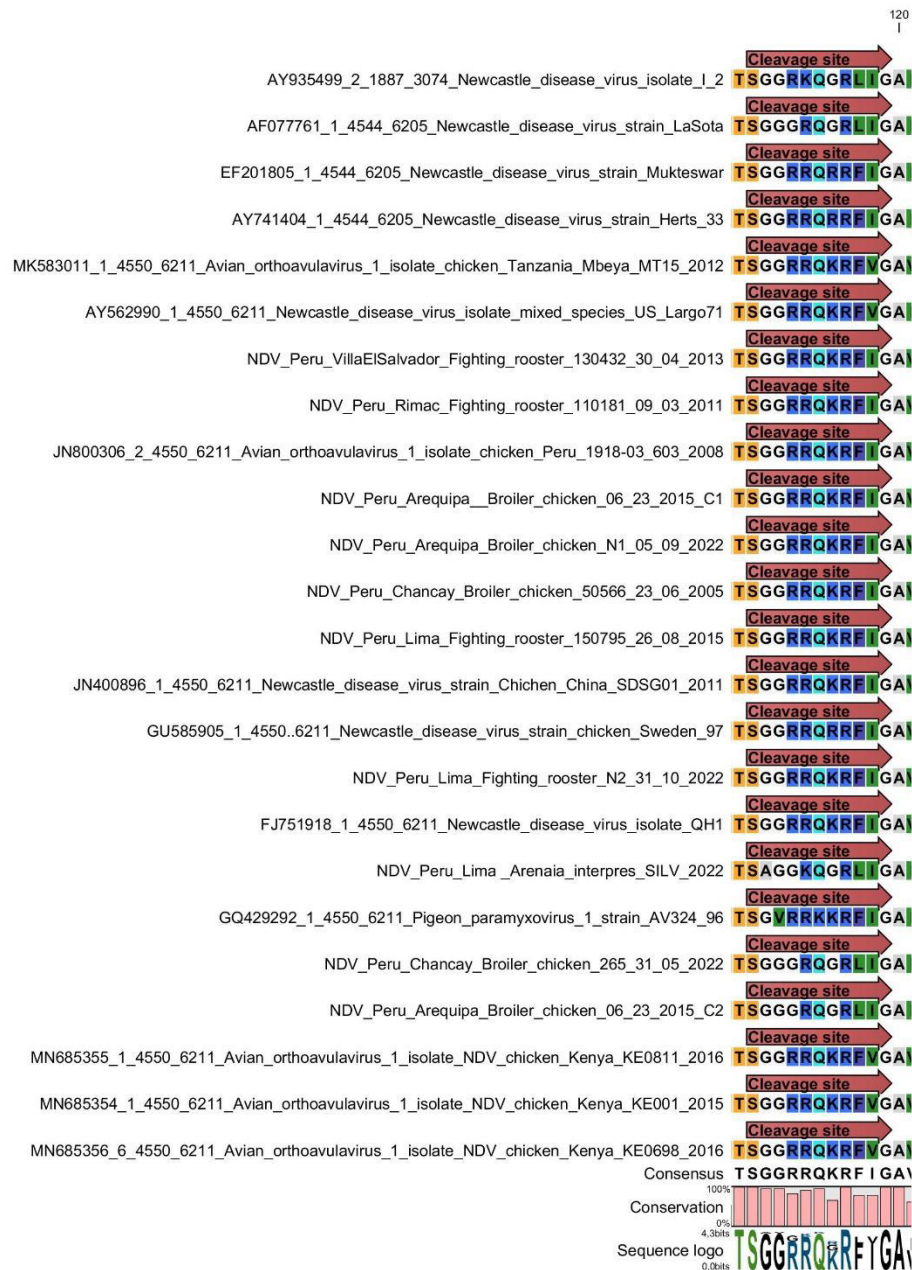


Figura 42. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región de clivaje del gen F de 10 cepas peruanas de Orthoavulavirus-1 aisladas de aves domésticas y silvestres.

El Cuadro 26 detalla: longitud (nt), cepa de referencia del mismo genotipo usada en la comparación y porcentaje de identidad, obtenidos con el secuenciamiento de las 09 aislados de aves domésticas que fueron analizados por NGS.

Cuadro 26. Resultados del secuenciamiento NGS: longitud, identidad (%), cepa referencia y genotipo de las 09 cepas aisladas de aves domésticas del Perú entre 2005 y 2022.

Año	Tipo ave	Edad (Días)	Longitud (Nt)	Cov (%)	Identidad (%)	Ref	Descripción	País	Genotipo (Gen F)
2005	Engorde	29	15192	99	98.26	JN800306.2	Avian orthoavulavirus 1 isolate chicken/Peru/1918-03/603/2008, complete genome	Perú 2008	XII.1
2011	Riña	420	15121	99	99.8	KR732614.1	Newcastle disease virus strain NDV/peacock/Peru/2011, complete genome	Perú 2011	XII
2013	Riña	330	15257	99	99.32	KR732614.1	Newcastle disease virus strain NDV/peacock/Peru/2011, complete genome	Perú 2011	XII
2015	Engorde	34	13169	99	97.95	KR732614.1	Newcastle disease virus strain NDV/peacock/Peru/2011, complete genome	Perú 2011	XII
	Engorde	34	15172	99	99.93	MW285793.1	Avian orthoavulavirus 1 isolate NDV/Chicken/Egypt/R1954-11cII/2011, complete genome	Suecia 2011	II
2015	Riña	17	15192	98	98.14	JN800306.2	Avian orthoavulavirus 1 isolate chicken/Peru/1918-03/603/2008, complete genome	Perú 2008	XII.1
2022	Engorde	510	15201	99	99.91	EU546165.2	Newcastle disease virus strain JL-1, complete genome	Perú 2011	II
2022	Engorde	37	14237	100	97.95	KR732614.1	Newcastle disease virus strain NDV/peacock/Peru/2011, complete genome	Perú 2011	XII
2022	Riña	420	15228	99	95.18	OP066059.1	Avian orthoavulavirus 1 isolate chicken/Colombia/2389-17/2010, complete genome	Colombia 2010	VII.d

En la figura 43 se observa el árbol filogenético del aislado del genotipo VII.d de Paramixovirus aviar-1, procedente de un ave de riña elaborado en base al análisis del gen F completo. La figura 44 muestra el árbol filogenético de 09 aislados peruanos de Paramixovirus aviar obtenidos en aves domésticas y 01 de aves silvestres, elaborado en base al análisis del gen F completo.

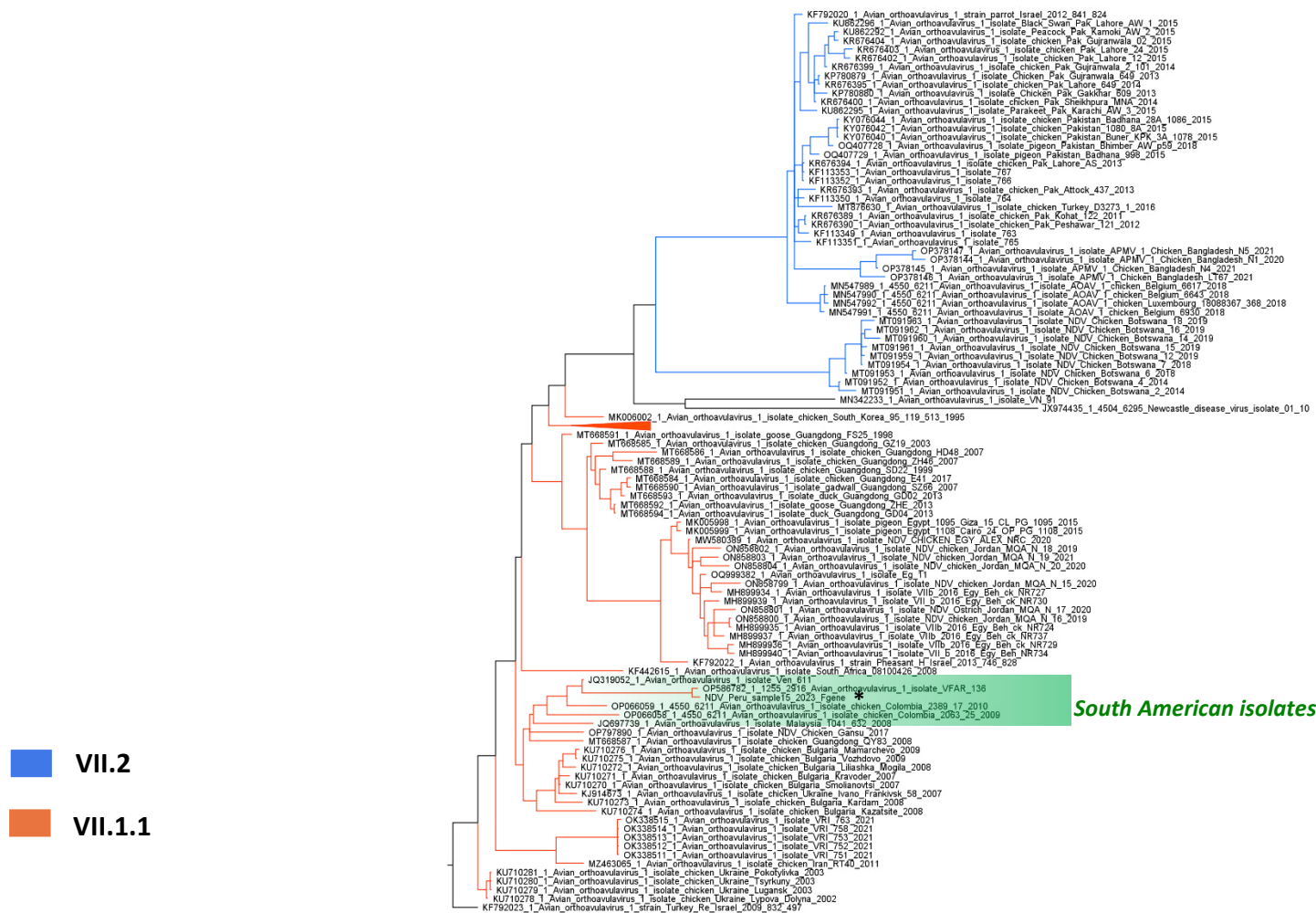


Figura 43. Árbol filogenético del aislado del genotipo VIId de Orthoavulavirus 1, aisladas de un ave de riña elaborado en base al análisis del gen F completo

