

# Aislamiento del virus de la enfermedad de Newcastle en zonas rurales del sur del Ecuador

## Newcastle Disease Virus Isolation of rural Areas from Southern Ecuador

Villacís Rivas Gustavo<sup>1</sup>,  
Escudero Sánchez Galo<sup>2</sup>,  
Cueva Castillo Fredy<sup>3</sup>,  
Luzuriaga Neira Augusto<sup>4</sup>

<sup>1</sup>. Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Loja

<sup>2</sup>. Carrera de Veterinaria y Zootecnia

<sup>3</sup>. Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja

<sup>4</sup>. Centro de Biotecnología \* Autor para correspondencia: chazo 77@hotmail.com

Recibido 20 de junio 2014; Aceptado 17 de septiembre 2014

### Resumen

El virus de la enfermedad de Newcastle pertenece al grupo de los paramixovirus aviares y es capaz de infectar a más de 200 especies de aves, con diferentes grados de afectación según el hospedador y la cepa del virus. Si bien el virus de Newcastle se ha aislado desde varias especies silvestres y domésticas en todo el mundo, en el Ecuador, no existen reportes de aislamiento viral en zonas rurales del país. Bajo este antecedente y con el objetivo de aislar el virus de Newcastle en la Región Sur del Ecuador, se utilizaron 100 pollos centinelas de quince días de edad, negativos a anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle, estos centinelas fueron sembrados de manera aleatoria en seis parroquias rurales del cantón Zapotillo. Después de 15 días se realizó la cosecha de los centinelas y se tomaron hisopados cloacales, se hicieron pools con estos hisopados por sector y posteriormente se realizó el cultivo en huevos embrionados de 9 días que no eran spf provenientes de gallinas criollas libres de vacunas contra la enfermedad de Newcastle. Los huevos embrionados fueron inoculados con las muestras de campo previamente purificadas, se realizaron tres repeticiones de cada pool analizado y después de las primeras 24 horas de incubación se registró la mortalidad embrionaria, al cuarto día todos los huevos fueron cosechados, se corrieron pruebas de Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación donde se determinó la actividad hemoaglutinante del virus de Newcastle, adicionalmente se utilizó fluido alantoideo para una prueba rápida de ELISA de captura cuyo resultado también fue positivo.

**Palabras clave:** Virus de la enfermedad Newcastle, aislamiento viral, aves centinelas.

### Abstract

The Newcastle disease virus belongs to the group of paramixovirus birds and is able to infect to more than 200 bird species at different levels of affectation according to the host and the virus strain. Even though the Newcastle virus has been isolated from several wild and domestic species around the world, there are not any reports of viral isolations in rural areas of Ecuador. Under these circumstances and with the objective to isolate the Newcastle virus in the southern region of Ecuador, it was used 100 chickens of fifteen days old, negatives for antibodies against the Newcastle disease, they were put at random in six rural areas of Zapotillo canton. After fifteen days they were examined in order to take samples of feces and to make pools. Subsequently, It was made the culture of embryonated eggs of nine days old that were not specific pathogen free (spf) coming from native Hens, free from vaccines against the Newcastle disease. The embryonated eggs were inoculated with the field samples previously purified. Three repetitions of each pool were made and analysed; after the first twenty four hours of incubation it was registered the embryonic mortality. On the fourth day the eggs were harvested and it was carried out test of hemagglutination and hemagglutination inhibition in which it was detected the presence of hemoagglutinate activity of Newcastle, additionally was used of a quick test of capture ELISA the result was also positive.

**Key words:** Newcastle disease virus, virus isolation, sentinel birds.

## Introducción

El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) (Newcastle Disease Virus) se encuentra en el listado de la OIE pertenece a los paramixovirus aviáres de tipo I (APMV-1) con cepas que son enzoóticas y causan grandes pérdidas en la economía del sector avícola (Kang *et al.*, 2014).

EL NDV es capaz de infectar más de 200 especies de aves, la gravedad de la enfermedad depende del tipo de hospedador y la cepa del virus (OIE, 2008).