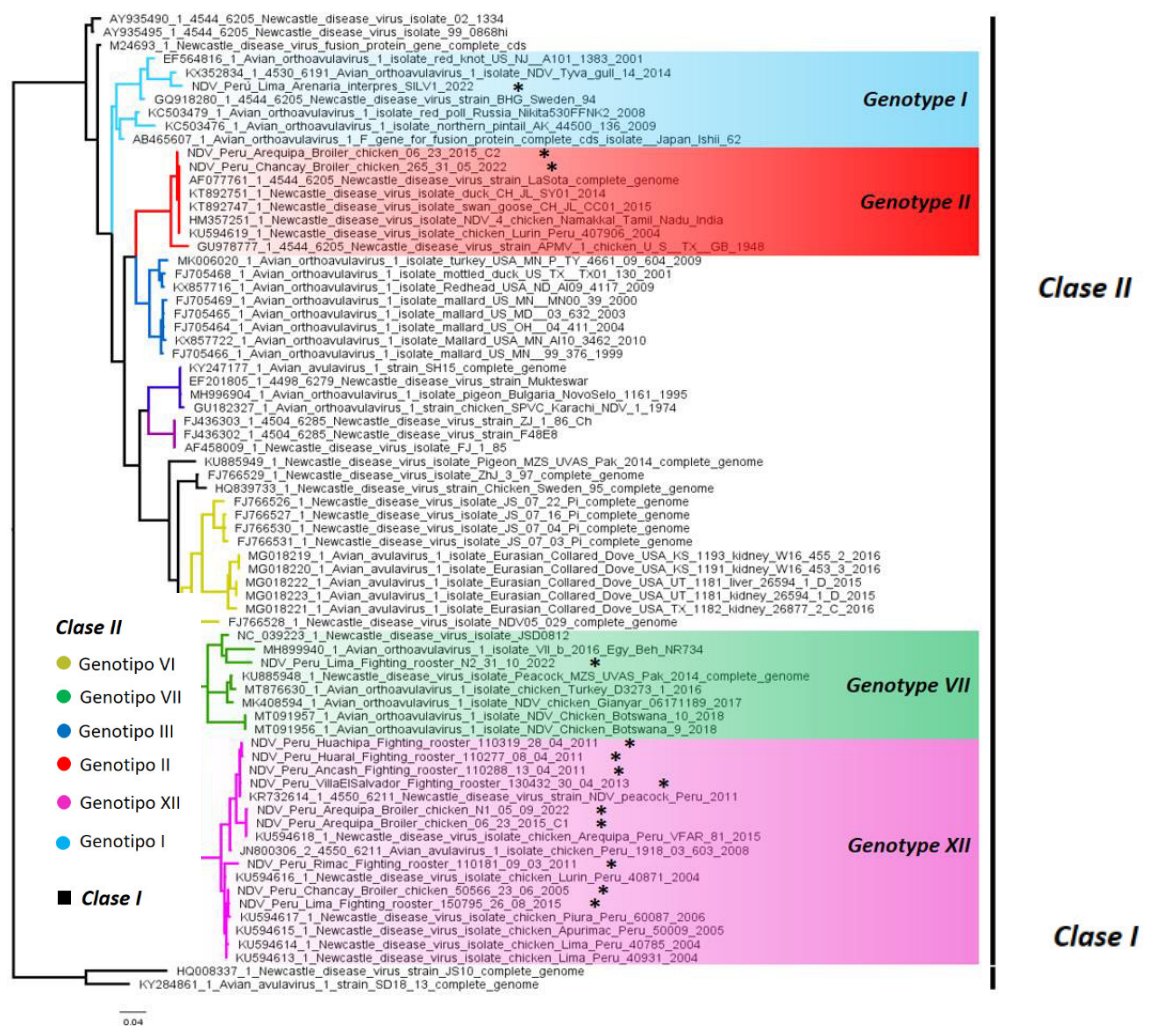


Figura 44. Árbol filogenético de los aislados de Paramyxovirus aviar-1 obtenidos de aves domésticas y silvestres en el Perú.

El análisis del genoma completo de los aislados de aves domésticas mostró cambios frecuentes en aminoácidos principalmente en los genes HN y F, mientras más bajo fue el porcentaje de identidad con las secuencias de referencia, se observaron más cambios de aminoácidos. Por ello se consideró detallar los aminoácidos mutados en los virus con porcentajes de identidad mayores a 98%. El cuadro 27 muestra las modificaciones en los genes NP, P, M, F, HN y L de seis aislados de aves domésticas que tuvieron un porcentaje de identidad mayor a 98%.

Cuadro 27. Cambios aminoacídicos encontrados en los genes NP, P, M, F, HN y L de seis aislados de aves domésticas que tuvieron un porcentaje de identidad mayor a 98% con sus correspondientes cepas de referencia del mismo genotipo.

Año	Pb	Cov %	Identidad %	Ref	País	Genotipo	Modificaciones					
							NP	P	M	F	HN	L
2005	15192	99	98.26	JN800306.2	Perú 2008	XII.1	NP:V33I	P:S61A P:P76S P:T93I P:Y149H P:S159N P:I170V P:S190L P:T230M P:I306V P:T341A	M:I26V M:D100N M:R101G M:I115V M:N116T M:A285V	F:L28M F:S36P F:I50V F:S90T F:S341A F:L386I F:I491V F:A509V	HN:A4T HN:S28A HN:K65E HN:I102V HN:R280Q HN:R282H HN:I316V HN:V373L HN:R380K HN:V453I	L:S142A L:L149P L:I171R L:N535S L:A1719T L:Q1971H L:I2050L L:T2056M L:I2094T
2011	15121	99	99.8	KR732614.1	Perú 2011	XII	NP:R82Q NP:S128F NP:G423S	NO HAY	M:R19S M:E195K	F:T350I	HN:I219V HN:K259E	L:P448S L:P829S L:N1100H L:P2149L
2013	15257	99	99.32	KR732614.1	Perú 2011	XII	NP:R82Q NP:S128F NP:G423S NP:T434M	NO HAY	M:R19S M:G101R M:R183K M:E195K	F:K321R F:T350I F:I390V	HN:K7E HN:I219V HN:K259E HN:P315S HN:T443A HN:K523R HN:D569A	L:D320N L:D448S L:P829S L:P2149L
2015	15172	99	99.93	MW285793.1	Suecia 2011	II	NO HAY	P:L30P	NO HAY	NO HAY	NO HAY	L:V1636M L:A1862V
2015	151 92	98	98.14	JN800306.2	Perú 2008	XII.1	NP:V33I	**falta secuencia P:T93I P:Y149H P:S159N P:I170V P:S190L P:T230M P:S190L P:T230M P:I306V P:T341A	M:I26V M:D100N M:R101G M:I115V M:N116T M:R247K M:A285V	F:A20L F:L28M F:S36P F:I50V F:S90T F:S341A F:L386I F:I491V	HN:A4T HN:S28A HN:K65E HN:I102V HN:R280Q HN:R282H HN:I316V HN:V373L HN:R380K HN:V453I	L:S142A L:L149P L:I171R L:N535S L:A1719T L:T1721I L:Q1971H L:V2047M L:I2050L L:T2056R L:N2057T L:I2094T
2022	15201	99	99.91	EU546165.2	Perú 2011	II	NP:P485T	NO HAY	M:G29D	F:K4R F:R27C F:V547M	NO HAY	L:A1862V

El resumen de los genotipos virales detectados en las 23 cepas de Paramixovirus aviar aisladas de aves domésticas y ocho cepas de aves silvestres, se muestran en el cuadro 28.

Cuadro 28. Resumen de genotipos virales identificados en la familia Paramixoviridae, subfamilia Avulavirinae, por tipo de ave y procedencia.

Familia			Paramixoviridae				
Subfamilia			Avulavirinae				
Género			Orthoavulavirus-1				Metaavulavirus
Genotipo			XII	VII	II	I	
Tipo ave	Código	Procedencia					
Postura	040369	Puente Piedra	X				
	040796	Lurín			X		
	0600087	Piura	X				
Riña	040785	Barranco	X				
	040871	Lurín	X				
	040931	La Victoria	X				
	110181	Rímac	X				
	110277	Huaral	X				
	110288	Ancash	X				
	110319	Huachipa	X				
	130432	Lima Villa Salvador	X				
	150795	Lima Cercado	X				
Engorde	221003	Ate		X			
	040869	Huacho				X	
	050009	Apurímac	X				
	050566	Chancay	X				
	15009506	Arequipa 1°	X		X		
	15009787	Arequipa	X				
	22001165	Rio Seco-Huaral			X		
Traspatio	22008463	Arequipa	X				
	040642	Huachipa	X				
Silvestres	110511	Pavo real Pachacamac	X				
	2007	Pato gargantillo				X	
	2007	cormorán				X	
	2007	Pato colorado				X	
	2007	Garza blanca				X	
	2009	Pato gargantillo				X	
	2009	Gaviota gris				X	
	2022	Vuelve piedra				X	
	2022	Chorlito					X

V. DISCUSION

5.1 ENSAYO A: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE PARAMIXOVIRUS AVIAR EN AVES SILVESTRES DEL PERU.

En el Perú, hasta antes de la introducción del virus de Influenza aviar H5N1 de alta patogenicidad en el año 2022, la ENC era la principal enfermedad limitante para la producción avícola nacional, a pesar de esta situación, la ENC continúa siendo una de las enfermedades de mayor importancia para el país, porque, aun cuando las aves domésticas de crianza comercial tienen que ser vacunadas en el país, de acuerdo con la ley decretada por el gobierno (SENASA, 2003), siguen ocurriendo brotes en aves riña, y en algunos lotes de aves comerciales tal como se consigna en los reportes de la enfermedad en el Perú durante los años 2018 y 2019 (WOAH, 2021), y en las estadísticas de nuestro laboratorio. Por lo tanto, esta enfermedad representa un constante riesgo para la industria avícola, que es quien provee a la población peruana de la principal fuente de proteína animal como son carne de pollo y huevos. Por otro lado, el Perú registra uno de los consumos más alto de carne de ave y huevos en Latinoamérica, con un consumo per cápita de 55 kilos de carne de ave y, 236 huevos al año (APA, 2023).

Aun cuando desde el punto de vista antigénico, es conocido que todas las cepas del virus de la ENC pertenecen a un solo serotipo (APMV-1), históricamente se ha reconocido una diversidad genética entre los virus aislados a lo largo del tiempo, habiéndose clasificado, según la secuencia de nucleótidos y la longitud del genoma, en dos grandes grupos, los virus de clase I y los de clase II; siendo los virus de clase I los que circulan en el mundo en aves silvestres acuáticas y playeras (Diel et al., 2012). Se considera que los virus de clase I, son menos diversos por eso están comprendidos dentro de un solo genotipo y patotipo de baja virulencia, mientras que los de clase II son de genotipos muy diversos; actualmente son reconocidos XXI genotipos, con diversos patotipos existiendo cepas de alta, mediana o baja virulencia (Afonso, 2021).

Considerando estas dos grandes clases de virus y los principales huéspedes de cada uno de ellos, el presente trabajo tuvo dos objetivos principales, por un lado el monitoreo de aves silvestres de la costa peruana y el análisis genómico y patogénico de los virus aislados; y por otro lado el análisis patogénico y genético de las aislados en aves domésticas obtenidos de casos clínicos sospechosos de la enfermedad, recibidos a través del tiempo con fines de diagnóstico en el LAP, para con ambos resultados conocer que poblaciones del virus circulan en ambos grupos de aves en el Perú, y analizar la posibilidad de encontrar eventos evolutivos que permitan determinar si

las aves silvestres constituyen los principales reservorios y fuentes de contaminación para la industria avícola en el Perú.

Desde su reconocimiento por primera vez en el Asia en 1926, la diseminación del virus de la ENC en el mundo ha sido atribuida a aves silvestres columbiformes y a psitácidas de importación, (Miller y Koch, 2020). Con estos antecedentes en primera instancia, nuestro estudio estuvo orientado a identificar fuentes posibles de introducción del virus a las aves domésticas de traspatio, riña y de crianza tecnificada y, a conocer el rol que representan en el Perú, las aves silvestres como reservorios de virus virulentos de la enfermedad de Newcastle. Por ello, como primer objetivo se realizó, una vigilancia activa continua en aves silvestres del Perú, para determinar la presencia del virus en este tipo de aves durante los últimos 15 años; el estudio comprendió la colección de muestras de heces frescas de aves silvestres desde el año 2007 hasta el 2022 y el análisis genómico y de patogenicidad de los aislados obtenidos durante este tiempo, que justamente corresponde con los años de mayor presentación de casos de enfermedad de Newcastle diagnosticados en nuestro laboratorio.

Se ha señalado que la presencia de granjas avícolas comerciales y de traspatio cercanas a cuerpos de agua y en la ruta de vuelo de aves migratorias, pueden crear la oportunidad de un intercambio de poblaciones de virus entre estas aves, pudiendo actuar como reservorios y mediadores de infecciones entre aves comerciales, aves de traspatio y aves migratorias (Sánchez, 2011). Y es justamente que la avicultura peruana se encuentra concentrada a lo largo de toda la costa del océano pacífico en una localización próxima al hábitat y recorrido de las aves silvestres acuáticas residentes y migratorias. Por ello, el primer ensayo del estudio comprendió el análisis de 6393 muestras de heces frescas procedentes de 22 diferentes especies de aves silvestres, que fueron colectadas durante los años 2007 al 2022 en seis humedales de la costa peruana (Lagunas de Puerto Viejo, Pantanos de Villa, Laguna El Paraiso, La Albúfera de Medio Mundo, la playa Chancay y la playa de Piura), humedales que se encuentran cercanos a la mayoría de planteles avícolas de aves de postura y pollos de engorde, estas zonas constituyen las principales áreas de descanso y alimentación de aves que llegan principalmente desde el continente americano y desde los Andes (Lannacone et al., 2010).

De las 6393 muestras de aves silvestres colectadas durante los años 2007 al 2022, se obtuvieron 31 aislados de Paramixovirus aviaries, en 11 de las 22 especies de aves silvestres que fueron comprendidas en el estudio, este resultado demuestra una muy baja circulación del virus (0.49%), en las aves silvestres de las especies con mayor numero de muestras analizados en el presente estudio como fueron: las gaviotas (1617), cormoranes (1278), patos silvestres (946) y pelicanos (677), en nuestro país. El aislamiento viral fue realizado en embriones de pollo SPF, por lo que por el tiempo de muerte del embrión se pudo determinar que los 31 aislados fueron del tipo lentogénico. Las pruebas de HA e HI identificaron que 30 aislados fueron positivos a Paramixovirus aviar-1 y uno negativo a este género; el secuenciamiento por NGS permitió

identificar a este último como un miembro de la misma familia paramixoviridae, subfamilia avulavirinae pero del género Metaavulavirus, constituyendo la primera detección en el Perú de un virus de este tipo. Por otro lado, el secuenciamiento del gen de Fusión, identificó el genotipo I de la clase II que corresponde con las cepas avirulentas no patogénicas. Se considera que tanto los virus de clase I como los lentogénicos de clase II son comunes en aves silvestres, acuáticas y playeras; mientras que los virus virulentos son capaces de diseminarse en aves domésticas en el mundo y ocasionalmente infectar a aves silvestres (Afonso, 2021). La ausencia de patogenicidad de los aislados de aves silvestres fue confirmada por la prueba biológica de Índice de Patogenicidad Intracraneana (IPIC), que fue realizada en 05 de los 30 aislados de Paramixovirus aviar -1, y en el aislado identificado como Metavulavirus, obteniéndose en todos los casos un IPIC con un valor de 0 que corresponde con los virus avirulentos. Por otro lado, la no patogenicidad de diecisiete aislados también fue confirmada por una prueba de RT-PCR triple de un solo paso que amplifica una región del gen F, que al mismo tiempo identifica al virus y determina si es virulento o no (Wang *et al.*, 2001), nueve aislados fueron analizados con una porción del gen de fusión, seis por el gen F completo y, dos aislados por secuenciamiento del genoma completo.

Existen pocos estudios disponibles en América sobre detección del virus de la ENC en aves silvestres, pero si existen reportes de brotes de la enfermedad en aves silvestres en algunos países como los ocurridos en cormoranes en Chile, por un virus del genotipo V (Moreno *et al.*, 2009), y en Norteamérica por un virus del genotipo XIX (Diel *et al.*, 2012), en ambos casos los virus aislados tuvieron un valor de IPIC que corresponde con las cepas de tipo mesogénico; cabe señalar que en estos países la enfermedad de Newcastle no es endémica como si lo ha sido en el Perú, Colombia y otros países latinoamericanos; lamentablemente existen pocos reportes de vigilancia activa en aves silvestres en países que sufren de brotes con virus virulentos en aves domésticas, por lo tanto, no se conoce bien cuál es el rol que cumplen las aves silvestres en la presentación de brotes de la ENC en aves domésticas. Se ha señalado que los virus de virulencia intermedia, como son los de tipo mesogénico, se mantienen en aves silvestres y son aislados con en cormoranes de doble cresta en Norteamérica, pero que ocasionalmente infectan pelícanos y gaviotas cercanas a cormoranes, asimismo se señala que los fenotipos neurotrópicos meso y velogénicos de los virus de los GVI y XXI se aíslan preferentemente de palomas domésticas y otras aves silvestres (Afonso, 2021).

Un brote más reciente fue reportado en palomas en Brasil en el año 2018, en donde fueron analizadas palomas moribundas que presentaban depresión y signos neurológicos de torticollis, el análisis histopatológico determinó meningoencefalitis grave con manguitos peri vasculares y gliosis, la prueba de RT-PCR dirigida al gen M dio positivo a virus de la ENC, la caracterización genética por NGS y filogenia identificaron la secuencia RRQKRF que corresponde con los virus virulentos, y agruparon al aislado del 2018 dentro de los virus de clase II, subgenotipo VI.2.1.2,

al igual que dos aislados de palomas de Brasil obtenidos en los años 2014 y 2019 (Pereyra Mr et al, 2022). Ha sido reportado que la mayoría de virus del genotipo VI proceden de palomas y tienen valores de IPIC menores a 1.5 que corresponde con las cepas de mediana patogenicidad de tipo mesogénico (Alexander et al., 1985). En nuestro estudio no se logró aislar ningún aislado patógeno del tipo meso o velogénico en aves silvestres, tampoco nunca han sido aislados virus patógenos de la ENC en palomas en el Perú, sin embargo, los programas de vigilancia de rutina deben continuar para contribuir al conocimiento de los virus que circulan en aves silvestres y conocer los factores de riesgo asociados a este tipo de aves en nuestro país.

Observaciones de campo en nuestro país, sugieren una asociación entre legalidad para la pelea de aves de riña en determinados países, y ocurrencia de brotes en aves domésticas. Por lo tanto, las diferencias de patogenicidad de virus aislados en aves silvestres en el Perú muy probablemente serían debidas a que, a diferencia de nuestro país, en Chile, Estados Unidos y Canadá, no son legales las peleas de aves de riña, haciendo que el virus busque la manera perpetuarse, aunque sea en aves menos susceptibles como son las aves silvestres con virus de menor patogenicidad. Se ha demostrado que muchos criadores de aves de combate, se resisten a vacunar a sus aves, por la creencia que la vacunación disminuye el vigor de las aves para la pelea, es así que un estudio nuestro previo (Ferrer et al., 2008), se demostró que el 48% de las aves de riña, no estaban vacunadas y presentaban títulos de anticuerpos compatibles con una exposición de campo, haciendo una prevalencia de $9.9 \pm 3.2\%$, lo cual indica que las aves de combate constituyen un factor de riesgo de brotes por virus patógenos en el Perú, sobre todo teniendo en cuenta que los criaderos se encuentran ubicados en áreas rurales, rodeando a las zonas avícolas. Estos resultados coinciden con lo señalado por Hussein et al., 2002, quienes atribuyeron los brotes de ENC en Irán a la ausencia de vacunación y a factores como el contacto entre aves silvestres y traspatio.

Si bien es cierto que, en comparación a las aves silvestres, las aves de riña constituirían un mayor riesgo de introducción del virus patógeno de la ENC a la industria avícola en nuestro país, hay que considerar lo señalado por Sánchez BF (2011), quien indica que el riesgo asociado a la tasa de sobrevivencia del virus en aves silvestres es muy alto, y esto debido a la naturaleza de infección subclínica que normalmente ocurre en aves silvestres. Esto significa que, las aves con infecciones subclínicas o asintomáticas eliminan baja carga viral, pero eliminan el virus por un tiempo más prolongado. En el mismo estudio Sánchez BF (2011) determinó que el riesgo relativo de introducción del virus de la ENC por aves silvestres en España fue muy bajo, con una incertidumbre alta, pero por una razón que no se refiere a pelea legal de aves de riña, sino a que el riesgo que representan las aves silvestres para la ENC depende de los países de donde proceden las aves silvestres migratorias.

Sorprendentemente, aun cuando se considera que las aves acuáticas son más resistentes y refractarias a la infección natural (Kim et al., 2007), en nuestro estudio, las aves silvestres que presentaron la mayor frecuencia de aislamientos de paramixovirus aviar, fueron los patos de la especie *Anas bahamensis*. Ha sido reportado que los patos tienen una condición que favorece la diseminación viral, debido a que cuando están infectados, tienen una larga tasa de sobrevivencia a la infección, comparado con otras especies de aves silvestres, siendo, además, la infección mayormente de tipo silenciosa (Onapa et al., 2006). Por otro lado, es muy difícil de determinar el porcentaje de muestras analizadas con relación a la población de aves silvestres en el país, como también es muy difícil tener un dato exacto o aproximado de esta población, sin embargo, una publicación reciente indica que en el Perú existen 1875 especies de aves silvestres, dentro de los cuales los principales tipos son: 1523 residentes, 134 migratorias y 60 divagantes; de ellas, 500 viven en ambientes acuáticos (Pulido Capurro V y col, 2021).

En conclusión, nuestros resultados demuestran que las cepas que circulan en las aves silvestres del país representan muy bajo riesgo como fuentes de contaminación y de brotes para aves domésticas, al haber detectado 0.49% de aves positivas a Paramixovirus aviar-1, y no detectarse virus virulentos.

5.2 ENSAYO B: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE PARAMIXOVIRUS AVIAR EN AVES DOMÉSTICAS DEL PERU

En el ensayo B se realizó el análisis clínico, genómico y patogénico de los virus aislados de aves domésticas recibidas con fines de diagnóstico en el LPA. El análisis del genotipo de 23 aislados virales obtenidos en aves domésticas desde el 2004 hasta el 2022, determinó que once fueron del genotipo XII, siete del genotipo XII.1, tres del genotipo II, una del genotipo I y, solo un aislado obtenido de un brote de aves de riña en Ate-Lima el año 2022 fue identificado como VIIId, siendo el primer hallazgo de un virus con este genotipo en nuestro laboratorio. Estos resultados demuestran que dentro de los virus virulentos en el país existe un predominio del genotipo XII, seguido del XII.1 y al final VIIId.

La primera caracterización e identificación del genoma de un virus del genotipo XII fue realizada con un aislado peruano del virus de la ENC, que fue remitido por las autoridades del gobierno (SENASA) a la USDA para su identificación, resultados que fueron publicados por Diel et al. (2012), quienes encontraron diferencias genómicas y de aminoácidos que distinguían al

aislado peruano de los once genotipos virales que habían sido identificados hasta ese momento, pero en la inoculación experimental encontraron que dicho aislamiento producía en las aves, los mismos signos clínicos y lesiones característicos de los virus velogénicos viscerotrópicos de la ENC. Todos los aislados obtenidos de brotes en aves de riña fueron del tipo virulentos, por ello en todos los casos mostraron un cuadro clínico característico de aves sin protección, observándose signos neurológicos y lesiones hemorrágicas en los agregados linfoides del tracto intestinal, características de aves sin protección inmune y que evidencia una baja cobertura de vacunación en aves de combate en el país, tal como fue reportado por R Ferrer, 2008, quien encontró que el 52.8% de las aves de riña en Lima metropolitana no eran vacunadas, este hecho se ve también reflejado en el gran número de casos positivos registrados en aves de riña a través del tiempo, tal como consta en los archivos del LAP, y que determina la condición de la ENC de enfermedad endémica en nuestro país.

Resultados similares fueron reportados en un estudio previo realizado en el Perú por Conza (2012), quien amplificó y secuenció una región del gen de fusión, de 13 aislados obtenidos a partir de muestras colectadas por el laboratorio oficial de SENASA en diferentes regiones del país entre los años 2009 y 2011, se encontró que todas los cinco aislados de aves de riña fueron del tipo virulento; mientras que siete de los ocho restantes, cinco procedentes de aves de traspatio y dos de aves de industria, fueron del tipo lentogénico, no virulento. Por otro lado, los resultados de Conza (2012) identificaron a todos los aislamientos virulentos, cinco de riña y uno de traspatio, como genotipo VII; en dicho estudio no se detectó ninguno del genotipo XII que es el de mayor frecuencia de detección en este estudio y en el de Diel et al. del 2012. Los resultados diferentes posiblemente sean consecuencia del pequeño tamaño del fragmento amplificado (373pb) y a la región secuenciada en el estudio de Conza (2012).

El LAP, constituye un gran apoyo al conocimiento de la problemática sanitaria del país, porque recibe diariamente numerosos casos de aves domésticas de crianza tecnificada, traspatio, riña y aves mascotas, por ello el análisis de los registros de la casuística, permite conocer con mucha aproximación, la situación sanitaria de las enfermedades en aves en el país. Es así que el reporte sobre análisis de casos de ENC diagnosticados en el Laboratorio durante los años 1990 a 2005 (Mora, 2005), se evidencia una presentación cíclica de la enfermedad, con picos muy elevados de casos con aislamiento viral positivo, durante los años 1990, 1995-1996 y, 2003-2004-2005-2006. La gran ocurrencia de brotes durante ese tiempo, motivó a que muchos profesionales de campo con actividad en la avicultura, reforzaran el programa de vacunación contra la ENC en zonas de alto riesgo, incluyendo en sus programas una vacuna más en campo con cepa viva La sota a pollos de engorde; asimismo en otro estudio, se demostró una significativa mejora en la protección en pollos de engorde al aplicar una vacuna inactivada como refuerzo al programa de

vacunación con vacunas vivas (Silva, 1995), como consecuencia de esto, en muchos planteles de postura, donde estaban ocurriendo brotes a temprana edad con altas mortalidades, fue incluida una vacuna inactivada en las dos primeras semanas de vida, además de la que se aplica comúnmente al final del levante antes del inicio de la producción de huevos. Con la implementación de estos programas de vacunación reforzados, durante unos años se logró una notoria disminución de brotes de la enfermedad en pollos de engorde y aves de postura comercial en nuestro país, sin embargo, la casuística nuevamente hizo un pico en los años 2011 y 2015, emergiendo virus aparentemente más virulentos que ocasionaban incluso severa hemorragia en la Bursa de Fabricio, tal como se puede observar en al menos tres de los casos de este estudio.