En la provincia de Loja, en las zonas rurales del cantón Zapotillo, se identificaron unidades de producción campesina, que mantienen sistemas tradicionales muy cerrados y aislados, con una importante población de gallinas criollas, adaptadas al manejo tradicional característico de la avicultura rural (Villacís, 2012).

El uso de aves centinelas para monitoreo virológico activo de la enfermedad de Newcastle en zonas de riesgo como son sitios cercanos a humedales y zonas de frontera, es una herramienta práctica para la detección de virus de Newcastle (FAO, 2007).

El aislamiento del virus de Newcastle en huevos embrionados SPF es una técnica utilizada en todo el mundo, pero si no se dispone de huevos de aves SPF, serán necesarios huevos negativos al menos para anticuerpos contra el Virus de la enfermedad de Newcastle (OIE, 2012).

La enfermedad de Newcastle es prevalente en el Perú, principalmente en aves de riña y de traspato. (Ventocilla, 2011) La zona de estudio por su cercanía con el Perú y por compartir tradiciones comunes como la riña de gallos, con movilización de animales entre ambos países, sin un control sanitario riguroso, incrementa la posibilidad de circulación viral en el la Región Sur del Ecuador.

El objetivo de esta investigación fue realizar el aislamiento del virus de Newcastle en zonas rurales del sur del Ecuador, con ayuda de aves centinelas, para luego realizar cultivo viral en huevos embrionados que no eran spf, detectar actividad hemoaglutinante y finalmente confirmar la presencia del virus con una prueba rápida de ELISA de captura a partir de líquido alantoideo.

## Materiales y Métodos

Este estudio fue realizado en seis comunidades rurales del sur del Ecuador, Bolaspamba,

Cazaderos, Garza Real, Limones, Mangahurco y Paletillas, pertenecientes Cantón zapotillo de la Provincia de Loja, en la zona sur occidental del país, dentro del ecosistema del bosque seco.

Se emplearon 100 aves centinelas (pollos) de quince días de edad, negativos a anticuerpos para la enfermedad de Newcastle, en base a diagnóstico serológico por ELISA, los cuales fueron sembrados en forma aleatoria en 50 unidades de producción campesina de 25 barrios de las seis parroquias rurales, motivo del estudio durante los meses de mayo a julio de 2014.

Los pollos centinelas fueron muestreados quince días después de la siembra, se tomaron muestras de hisopados cloacales para asilamiento viral, se agruparon 4 hisopados cloacales por pool y por sector.

## Aislamiento del virus a partir de huevos embrionados.

Las muestras de campo (hisopados cloacales) fueron tomadas en un medio de transporte universal para virus (UTM), una vez purificados en el laboratorio se adicionó una solución de antibióticos que contenía 2.000 unidades/ml de penicilina; 2 mg/ml de estreptomycin, 50 µg/ml de gentamicina y fluconazol 1mg/ml, con un pH ajustado a 7.4 de toda la solución de antibióticos, se usó en proporción de 1 a 1.

Se utilizaron huevos embrionados entre 9 y 10 días de edad que no eran spf, y provenían de gallinas criollas, libres de vacuna contra la enfermedad de Newcastle, explotadas en el Centro Binacional Zapotepamba de la Universidad Nacional de Loja.

Los huevos embrionados fueron inoculados con 0.25 mililitros de muestra, se inocularon tres huevos por muestra, y se incubaron a 38 °C, se realizó dos observaciones diarias con la ayuda de un ovoscopio y se registró la mortalidad embrionaria después de las primeras 24 horas de incubación, al cuarto día todos los huevos fueron puesto en refrigeración para la posterior cosecha de líquido alantoideo.

## Pruebas de HA

La prueba de HA está indicada para encontrar títulos hemoaglutinantes de virus de Newcastle, Influenza y bronquitis.

Para la prueba de henmoaglutinación (HA), se utilizó una micro placa de 96 pocillos dispuestos en

12 columnas de 8 pocillos cada una, en los cuales se colocaron 0.25 ul de PBS con pipeta multicanal.