Las fluctuaciones y picos de casos positivos, también se vieron reflejados en los resultados de RT-PCR en tiempo real, con un aumento de positivos registrados en el LAP durante los años 2015 al 2018 en comparación con los últimos años (2019 al 2023), evidenciándose además un incremento en la demanda de diagnósticos por PCR, que coincide con los programas de vacunación fuertes que incluyeron la aplicación de una vacuna inactivada a pollos de engorde y que por lo tanto exigen una vigilancia genómica que facilite demostrar lo mas pronto posible, la circulación del virus en los planteles avícolas vacunados. Otro aspecto que vale la pena señalar, es que desde hace algún tiempo, tuvimos que variar el método de diagnóstico por PCR en tiempo real para ENC que veníamos usando para aves de crianza industrial, por lo cual dejamos de usar la curva de melting para determinar virulencia de las cepas detectadas al PCR (Pham Het al, 2005), debido a que notamos que las temperaturas de melting de las muestras positivas a virus velogénicos no calzaban exactamente con el control positivo velogénico respectivo como si lo hacían inicialmente, por tal razón, nos vimos obligados a inocular huevos embrionados SPF con las muestras positivas al PCR y confirmar su virulencia mediante el tiempo de muerte del embrión, este hecho nos hace pensar que de alguna manera ocurrieron cambios genéticos del virus en el tiempo.

Los aislados de virus de la ENC obtenidos en nuestro laboratorio a lo largo del tiempo, son conservados en congelación a -80°C; por tal motivo, para comprender mejor la epidemiología de la enfermedad y la posible evolución viral, se decidió analizar y caracterizar los virus conservados obtenidos en diferentes tiempos. El primer estudio de caracterización molecular en nuestro laboratorio, lo realizamos en el año 2015 con un aislado obtenido de un pavo real de un zoocriadero localizado en Pachacamac - Lima, el aislado fue identificado como viscerotrópico velogénico del genotipo XIIa, el mismo genotipo que el aislado peruano de aves de riña identificado por Diel en el 2012 (Chumbe et al., 2015). Posteriormente en el año 2015, la ocurrencia de brotes muy severos de la ENC en pollos de engorde del departamento de Arequipa y en aves de riña en Lima, motivó un uso más generalizado de la vacuna inactivada para reforzar

los programas de vacunación de pollos de engorde, actualmente es común en el Perú, la aplicación en planta de incubación de una vacuna inactivada bivalente contra la ENC y la hepatitis a cuerpos de inclusión. En el año 2017 se caracterizaron genéticamente siete aislados más del virus de la ENC, obtenidos de aves domésticas durante los años 2004, 2005, 2006, 2011 y 2015, analizando la secuencia completa del gen de Fusión (1662pb); tres aislados fueron procedentes de aves de riña, dos de aves ponedoras comerciales y dos de pollos de engorde. Los resultados del análisis del gen completo de Fusión identificaron a seis de los siete aislados como genotipo XII, tres procedentes de aves de riña, dos de pollos de engorde y uno de aves postura, todos correspondientes con los virus velogénicos viscerotrópicos de alta virulencia; además un aislado de aves de postura fue identificado como genotipo II, que corresponde con los virus lentogénicos de tipo vacunal, no virulentos (Chumbe et al., 2017).

Adicionalmente, fueron analizados seis aislados virales mas, obtenidos entre los años 2004 al 2011, donde se logró recuperar solo una porción del gen F (de entre 538 a 749pb), que permitió por comparación (BLAST) identificar el genotipo viral de dichos aislados, cinco virulentos, uno de aves de postura XII.1, uno de aves criollas XII y tres de aves de riña XII; además en pollos de engorde se identificó uno de clase II genotipo I, no virulento. Los últimos análisis fueron realizados durante los años 2022 y 2023 mediante secuenciamiento de genoma completo a partir del fluido alantoideo de embriones SPF inoculados con muestras de casos clínicos ocurridos durante los años 2005, 2011, 2013, 2015 y 2022. Los resultados mostraron que seis aislados presentaron una secuencia de SGGRRQKR*FI en las posiciones 113 al 117 de la región de clivaje de la proteína F, que corresponde con virus virulentos, mientras que los dos restantes mostraron una secuencia de SGGGRQGR*LI, propia de los virus avirulentos.

Los resultados del estudio mostraron que todos los aislamientos de aves de riña fueron del tipo virulento, pero de diferentes genotipos: dos fueron identificados como XII, uno como XII.1 y uno como VIIId. Contrariamente en los pollos de engorde fueron detectados dos aislados no virulentos, ambos del Genotipo II, uno de un caso de pollos de engorde que fue remitido al laboratorio para evaluación intestinal para coccidias sin mostrar signos compatibles de la ENC, pero que se consideró sospechoso porque a la necropsia se observaron hemorragias en el proventrículo de dos aves, este hecho nos indica que aun cuando se considera que las lesiones hemorrágicas y necróticas en los agregados linfoides del tracto intestinal, son propias de aves infectadas con las cepas velogénicas viscerotrópicas del virus de ENC (Miller y Koch, 2020), causas diferentes a infecciones por virus velogénico viscerotrópico de la ENC pueden ocasionar tales lesiones, esto es refrendado por las observaciones de necropsia de casos recibidos en el LAP durante los últimos años, donde con más frecuencia se observan hemorragias en proventrículo,

principalmente por intoxicaciones de diversa índole y, por lo tanto, resaltan la necesidad de un diagnóstico definitivo con RT-PCR y/o aislamiento viral en poblaciones de aves vacunadas.

Gracias al secuenciamiento del genoma completo se pudo detectar al mismo tiempo dos aislados diferentes en un mismo caso de pollos de engorde, un virus del genotipo II vacunal y, un virus virulento del genotipo XII; esta doble contaminación detectada sugiere que las aves fueron vacunadas inmediatamente o a los pocos días de ser infectadas con el virus virulento de campo. Esto es porque es conocido que el virus de la ENC es un potente inductor de interferón tipo 1, citoquina que constituye la primera línea de protección inmune contra la infección viral; el ácido nucleico del virus es reconocido por los receptores de reconocimiento de pollos MDA5 y TLR, dando lugar a la activación intracelular de factores de transcripción, como, el factor 7 regulador de interferón (IRF7), NF- κ B y AP-1, resultando en la inducción de IFN tipo 1 por la célula huésped; hasta la fecha se han reconocidos tres subtipos de interferón en pollos: IFN- α , IFN- β y IFN-K (Anjum et al., 2021; Zhang et al., 2023), por esta razón una práctica de algunos profesionales de campo, es la de aplicar una vacuna viva con cepa La sota a las aves de un galpón en pleno brote, tomando esta decisión como una medida terapéutica de emergencia de “interferencia vacunal” que equivaldría a interferir con la propagación del virus virulento en las aves que aún no fueron infectadas dentro del mismo galpón.

Los resultados del ensayo B muestran que todos los aislados que proceden de aves de riña fueron del tipo virulento, y que estas aves son infectadas con virus de distintos genotipos, siendo un potencial reservorio de virus patógenos, y debido a la constante movilización e intercambio de animales entre criadores que ocasiona repetido contacto directo entre humanos y aves domesticas, las aves de riña constituyen el principal riesgo como fuente de contaminación para las aves de crianza industrial en el país.

Aun cuando desde hace algun tiempo, como consecuencia de la aplicación de programas vacunación fuertes que incluyen vacunas vivas y/o en emulsión oleosa, se han reducido las pérdidas ocasionadas por la morbilidad y mortalidad por la ENC, continuamente son reportados brotes de la enfermedad en aves vacunadas del mundo, que incluyen los países de América, Europa y principalmente Asia, Medio Oriente y África (Sahoo et al., 2022). Se considera que la enfermedad de Newcastle es endémica en algunos países de América Latina debido a factores comunes de tipo cultural, socioeconómico, y epidemiológico que contribuyen al mantenimiento del virus, quiebra de bioseguridad y a la presentación de brotes; uno de los factores es la falta de un sistema de vigilancia y diagnóstico; asimismo, la presencia de zonas con numerosas granjas avícolas cercanas a crianzas de aves de traspatio, movimiento de personal, equipos y vehículos, que sugieren además una transmisión horizontal por el aire. Por otro lado, se indica que, en la mayor parte de países de América Latina, Asia y África, no existen programas

de compensación económica ante la eliminación de las aves con fines de erradicación, lo que da lugar a la no notificación; incluso, en algunas ocasiones los pequeños criadores para evitar las pérdidas por mortalidad aceleran la venta de las aves aparentemente sanas, y la cama como abono, contribuyendo a la diseminación del virus a otras áreas geográficas (Absalon et al., 2019).

Otro factor que posiblemente contribuye a la presentación de brotes por virus velogénicos en el Perú, es que durante los últimos años, por razones de bienestar humano, no se permite a los trabajadores y obreros vivir dentro del área de la granja, sino estos deben vivir en sus viviendas en el pueblo, trasladándose diariamente a su centro de trabajo en la granja, esta situación aumenta el riesgo de contacto del personal con aves de riña, traspatio, sea de crianza propia, vecinos o parientes, o con materiales contaminados principalmente guano de chacras. Por ello, una medida tomada por algunas grandes empresas fue la de implementar dentro de sus procedimientos de bioseguridad, censar y vacunar a las aves de traspatio ubicadas en un radio del entorno y, la prohibición de crianza de aves por parte de los trabajadores, aprovisionándolos con aves y huevos para su alimentación. Asimismo, los programas de vacunación contra la ENC en aves de traspatio y riña realizados en algunas zonas por el gobierno han dado buenos resultados en el control de brotes.

Aun cuando la mayoría de los virus velogénicos de la Enfermedad de Newcastle aislados en el mundo pertenecen a los genotipos V, VI, IX y VII, se considera que este último genotipo es el de mayor distribución mundial y el mas diverso en cuanto subgenotipos, el VII fue inicialmente dividido en dos subgenotipos VIIa y VIIb, pero posteriormente fue subclasificado en varios subgenotipos virales más: VIIc, VIId, VIIe, VIIh y VIIi, aislados en China y, VIIf, VIIg, VIIj aislados de África (Sultan et al., 2020). Tal como ya se mencionó, dentro de los virus virulentos en el Perú se encontró un predominio del XII, seguido del XII.1, solo en uno de los 21 casos del estudio fue detectado un virus del GVIIId, siendo el más reciente y el primero identificado en el LPA. El primer reporte de la presencia de un virus virulento del genotipo VII de la ENC en sud américa fue realizado con un aislamiento obtenido en el 2008 de brotes de la enfermedad en Venezuela, el aislado tuvo un IPIC de 1.86 que corresponde con alta virulencia (Perozo et al., 2012). Posteriormente, un estudio realizado por investigadores del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y un grupo canadiense, reprotaron la caracterización genética de 24 aislados del virus de la ENC procedentes de brotes en aves de traspatio y comerciales en Colombia entre los años 2008-2010, los aislados fueron identificados dentro de la clase II y agrupados en cuatro diferentes genotipos, doce virulentas y doce lentogénicos no virulentos. Los virulentos fueron diez del genotipo VIId y dos del genotipo XII; Los no virulentos fueron siete del genotipo II y cinco del genotipo I (Berhane, Y et al, 2017). Estos reportes de Colombia tienen entre los países sudamericanos, la mayor similitud de resultados con los de este estudio, y

evidencian una diversidad genética similar entre los dos países, posiblemente asociada a una similitud de factores culturales, dentro de ellos una alta población de crianza de aves de riña y la legalidad de peleas de gallos, así como al transporte ilegal de aves y sus productos.

También se ha atribuido la ocurrencia de brotes en países endémicos, al uso de vacunas vivas e inactivadas que contienen genotipos antiguos, que no logran reducir la replicación y eliminación del virus virulento de una manera óptima en aves vacunadas cuando las prácticas de bioseguridad son insuficientes (Absalon et al., 2019), esta afirmación posiblemente se basa en publicaciones que reportan una mejora en la protección y una reducción en la eliminación viral con que el uso de vacunas recombinantes o inactivadas homólogas que contienen genes F y HN de las cepas de campo, en comparación con la vacunación heteróloga como es el usar la cepa La sota (Cardenas-Garcia S et al., 2015; Cho SH et al., 2008; Xiao S et al., 2012).

Por otro lado, entre los últimos reportes de la ENC registrados en América (WAHIS, 2023), se encuentran los de Belize de los años 2019, 20, 21 y 22, Colombia con brotes en aves de traspatio que fueron resueltos en agosto del 2022; Bolivia en domésticas y traspatio en Cochabamba en el 2021 y, República Dominicana en aves domésticas en el año 2019 (WOAH, 2021). En USA varios brotes ocurrieron en California en aves domésticas y traspatio, los mismos que fueron resueltos con despoblación y eliminación total de los lotes afectados en el 2020 (USDA-APHIS, 2021). Todos estos resultados demuestran la presencia de virus de la ENC en las diferentes regiones del mundo y resaltan la importancia y necesidad del monitoreo y vigilancia genómica que permitan determinar la circulación del virus y la probabilidad de evolución viral. No solo en algunos países americanos la enfermedad de Newcastle es un problema, en diversos lugares del Asia y África la enfermedad es endémica, habiéndose identificado múltiples genotipos virales (GI, IV, V, VI, VII XI, XIII, XIV, XVII, XVIII y XXI) (Sahoo et al., 2022). En Tanzania fueron detectados los genotipos V, VII y XIII mientras que en Ghana el XVIII, (da Silva et al., 2020). Por otro lado, últimos reportes señalan la recurrencia de la enfermedad de Newcastle erradicada en varios países en el mundo, como Noruega, Rusia, Israel, Suecia, Dinamarca y Polonia entre otros, habiendo reportado este último país, cuatro brotes en julio del último año, después que el último brote ocurriera en el año 1971 (WAHIS, 2023).

Aun cuando se considera que el virus de la enfermedad de Newcastle es un virus antigénicamente estable, por ello todas los aislados pertenecen a un solo serotipo, sin embargo, una diversidad antigénica y genética es observada entre aislados de genotipos distintos (Miller y Koch, 2020). El Dr C Afonso, 2021 en su estudio de mecanismos de adaptación y virulencia, hipotetiza que los virus virulentos emergieron de virus que circularon en los 40s y que estos son los progenitores de virus virulentos y, que los actuales se derivan de otros virus virulentos. El

análisis de concatenación para determinar los cambios de un solo nucleótido o SNPs obtenido del estudio bioinformático del genoma completo de los nueve virus peruanos aislados de aves domésticas y uno de ave silvestre, al compararlos con el aislado de referencia del genotipo I de Clase II, mostró alto grado de conservación genética entre los genotipos y su correspondiente aislado de referencia.

Se ha resaltado la gran capacidad de los virus de la ENC para infectar múltiples especies de aves, y que este hecho debe ir acompañado de una capacidad de adaptación a huéspedes específicos, a través de modificaciones en el genoma que además generen cambios en la virulencia (Afonso, 2021). El análisis del genoma completo de los aislados de aves domésticas en el LPA mostró cambios frecuentes en aminoácidos principalmente en el gen HN, que codifica la proteína relacionada con el ataque del virus a los receptores de la célula huésped que contienen el ácido siálico, que precisamente también determinan la susceptibilidad de numerosos huéspedes. Los aislados analizados fueron comparadas con uno de referencia de su mismo genotipo; los porcentajes de identidad de los dos aislados lentogénicos del genotipo II fueron muy altos, de 99.91 y 99.93%; los de los aislados de virus virulentos del genotipo XII fueron de entre 97.95 a 99.8%; solo un aislado, el de aves de riña del año 2022, del genotipo VII mostró un porcentaje de identidad ligeramente más bajo (95.18) cuando fue comparado con el aislado de Colombia del año 2010. En ningún caso los aislados obtenidos en el estudio mostraron bajos porcentajes de identidad genómica, que podría determinar diferencias antigénicas como ocurre con los virus inestables. Se ha reportado que los cambios genómicos que ocurren en los virus de la ENC están dirigidos a facilitar la replicación y adaptación al hospedador, y que dentro de los cambios más caracterizados está el de la región que codifica el sitio de clivaje de la proteína de fusión y los cambios puntuales que se derivan a un escape del sistema inmune o mayor replicación y transmisión (C Afonso, 2021). Por otro lado, también se ha señalado que la evolución de los virus de la ENC determina principalmente un incremento de virulencia o patogenicidad. Esto significaría que el análisis genómico que no debe faltar en estudios de vigilancia activa es el análisis del gen completo de fusión, y que posiblemente no sería necesario ni de rutina para este agente analizar el genoma viral completo como si es de necesidad hacerlo para virus de gran inestabilidad antigénica y de recombinación como son los virus Influenza aviar, bronquitis infecciosa y reovirus entre otros.

Los resultados en general obtenidos en el estudio han permitido demostrar que en el Perú las aves de riña portan virus virulentos de genotipos diversos, siendo los más comunes los del genotipo XII y que las aves silvestres portan virus no patogénicos del genotipo I. Además, se ha puntualizado sobre factores que contribuyen a la presentación de brotes en aves comerciales en nuestro país, dentro de ellos, la baja cobertura de vacunación en aves de riña, además de

factores culturales que atentan contra la bioseguridad. Es imprescindible lograr la erradicación de la enfermedad de Newcastle en el Perú, y esto será posible comprendiendo la epidemiología de la ENC, que incluye la vigilancia activa constante que permita el conocimiento de los principales reservorios virales y tipos de virus circulantes, para ayudar a implementar acertadas medidas de bioseguridad que incluyan la educación sanitaria de concientizar a todas las personas dedicadas a la crianza de aves domésticas, tanto la de tipo intensivo como la de traspatio y riña, para que se asegure una total cobertura de vacunación protectora e implementación de los mejores programas de bioseguridad para nuestras condiciones, con la participación y compromiso de todos los involucrados en la producción de carne y huevos, como son el gobierno, el empresariado y la academia.

VII. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las que se realizó este estudio se concluye:

1. Se obtuvo baja de frecuencia de infección (0.49%), en aves silvestres de las especies con mayor número de muestras analizadas en el presente estudio como fueron: las gaviotas (1617), cormoranes (1278), patos silvestres (946) y pelicanos (677), sin detección de virus virulentos en las 22 especies de aves silvestres comprendidas en el estudio procedentes de seis humedales de la costa peruana, en las cuales se detectaron solo virus no patogénicos del genotipo I.
2. Los virus virulentos detectados en aves domésticas pertenecen a los genotipos XII, subgenotipo XII.1 y subgenotipo GVII.d, evidenciando que en el Perú existe una diversidad genética de virus virulentos capaces de infectar a las aves domésticas, observándose un predominio de virus del XII.
3. Todos los virus detectados en aves de riña fueron del tipo virulento mostrando además que estas aves, portan la mayor diversidad de genotipos, por lo que constituyen la principal fuente de contaminación y reservorio del virus en el Perú, contrariamente las aves silvestres no portan virus no patogénicos, por lo tanto, representan un menor riesgo para la industria avícola del país.
4. Se han detectado virus lentogénicos en pollos de engorde y ponedoras comerciales con signos clínicos respiratorios y hemorragias en el proventrículo, ocasionadas por otras causas diferentes a la infección por virus virulento de la ENC.
5. La presentación de brotes en aves comerciales en nuestro país es consecuencia de una baja cobertura de vacunación en aves de riña y factores culturales que atentan contra la bioseguridad

VIII. RECOMENDACIONES

1. La vigilancia genómica y el diagnóstico definitivo que confirme la circulación o no de virus patógenos en planteles avícolas vacunados.
2. Continuar con los estudios de vigilancia activa clínica y genómica en aves domesticas de riña, traspato y comerciales que permitan implementar acertadas medidas de vacunación, bioseguridad, contribuyendo a la meta de erradicación de la enfermedad de Newcastle en el Perú.

IX. REFERENCIAS

1. **Abozeid HH, Paldurai A, Varghese BP, Khattar SK, Afifi MA, Zouelfakkar S, El-Deeb AH, El-Kady MF, Samal K. 2019.** Development of a recombinant Newcastle disease virus-vectored vaccine for infectious bronchitis virus variant strains circulating in Egypt. *Veterinary Research*, 50(1), 12–. doi:10.1186/s13567-019-0631-5.
2. **Absalón A, Cortés C, Lucio E, Miller PJ, Afonso CL. 2019.** *Epidemiology, control, and prevention of Newcastle disease in endemic regions: Latin America. Tropical Animal Health and Production.* Doi:10.1007/s11250-019-01843-z.
3. **Aldous EW, Mynn JK, Banks J, Alexander DJ. 2003.** A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol.* 2003 Jun;32(3):239-56. doi: 10.1080/030794503100009783. PMID: 12850913.
4. **Alexander DJ, Russell PH, Parsons G, Elzein A, Ballouh A, Engstrom B, Fevereiro M, Fleury A, Guittet M, Kaleta EF, Kihm U, Kusters J, Lomniczi B, Meister J, Meulemans G, Nerome K, Petek M, Pokomunski S, Polten B, Prip M, Richter R, Saghy E, Samberg Y, Spanoghe L, Tumova B. 1985.** Antigenic and biological characterisation of avian paramyxovirus type I isolates from pigeons - an international collaborative study. *Avian Pathology*, 14(3), 365–376. doi:10.1080/03079458508436238.
5. **Alexander DJ. 1989.** Newcastle Disease. In: *A Laboratory Manual for the Isolation Identification, and Characterization of Avian Pathogens. Third Edition.* H Graham Purchase, Lawrence H Arp, Charles Domermuth, James E Pearson. American Association of Avian Pathologists. University of Pennsylvania. New Bolton Center. Pp 114-120.
6. **Alexander DJ. 1991.** Newcastle disease and other Paramyxovirus Infections. In: *Disease of Poultry. Ninth Edition.* Ed Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM and Yoder HW Jr. Edit Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp 496-519.
7. **Alexander DJ. 1998.** Newcastle Disease. In: *A Laboratory Manual for the Isolation Identification, and Characterization of Avian Pathogens. Fourth Edition.* David E

Swayne, John Glisson, James E Pearson, Willie M Reed. American Association of Avian Pathologists. University of Pennsylvania. New Bolton Center. Pp 156-163.

8. **Alexander DJ. 2003.** Newcastle Disease and other Avian Paramixoviridae Infections. In: Disease of Poultry. 11th Ed. Saif, Barnes, Glisson, Fadly, Mc Dougald, Swayne (eds). AAAP Iowa State University- USA. Pp 63-87.
9. **Alexander DJ and D. A. Senne. 2008.** “Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses,” in A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens, Dufour-Zavala, D. E. Swayne and J. R. Glisson, Eds., pp. 135–141, American Association of Avian Pathologists, Jacksonville, Fla, USA, 5th edition.
10. **Afonso CL. 2021.** Virulence during Newcastle Disease Viruses Cross Species Adaptation. Viruses. 13, 110. <https://doi.org/10.3390/v13010110>.
11. **Al-Garib SO, Gielkens AL, Gruys DE, Hartog L, Koch G. 2003.** Immunoglobulin class distribution of systemic and mucosal antibody responses to Newcastle disease in chickens. Avian Dis 47(1): 32-40. Doi: 10.1637/0005-2086(2003)047[0032:ICDOSA]2.0.CO;2. PMID: 12713156.
12. **Anjum F, Rahman S, Aslam, Qureshi A. 2021.** Antiviral potential and stability analysis of chicken interferon- α produced by Newcastle disease virus in chicken embryo fibroblast cells. Veterinární medicína, 66(5): 197-207. Doi: 10.17221/106/2020-VETMED.
13. **APA. 2023.** Boletín Informativo, Asociación Peruana de Avicultura, Edición Julio 2022. [internet], [01 de agosto del 2022]. Disponible en: <https://apa.org.pe/portfolio-item/boletin-julio%202022/#:~:text=Asimismo%2C%20el%20consumo%20per%20c%C3%A1pita,de%20ave%20a%20la%20semana>.
14. **Bankowski RA, Reynolds B. 1975.** Persistence of velogenic viscerotropic Newcastle Disease Virus in Litter. Avian Disease. 19(3): 612-616. <http://www.jstor.org/stable/1589088>.
15. **Bashir M, Yusof K, Ilderis A, Hair-Bejo M, Peeters BPH, Rahman O. 2018.** Diagnostic and vaccination Approaches for Newcastle Disease Virus in Poultry: The Current and

Emerging Perspectives. Biomed Research International. Article ID 7278459. 18 pages.
<https://doi.org/10.1155/2018/7278459>.

16. **Bergfeld J. 2017.** *The molecular basis of the pathogenicity of Newcastle disease virus in chickens*. PhD Thesis, School of Veterinary Science, The University of Queensland.
<https://doi.org/10.14264/uql.2017.840>.
17. **Berhane Y, Hisanaga T, Xu W, Mosos NA, Kehler H, Calderón CP, Pasick J. 2017.** Characterization of Colombian serotype 1 avian paramyxoviruses, 2008–2010. *Virus Genes* 53(4): 584–592. Doi:10.1007/s11262-017-1461-z.
18. **Brandon ZL, Alexander DJ. 2016.** Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses. In: *A Laboratory Manual for the Isolation Identification, and Characterization of Avian Pathogens*. Sixth Edition. Williams S, Louise Dufour-Zavala, Mark W. Jackwood, Margie D Lee, Blanca Lupiani, William M Reed, Erika Spackman, Peter R Wollcock (EDS). American Association of Avian Pathologists, Athens, Georgia. pp 259-267.
19. **Butcher GD, Miles RD, Nilipour AH. 2002.** Newcastle and Infectious Bronchitis Vaccine Reactions in Commercial Broilers. University of Florida IFAS Extension.
<https://doi.org/10.32473/edis-vm097-2002>.
20. **Butt SL, Dimitrov KM, Zhang J, Wajid A, Bibi T, Basharat A, Afonso CL. 2019.** Enhanced phylogenetic resolution of Newcastle disease outbreaks using complete viral genome sequences from formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. *Virus Genes*. doi:10.1007/s11262-019-01669-9.
21. **Caballero F, Alba M, Icochea E, Perales R, Rosadio R. 2005.** Susceptibilidad de la paloma silvestre (*Columba livia*) a un virus velogénico viscerotrópico de la enfermedad de Newcastle en condiciones experimentales. *Rev Inv Vet Perú* 16(1): 41-48.
22. **Cardenas-Garcia S., Diel D.G., Susta, L., Lucio-Decanini, E., Yu, Q., Brown, C.C., Miller, P.J. & Afonso, C.L. 2015.** Development of an improved vaccine evaluation protocol to compare the efficacy of Newcastle disease vaccines. *Biologicals*, 43, 136-145. doi: 10.1016/j.biologicals.2014.11.003

23. **Carrión A, Icochea E, falcón N. 2000.** Seroprevalencia del virus de la Enfermedad de Newcastle en aves silvestres del orden columbiforme en Baños de Boza, Distrito de Aucallama, Provincia de Huaral. *Rev Inv Vet Perú* 11(1): 88-91.

24. **Cattoli G, Susta L, Terregino C, Brown C. 2011.** Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *Journal of veterinary Diagnostic Investigation.* 23(4) 637-656. <http://vdi.sagepub.com/content/23/4/637>.

25. **Céspedes C. 2005.** Anàlisis de amenazas del estuario de Virrilà. Plan de Manejo Participativo del Estuario de Virrilà. Asociación Perú Verde y Comité Holandés de la IUCN. 80p

26. **Conza LB. 2012.** Caracterización molecular del virus de la enfermedad de Newcastle aislado de aves de diferentes regiones del Perú. Tesis para optar el grado académico de magister en microbiología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima- Perú. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/7362>.

27. **Cortez S. 1970.** Estudio retrospectivo de la En fermedades diagnosticadas en el Laboratorio de Patología Aviar durante 1956-1969. Tesis Bachiller Facultad de Medicina Veterinaria. U.N.M.S.M. Lima, Perú. 50 pags.

28. **Cox RM, Plemper RK. 2017.** Structure and organization of paramixovirus particles. *Curr Opin Virol* 24:105-114.

29. **Creelan JL, Graham DA, McCullough SJ. 2002.** Detecctión and differentiation of pathogenicity of avian paramixovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polimease chain reaction. *Avian Pathology* 31: 493-499.

30. **Criales AH. 2014.** Centro Regional para el Aviturismo en la Albufera de Medio.Mundo. Tesis de pregrado. Universidad San Martin de Porres. <https://repositorio.usmp.edu.pe/handle/20.500.12727/893>.

31. **Cruz Z, Angulo F, Burger H, Borgesa R. 2007.** Evaluacion de aves en la laguna El Paraíso, Lima, Perú. *Revista Peruana de Biología:* 14(1): 139-144. Recuperado [internet], [5 junio 2023]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332007000200024&lng=es&tlng=es

32. **Cuadrado S, Sanchez MT, García A, Villar E. 2015.** The therapeutic effect of death: Newcastle disease virus and its antitumor potential. *Virus Res.* 209: 56-66. doi: 10.1016/j.virusres.2015.07.001

33. **Czeglédi A, Ujvári D, Somogyi E, Wehmann E, Werner, O, Lomniczi B. 2006.** *Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications.* *Virus Research*, 120(1-2), 36–48. doi:10.1016/j.virusres.2005.11.009 10.1016/j.virusres.2005.11.009.

34. **Chang P, Icochea E, Alba M. 1999.** Detección de anticuerpos contra el virus de la Enfermedad de Newcastle en aves silvestres passeriformes y columbiformes en la Provincia de Chancay. *Rev Inv Vet Perú.* 10(2):79-81.

35. **Chen J, and H Wang. 2022.** "Clinical Epidemiologic and Experimental Evidence for the Transmission of Newcastle Disease Virus Through Eggs," *Avian Diseases*, 46(2), 461-465, (1 April 2002

36. **Chimeno S, Gómez E, Carrillo E, Berinstein A. 2008.** Locally produced mucosal IgG in chickens immunized with conventional vaccines for Newcastle disease virus. *Braz J Med Biol Res* 41(4): 318-23. Doi: 10.1590/s0100-879x2008000400010. PMID: 18392454.

37. **C Cho, S.H., Kwon, H.J., Kim, T.E., Kim, J.H., Yoo, H.S., Park, M.H., Park, Y.H. & Kim, S.J. (2008)** Characterization of a recombinant Newcastle disease virus vaccine strain. *Clin Vaccine Immunol*, 15, 1572-1579. doi: 10.1128/CVI.00156-08.

38. **Chukwudi E, Chukwuemeka E. 2013.** Newcastle disease in layers: Preliminary studies on the stress associated with onset of lay and initiation of clinical disease. *African Journal of microbiology Research* 7 (11): 960-965. Doi: 10.5897/AJMR12.1122 ISSN 1996-0808 ©2013 Academic Journals.

39. **Chumbe A, Izquierdo-Lara R, Tataje-Lavanda L, Figueroa A, Segovia K, Gonzalez R, Cribillero G, Montalvan A, Fernández-Díaz M, Icochea E. 2015.** Characterization and Sequencing of a Genotype XII Newcastle Disease Virus Isolated from a Peacock (*Pavo cristatus*) in Peru. *Genome Announc.* 3(4): e00792-15. Doi: 10.1128/genomeA.00792-15.

40. **Chumbe A, Izquierdo-Lara R, Tataje L, Gonzalez R, Cribillero G, Gonzalez AE, Fernandez M, Icochea E. 2017.** Pathotyping and Phylogenetic Characterization of

Newcastle Disease Viruses Isolated in Peru: Defining Two Novel Subgenotypes Within Genotype XII. *Avian Dis.* 61(1): 16-24. DOI: 10.1637/11456-062016-Reg.

41. **Da Silva, A P, Emily J. A, Chiwanga GH, Birakos A, Muhairwa AP, Kayang BB, Terra Kelly, Huaijun Zhou, Gallardo R. 2020.** Molecular Characterization of Newcastle Disease Viruses Isolated from Chickens in Tanzania and Ghana" *Viruses* 12 (9): 916. Doi.org/10.3390/v12090916.
42. **Diel DG, Miller PJ, Wolf PC, Mickley RM, Musante AR, Emanueli DC, Shively KJ, Pedersen K, Alfonso C. 2012.** Characterization of Newcastle Disease Viruses Isolated from Cormorant and Gull Species in the United States in 2010. *Avian Disease* 56: 128-133. <http://dx.doi.org/10.1637/9886-081111-Reg.1>.
43. **Diel DG, da Silva LH, Liu H, Wang Z, Miller PJ, Afonso CL. 2012.** Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infect Genet Evol* 12(8):1770-9. Doi: 10.1016/j.meegid.2012.07.012. Epub 2012 Aug 7. PMID: 22892200.
44. **Diel DG, Susta L, Cardenas Garcia S, Killian ML, Brown CC, Miller PJ, Afonso CL. 2012.** Complete genome and clinicopathological characterization of a virulent Newcastle disease virus isolate from South America. *J Clin Microbiol* 50(2): 378-87. doi: 10.1128/JCM.06018-11. Epub 2011 Nov 30. PMID: 22135263; PMCID: PMC3264182.
45. **Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu X, Bahl J, Afonso CL. 2016.** Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). *Infect Genet Evol*. 39:22-34. doi: 10.1016/j.meegid.2016.01.008. Epub 2016 Jan 12. PMID: 26792710.
46. **Dimitrov KM, Afonso CL, Yu Q, Miller PJ. 2017.** Newcastle disease vaccines-A solved problem or a continuous challenge? *Vet Microbiol.* Jul;206:126-136. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.12.019. Epub 2016 Dec 16. PMID: 28024856; PMCID: PMC7131810.
47. **Dimitrov KM, Abolnik C, Afonso CL, Albina E, Bahl J, Berg M, Briand FX, Brown IH, Choi KS, Chvala I, Diel DG, Durr PA, Ferreira HL, Fusaro A, Gil P, Goujgoulova GV, Grund C, Hicks JT, Joannis TM, Torchetti MK, Kolosov S, Lambrecht B, Lewis NS, Liu H, Liu H, McCullough S, Miller PJ, Monne I, Muller CP, Munir M, Reischak D, Sabra M, Samal SK, Servan de Almeida R, Shittu I, Snoeck CJ, Suarez DL, Van Borm**

- S, Wang Z, Wong FYK. 2019.* Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. *Infect Genet Evol.* Oct;74:103917. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103917. Epub 2019 Jun 11. PMID: 31200111; PMCID: PMC6876278.
48. *Dimitrov KM, Taylor TL, Marcano VC, Williams-Coplin D, Olivier TL, Yu Q, Gogal RM Jr, Suarez DL, Afonso CL. 2021.* Novel Recombinant Newcastle Disease Virus-Based In Ovo Vaccines Bypass Maternal Immunity to Provide Full Protection from Early Virulent Challenge. *Vaccines (Basel).* 15;9(10):1189. doi: 10.3390/vaccines9101189. PMID: 34696297; PMCID: PMC8538074.
49. *Dortmans JC, Koch G, Rottier PJ. 2011.* Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? *Vet Res* 42, 122. <https://dx.doi.org/10.1186%2F1297-9716-42-122>.
50. *Doyle TM. 1935.* Newcastle disease of fowls. *The Journal of Comparative Pathology and Therapeutics.* Vol XLVIII, 1. 1-20pp.
51. *Ellakany, Hany F., Ahmed R. Elbestawy, Hatem S. Abd El-Hamid, Rasha E. Zedan, Ahmed R. Gado, Ayman E. Taha, Mohamed A. Soliman, Mohamed E. Abd El-Hack, Ayman A. Swelum, Islam M. Saadeldin, and et al. 2019.* "Role of Pigeons in the Transmission of Avian Avulavirus (Newcastle Disease-Genotype VIIId) to Chickens" *Animals* 9, no. 6: 338. <https://doi.org/10.3390/ani9060338>
52. *Ferrer R, Icochea E, Salas A, Alba M. 2008.* Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la Enfermedad de Newcastle en Gallus gallus de Lima. Estudio de Caso-Control. *Rev Inv Vet Perú.* 19(1):67-74.
53. *Ganar K, Das M, Sinha S, Kumar S. 2014.* Newcastle disease virus: current status and our understanding. *Virus Res* 184: 71-81. Doi: 10.1016/j.virusres.2014.02.016.
54. *Gohm DS, Thür BA, Hofmann MA. 2000.* Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR, *Avian Pathology* 29 (2): 143-152, Doi: 10.1080/03079450094171.
55. *Guzmán J, Icochea E, González R, Reyna P. 2009.* Análisis retrospectivo de las principales enfermedades diagnosticadas en el Laboratorio de Patología Aviar durante los años 2002- 2006. V Seminario Internacional Perú 2009 y III Encuentro Científico Amevea. Lima-Perú, 2009.

56. **Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992.** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, *Biotechnology*, 10, 413.

57. **Hussein M, Osman NA, Ibrahim MT, Alhassan AM, Abass NA. 2022.** Seroprevalence and risk factors associated with Newcastle disease in backyard chickens in West Kordofan State, Sudan. *Veterinary World* 15 (29): 2979-2985
<https://www.researchgate.net/journal/Veterinary-World-2231-0916>.

58. **ICTV. 2021.** International committee on taxonomy of viruses. In: *Virus Taxonomy: 2021 Release*, Available at. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

59. **Inga EJ. 1991.** Análisis Estadístico retrospectivo de la principales Enfermedades diagnosticadas en el Laboratorio de Patología Aviar, en los últimos Diez Años. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. U.N.M.S.M. Lima, Perú. 78 pags.

60. **INRENA. 2007.** Evaluación ornitológica de los humedales de puerto viejo, pantanos de villa y humedales de ventanilla. Instituto de Recursos Naturales. Ministerio de Agricultura, Lima-Perú. https://issuu.com/leonardo.editor/docs/publicaciones_del_inrena

61. **Jindal N, Chander Y, Chockalingam AK, de Abin M, Redig PT, Goyal SM. 2009.** Phylogenetic analysis of Newcastle disease viruses isolated from waterfowl in the upper midwest region of the United States. *Virol J.* (5) 6: 191. Doi: 10.1186/1743-422X-6-191. PMID: 19891788; PMCID: PMC2776597.

62. **Kang Y, Xiang B, Yuan R, Zhao X, Feng M, Gao P, Li Y, Li Y, Ning Z, Ren T. 2016.** Phylogenetic and Pathotypic Characterization of Newcastle Disease Viruses Circulating in South China and Transmission in Different Birds. *Front. Microbiol.* 7: 119. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00119.

63. **Kim L, King D, Curry P, Suarez D, Swayne D Stallknecht D. 2007.** Phylogenetic diversity among low virulence Newcastle disease virus from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. *Journal of Virology* 81:12641-12653.

64. **Kapczynski DR, Alfonso C, Miller P. 2013.** Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Developmental & Comparative Immunology*. 41 (3), 447-453. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.012>.
65. **Kim SH, Samal SK. 2016.** Newcastle Disease Virus as a Vaccine Vector for Development of Human and Veterinary Vaccines. *Viruses*. Jul 4;8(7):183. doi: 10.3390/v8070183. PMID: 27384578; PMCID: PMC4974518.
66. **Kinde H, Utteback W, Takeshita K, McFarland. 2004.** Survival of Exotic Newcastle Disease Virus in Commercial Poultry Environment Following Removal of Infected Chickens. *Avian Diseases* 48(3): 669-674. <https://doi:10.1637/7161-020104r>.
67. **King D. 2002.** Enfermedad de Newcastle: Situación mundial y control. En: memorias del X Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar. 27 a 31 de mayo. Georgia.USA.
68. **Koffi FX, Dzogbema F, Essodina T, Komlan B, Balabadi B. 2021.** Review on Newcastle disease in poultry. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 15(2): 773-789. [Internet], [04 agosto 2022]. Disponible: <http://www.ifgdg.org/>.
69. **Lannacone J, Atasi M, Bocanegra T, Camacho M, Montes A, Santos S, Zuñiga H, Alayo M. 2010.** Diversidad de aves en el humedal Pantanos de Villa, Lima-Perú: periodo 2004-2007 <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000200031>.
70. **Liu H, Lv Y, Afonso CL, Ge S, Zheng D, Zhao Y, Wang Z. 2013.** Complete genome sequences of new emerging newcastle disease virus strains isolated from china. *Genome Announc.* 1(1):e00129-12. doi: 10.1128/genomeA.00129-12. Epub 2013 Feb 21. PMID: 23469337; PMCID: PMC3587931.
71. **Mao Q, Ma S, Schrickel PL, Zhao P, Wang J, Zhang Y, Li S, Wang C. 2022.** Review detection of Newcastle disease virus. *Front. Vet. Sci.* 9:936251. doi: 10.3389/fvets.2022.936251.
72. **Mast J, Demeestere L. 2009.** Electron tomography of negatively stained complex viruses: application in their diagnosis. *Diagnostic Pathology*. 4:5. <http://www.diagnosticpathology.org/content/4/1/5>.

73. **Meng Q, He J, Zhong L, Zhao Y. 2021.** Advances in Study of Antitumour Immunotherapy for Newcastle Disease Virus. *Int. J. Med. Sci.* 18(11): 2294-2302. Doi: 10.7150/ijms.59185.

74. **MIDAGRI. 2022.** Boletín estadístico mensual. Producción y Comercialización de Productos Avícolas. Ministerio de Desarrollo Agrario y de Riego. Gobierno del Perú.

75. **Miller P; Daniel J. King; Claudio L. Afonso; David L. Suarez (2007).** *Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge.* , 25(41), 0–7246. doi:10.1016/j.vaccine.2007.07.017

76. **Miller PJ, Koch G. 2020.** Newcastle disease. In: *Disease of Poultry*. 14th Edition. Ed By Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Venugopal N and DL Suarez. Edit Willey-Blackwell Publishing. Iowa, USA. pp 111-166.

77. **Mora M, 2005.** Enfermedad de Newcastle. Tesina para optar el título de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.Lima-Perú.

78. **Moreno V, Garcia A, Mathieu C. 2009.** Caracterización molecular y patogenicidad del virus de la enfermedad de newcaste (ENC) aislado en cormoranes. Chile 2007. Boletín Veterinario Oficial. BVO N°9, SAG, Chile.

79. **Mundt E. 2021.** Avian Paramixovirus 2-15 and 17. In: *Disease of Poultry*. 14th Edition. Ed By Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Venugopal N and DL Suarez. Edit Willey-Blackwell Publishing. Iowa, USA. pp 129-166.

80. **Ogali IN, Okumu PO, Mungube EO, Lichoti JK, Ogada S, Moraa GK, Agwanda BR, Ommeh SC. 2020.** Genomic and Pathogenic Characteristics of Virulent Newcastle Disease Virus Isolated from Chicken in Live Bird Markets and Backyard Flocks in Kenya. *Int J Microbiol.* 18;2020:4705768. doi: 10.1155/2020/4705768. PMID: 32908524; PMCID: PMC7450340

81. OIRSA, 2015. Manual de Procedimientos del Programa Nacional de Control y Erradicación de la Enfermedad de Newcastle. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA)

https://standardsfacility.org/sites/default/files/STDF_PG_358_Manual_Procedimiento_Newcastle.pdf

82. **Orsi M, Doretto L, Reischak D, Silva L, Spilki F, Buzinaro M, Arns C. 2009.** Newcastle disease virus vaccine strains: immunogenicity is not influenced by ICPI. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 11(2): 129–133. Doi:10.1590/s1516-635x200900020000.
83. **Onapa MO, Christensen H, Mukiibi GM, Bisgaard M. 2006.** A preliminary study of the role of ducks in the transmission of Newcastle disease virus to in-contact rural free-range chickens 38(4): 285–289. Doi:10.1007/s11250-006-4309-4.
84. **Pham H, Konnai S, Usui T, Chang K, Murata S, Mase M, Ohashi K, Onuma M. 2005.** Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus by real-time PCR with melting-curve analysis, *Archives Virology* 150: 2429-2438.
85. **Pereira MR, Machado LC, De Oliveira RD, De Lima TYV, Da Silva GB, De Sousa T, Fonseca SMC, De Assis LF, Da Luz G, De Souza F, De Oliveira RF. 2022.** Identification of a Virulent Newcastle Disease Virus Strain Isolated from Pigeons (*Columbia livia*) in Northeastern Brazil Using Next-Generation Genome Sequencing. *Viruses*. 2022 Jul 21;14(7):1579. Doi: 10.3390/v14071579.
86. **Perozo F, Villegas P, Estevez C, Alvarado I, Purvis LB. 2006.** Use of FTA filter paper for the molecular detection of Newcastle disease virus. *Avian Pathol* 35 (02): 93-98.
87. **Perozo F, Marcano R, Afonso CL. 2012.** Biological and Phylogenetic Characterization of a Genotype VII Newcastle Disease Virus from Venezuela: Efficacy of Field Vaccination. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1204–1208. Doi:10.1128/JCM.06506-11.
88. **Peeters B, Koch G. 2019.** Newcastle Disease Virus. Wageningen Bioveterinary Research, Lelystad, The Netherlands. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20933-3.
89. **Phillips L; Narvaes O; Fernandes L. 1951.** La neumoencefalitis aviar en el Perú. *Rev Inst Nac Biol Animal*. 2:31-51.

90. **Pulido V, Málaga E, Olivera E, Acevedo J. 2021.** Conservación de hábitats y aves en el Santuario Nacional de las Lagunas de Mejía, Arequipa, Perú. *Arnaldoa*, 28(1): 183-198. <https://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.281.28111>.
91. **Pulido Capurro V, Málaga Arenas E, Velarde Falconí D, Cano Coa D. M, Olivera Carhuaz E, & Acevedo Flores J. 2021.** Censo de aves acuáticas y conservación de humedales en las vertientes altoandinas del Perú. *Revista De Investigaciones Altoandinas*, 23(4), 244-257. DOI: 10.18271/ria.2021.310
92. **Quevedo T, Icochea E, Alba M, Sandoval N, Rosadio N. 2009.** Estudio clínico, serológico y patológico de una cepa velogénica del virus de la enfermedad de Newcastle en codornices (*Coturnix coturnix japonica*).
93. **Rauw F, Gardin Y, Palya V, Van Borm S, Gonze M, Lemaire S, Lambrecht B. 2009.** Humoral, cell-mediated and mucosal immunity induced by oculo-nasal vaccination of one-day-old SPF and conventional layer chicks with two different live Newcastle disease vaccines. *Vaccine*, 27(27), 3631–3642. Doi: 10.1016/j.vaccine.2009.03.068.
94. **Ravina PF. 2005.** Monitoreo serológico de la enfermedad de Newcastle efectuado en aves domésticas (*Gallus Gallus*) en Ica, Arequipa, Moquegua, Tacna, Junin, Huancavelica, Ayacucho, Cuzco, Apurimac y Puno-2001. Tesis para optar el Título profesional de Médico Veterinario. FMV, UNMSM-Lima Perú 41pp.
95. **Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. 1997.** Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*, 245(2), 154-160.
96. **Rue CA, Susta L, Cornax I, Brown CC, Kapczynski DR Suarez DL, Alfonso CL. 2011.** Virulent Newcastle Disease virus elicits a Strong innate immune response in chickens. *Journal of General Virology*. 92(4), 931-99. Doi:10.1099/vir.0.025486-0.
97. **Sá e Silva M, Susta L, Moresco K & Swayne DE (2016).** Vaccination of chickens decreased Newcastle disease virus contamination in eggs, *Avian Pathology* 45(1): 38-45, DOI: 10.1080/03079457.2015.1112876
98. **Sahoo N, Bhuyan K, Panda B, Behura NC, Biswal S, Samal L, Chaudhary D, Bansal N, Singh R, Joshi VG, Jindal N, Mahajan NK, Maan S, Ravishankar C, Rajasekhar R,**

- Radzio-Basu J, Herzog CM, Kapur V, Mor SK, Goyal SM. 2022.** Prevalence of Newcastle disease and associated risk factors in domestic chickens in the Indian state of Odisha. PLoS One. 16;17(2) doi: 10.1371/journal.pone.0264028. PMID: 35171961; PMCID: PMC8849498.
99. **Sánchez BF. 2011.** Desarrollo de modelos epidemiológicos para el análisis del riesgo de entrada de los virus de Influenza Aviar altamente patógena y la Enfermedad de Newcastle en España. Tesis para optar el grado de Doctor. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
 100. **SENASA, 2003.** Aprueban Reglamento de Control y Erradicación de la Enfermedad de Newcastle, Decreto Supremo N° 010-2003-AG. 20pp.
 101. **Shimabukuro C, Icochea E. 2000.** Determinación de anticuerpos contra el virus de la Enfermedad de Newcastle en Psitácidas en cautiverio en el Parque de Las Leyendas. Rev Inv Vet Perú. 11(2): 152-156.
 102. **Sialer GM, Icochea DAE, González ZAE. 2020.** Eficacia de una vacuna vectorizada para el control de la enfermedad de Newcastle aplicada en pollitos BB en planta de incubación. Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú, 31(2): e17835. Doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17835.
 103. **Schirmacher V. 2017.** Immunobiology of Newcastle Disease Virus and Its Use for Prophylactic Vaccination in Poultry and as Adjuvant for Therapeutic Vaccination in Cancer Patients. International Journal of Molecular Sciences, 18(5), 1103. Doi:10.3390/ijms18051103.
 104. **Silva BA. 1995.** Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional mayor de San Marcos. 37 pp.
 105. **Suarez DL. 2013.** Newcastle disease, Other Avian Paramyxovirus, and Avian Metapneumovirus Infections. In: Disease of Poultry. 13th Edition. Ed By Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL and N Venugopal. Edit Willey-Blackwell Publishing. Iowa, USA pp 89-138.
 106. **Sultan HA, Talaat S, Elfeil WK, Selim K, Kutkat MA, Amer SA, Choi KS. 2020.** Protective efficacy of the Newcastle disease virus genotype VII-matched vaccine in

commercial layers. Poult Sci. 2020 Mar;99(3):1275-1286. Doi: 10.1016/j.psj.2019.10.063.

107. **Tayeb S, Zakay-Rones Z, Panet A. 2015.** Therapeutic potential of oncolytic Newcastle disease virus: critical review. *Oncolytic Virotherapy* (4): 49-62. <https://doi.org/10.2147/OV.S78600>.
108. **USDA-APHIS (2021).** “Epidemiologic Analyses of Virulent Newcastle Disease in Poultry in California, March 2021.” USDA:APHIS:VS:Center for Epidemiology and Animal Health. Fort Collins, CO. March 2021. 101 pgs.
109. **Valderrama JM, Ortigosa F, Cañas RA. 2020.** Métodos de secuenciación: tercera generación. *Encuentros en la biología*. Vol XIII, 175. 15-21.
110. **Van Boven M, Annemarie B, Teun HF, Katsma E, Hartog L, Koch G. 2008.** Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination, *Avian Pathology*, 37(1): 1-5, Doi: 10.1080/03079450701772391.
111. **Vargas J, Alba M, Icochea E, Sandoval N, Manchego A. 2004.** Patogenicidad y respuesta serológica de la tórtola (*Eupelia cruziana*) frente a un desafío experimental con un virus de la Enfermedad de Newcastle. *Rev Inv Vet Perú*. 15(1):76-82.
112. **Vilela J, Rohaim MA, Munir M. 2022.** Avian Orthoavulavirus Type-1 as Vaccine Vector against Respiratory Viral Pathogens in Animal and Human. *Vaccines* 10: 259. Doi: 10.3390/vaccines10020259.
113. **Wakamatsu N, King DJ, Seal BS, Siba K, Samal SS, Brown CC. 2006.** The pathogenesis of Newcastle disease: A comparison of selected Newcastle disease virus wild-type strains and their infectious clones. *Virology* 353 pp.
114. **Wakenell PS, Thayer SG, Beard CW. 2016.** Serologic procedures. In: Williams SM, Dufour-Zavala L, Jackwood MW, Lee MD, Lupiani B, Reed WM, Spackman E, eds *A laboratory manual for isolation, identification and characterization of avian pathogens*. 6th ed. Athens, USA: American Association of Avian Pathologists. 343-347.

115. **Wang Z, Vreede FT, Mitchell JO, Viljoen GJ. 2001.** Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus isolates by a triple one-step RT-PCR. Onderstepoort J Vet Res 68(2):131-4.
116. **WAHIS. World Organisation for Animal Health. Reports. 2023.** <https://wahis.woah.org/#/in-review/2688?reportId=16452&fromPage=event-dashboard-url>.
117. **Wise MG, Suarez DL, Seal BS, Pedersen JC, Senne DA, King DJ, Kapczynski DR, Spackman E. 2004.** Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of newcastle disease virus RNA in clinical samples. J Clin Microbiol. 42(1): 329-38. Doi: 10.1128/JCM.42.1.329-338.2004.
118. **[WOAH]. World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2021.** (version adopted in May 2021). Newcastle disease. Terrestrial Animal Health Code. Chapter 3.3.14. OIE, Paris. [Internet], [02 de enero 2022]. Disponible en: <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>.
119. **Xiao, S., Nayak, B., Samuel, A., Paldurai, A., Kanabagattebasavarajappa, M., Prajitno, T.Y., Bharoto, E.E., Collins, P.L. & Samal, S.K. (2012)** Generation by reverse genetics of an effective, stable, live-attenuated newcastle disease virus vaccine based on a currently circulating, highly virulent Indonesian strain. PLoS One, 7, e52751. doi: 10.1371/journal.pone.0052751.
120. **Yanayaco A. 1995.** Entwicklung und strukturen der geflugelhaltung in Perú mit einem beitrage zu vorkommen, bedeutung und charakterisierung von Paramyxoviren beim vogel in Peru. Tesis para optar el título de Doctor en medicina Veterinaria. Facultad de Medicina veterinaria. Universidad de Giessen. 117 pags.
121. **Yuan P, Swanson HA, Leser GP, Paterson RG, Lamb RA, Jardetzky TS. 2011.** Structure of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase (HN) estodomain reveals a four-helix bundle stalk. Proceedings of the National Academy of Sciences 108(36): 14920-14925. Doi:10.1073/pnas.1111691108.

122. **Zhang T, Ren M, Liu C, Xu L, Wang F, Han Z, Ma D. 2018.** Comparative analysis of early immune responses induced by two strains of Newcastle disease virus in chickens. Microbiology: e00701. Doi:10.1002/mbo3.701.
123. **Zhang D, Ding Z, Xu X. 2023.** Pathologic Mechanisms of the Newcastle Disease Virus. Viruses.15: 864. <https://doi.org/10.3390/v15040864>

X. ANEXOS

Anexo 1. Caso: 040369. Postura de 11 sem. 2004.



Anexo 2. Caso 40642: Aves criollas de 45 días. 2004.



Anexo 3. Caso 40785: Ave de riña 8 meses 2004.



Anexo 4. Caso 40871. 05 aves de riña de 2 y 3 sem. 2004.



Anexo 5. Caso 050566. Pollos de engorde de 29 días. 2005.



Anexo 6. Caso 110181. Aves de riña, 3, 7 y 14 meses. 2011 (ENC y LTI)



Anexo 7. Caso 110277. 03 aves de riña de 02 meses. 2011



Anexo 8. Caso 110288. Ave de riña de 14 meses. 2011.



Anexo 9. Caso 110319. Aves de riña de diferente edad. 2011.



Anexo 10. Caso 130432. Ave de riña de 11 meses. 2013.



Anexo 11. Caso 15009506, engorde de 34 días. 2015.



Anexo 12. Caso 15009787, engorde 33.



Anexo 13. Caso 22001165: Engorde Rio Seco Huaral 30 días. 2022.



Anexo 14. Caso 22008463: engorde 32 días. 2022.



Anexo 15. Caso 221003: Ave de riña 14 meses. 2022.



Anexo 16. Cuadros de Mortalidad y signos para determinar IPIC, casos 1, 2, 3, 4, 5 y 7.

040369	Aves de postura/Puente Piedra-Lima/2004							
26/10/04	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Sanos	6	0	0	0	0	0	0	0
Enfermos	4	2	0	0	0	0	0	0
Muertos	0	8	10	10	10	10	10	10
ICPI=1.78	0.4	1.8	2	2	2	2	2	2

040642	Aves criollas/Huachipa-Lima/2004							
30/09/04	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Sanos	2	0	0	0	0	0	0	0
Enfermos	8	0	0	0	0	0	0	0
Muertos	0	10	10	10	10	10	10	10
ICPI=1.85	0.8	2	2	2	2	2	2	2

040785	Aves de riña/Barranco-Lima/2004							
30/09/04	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Sanos	2	0	0	0	0	0	0	0
Enfermos	8	0	0	0	0	0	0	0
Muertos	0	10	10	10	10	10	10	10
ICPI=1.85	0.8	2	2	2	2	2	2	2

040871	Aves de riña/Lurin-Lima/2004							
26/10/04	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Sanos	6	0	0	0	0	0	0	0
Enfermos	4	4	0	0	0	0	0	0
Muertos	0	6	10	10	10	10	10	10
ICPI=1.75	0.4	1.6	2	2	2	2	2	2

040796	Aves de postura/Lurin-Lima/2004							
04/10/04	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Sanos	10	10	10	10	10	10	10	10
Enfermos	0	0	0	0	0	0	0	0
Muertos	0	0	0	0	0	0	0	0
ICPI=0	0	0	0	0	0	0	0	0

040931	Aves de riña/Lavictoria-Lima/2006							
22/11/04	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Sanos	3	0	0	0	0	0	0	0
Enfermos	7	0	0	0	0	0	0	0
Muertos	0	10	10	10	10	10	10	10
ICPI=1.84	0.7	2	2	2	2	2	2	2

Anexo 17. Cuadro de Mortalidad y signos para IPIC, casos 8, 10, 11, 12 13, 15 y 18.

050009	Pollos de engorde/Apurimac/2005							
04/01/05	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Sanos	8	0	0	0	0	0	0	0
Enfermos	2	0	0	0	0	0	0	0
Muertos	0	10	10	10	10	10	10	10
ICPI=1.78	0.2	2	2	2	2	2	2	2

0600087	Aves de postura/Piura/2006							
25/01/06	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Sanos	4	0	0	0	0	0	0	0
Enfermos	6	0	0	0	0	0	0	0
Muertos	0	10	10	10	10	10	10	10
ICPI=1.83	0.6	2	2	2	2	2	2	2

110181	Aves de riña/Rimas-Lima/2011							
04/01/05	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Sanos	8	0	0	0	0	0	0	0
Enfermos	2	0	0	0	0	0	0	0
Muertos	0	10	10	10	10	10	10	10
ICPI=1.78	0.2	2	2	2	2	2	2	2

110511	Pavo real/SanMiguel-Lima/2011							
05/11/11	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Sanos	5	0	0	0	0	0	0	0
Enfermos	5	1	0	0	0	0	0	0
Muertos	0	9	10	10	10	10	10	10
ICPI=1.8	0.5	1.9	2	2	2	2	2	2

110277	Aves de riña/Huaral-Lima/2011							
05/11/11	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Sanos	5	0	0	0	0	0	0	0
Enfermos	5	1	0	0	0	0	0	0
Muertos	0	9	10	10	10	10	10	10
ICPI=1.8	0.5	1.9	2	2	2	2	2	2

110319	Aves de riña/Huachipa-Lima/2013							
26/10/04	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Sanos	6	0	0	0	0	0	0	0
Enfermos	4	2	0	0	0	0	0	0
Muertos	0	8	10	10	10	10	10	10
ICPI=1.78	0.4	1.8	2	2	2	2	2	2

15009787	Pollos de engorde-Arequipa/2015							
22/11/04	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Sanos	1	0	0	0	0	0	0	0
Enfermos	8	0	0	0	0	0	0	0
Muertos	1	10	10	10	10	10	10	10
ICPI=1.88	1	2	2	2	2	2	2	2

Anexo 18. Secuencia del sitio de clivaje del gen de fusión y, el gen completo HN de 10 cepas peruanas de Orthoavulavirus-1

https://drive.google.com/drive/u/1/folders/13fgGjuxlHKWD6VBurVe_VXb1InjkyWIN

XI. LISTA DE PUBLICACIONES

1. **Chumbe A, Izquierdo-Lara R, Tataje-Lavanda L, Figueroa A, Segovia K, Gonzalez R, Cribillero G, Montalvan A, Fernández-Díaz M, Icochea E. 2015.** Characterization and Sequencing of a Genotype XII Newcastle Disease Virus Isolated from a Peacock (*Pavo cristatus*) in Peru. *Genome Announc.* 3(4): e00792-15. doi: 10.1128/genomeA.00792-15.
2. **Chumbe A, Izquierdo-Lara R, Tataje L, Gonzalez R, Cribillero G, Gonzalez AE, Fernandez-Diaz M, Icochea E. 20017.** Pathotyping and Phylogenetic Characterization of Newcastle Disease Viruses Isolated in Peru: Defining Two Novel Subgenotypes Within Genotype XII. *Avian Dis.* 61(1): 16-24. DOI: 10.1637/11456-062016-Reg.
3. **Icochea E, Castro G, Callupe A, Apaza A, Gonzalez R, More J. 2023.** Characterization of an isolate of the putative novel Avian metaavulavirus 27 species (APMV-27) obtained from a Chorlito gris (*Pluvialis squatarola*) in Peru. In press.