En la primera columna se adicionó 0.25 ul de líquido alantoideo, se hicieron dos repeticiones por cada muestra y con la ayuda de una pipeta multicanal se realizó las diluciones hasta la columna 11, la columna 12 con PBS unicamente sirvió control negativo.

Además se adicionaron 0,25 ul de solución de glóbulos rojos lavados en todas las columnas excepto en el control negativo, se mezcló levemente y se dejó en reposo 30 minutos a temperatura ambiente para finalmente realizar la lectura.

### Pruebas de HI

Para la prueba de inhibición de la hemoaglutinación se utilizó una placa similar a la de la Prueba de HA y se adicionó 25 ul de PBS en todos los pocillos, en el primer pocillo se colocó 25 ul de suero sanguíneo de gallina con anticuerpos de Newcastle y se realizaron las diluciones.

Es necesario tener una hilera como control negativo de virus y una segunda hilera como control positivo de virus, el siguiente paso es adicionar 25 ul de virus a toda la placa menos al control negativo y se deja reposar treinta minutos a temperatura ambiente para que reaccione antígeno y anticuerpo.

Finalmente se agrega 25 ul de solución de glóbulos rojos lavados en todos los pocillos y se vuelve a dejar treinta minutos más en reposo para identificar si se produce la inhibición de la hemoaglutinación.

### Detección del virus mediante prueba rápida de ELISA de captura

Se utilizó un kit comercial QUICKIN Veterinary Rapid Test, el que incluía un dispositivo plástico, una solución buffer y un hisopo, el dispositivo disponía de un espacio para colocación de la muestra.

Se aplicaron tres gotas de fluido alantoideo en el pocillo de la prueba rápida de ELISA de captura, la técnica recomendaba dejar en reposo por cinco minutos antes de realizar la lectura del resultado que incluía la formación de dos bandas de color rojo en las posiciones “T” y “C” en caso de ser prueba positiva y una sola banda en la posición “C”, en caso de ser prueba negativa.

### Resultados

En la presente investigación se utilizaron 100 aves centinelas de quince días de edad que fueron diagnosticadas por ELISA y presentaron títulos menores a 396, esta baja titulación nos permitió determinar la negatividad del lote de centinelas al momento de su siembra en la zona de estudio.

Cuadro 1. Mortalidad de aves centinelas por parroquia

	Parroquias rurales de Zapotillo					
	Garza Real	Paletillas	Bolaspamba	Limones	Mangahurco	Cazaderos
<b>Centinelas sembrados</b>	20	20	15	15	15	15
<b>Centinelas muertos</b>	6	4	3	1	2	4
<b>% de mortalidad</b>	30	20	15	5	10	20

Finalizados los quince días de monitoreo viral con las aves centinelas, se registró una mortalidad general del 20 % en las seis parroquias rurales, asociada a problemas de tipo respiratorio, el 80 % restante mostraron buen estado de salud, se tomaron muestras de sangre e hisopados cloacales con los que se realizaron un total de 25 pools, uno por cada zona analizada.

La parroquia Garza Real registra el porcentaje de mortalidad más alto con un 30 %, y es esta parroquia la que mayor cantidad de humedales

presenta, además posee una gran cantidad de garzas y otras aves silvestres que actúan como agentes dispersores de la enfermedad (Rondón, 2011).

Las parroquias paletillas, alcanzaron el 20 % de mortalidad, en el caso de paletillas es la parroquia que cuenta con varias explotaciones de pollos broiler y finqueros que generalmente reciben al menos una dosis de vacuna contra Newcastle y están en capacidad de diseminar virus de origen vacunal.

Cazaderos también reporta un 20 % de mortalidad de centinelas, esta parroquia es la más lejana y aislada pero con mucha afición a la actividad gallística, dispone de galleras y muchos gallos de riña, que también están en capacidad de diseminar la enfermedad, Briceño *et al.*, en el 2012 determinan una seroprevalencia para la enfermedad de Newcastle en gallos de pelea del

municipio de Saboyá (Boyacá) utilizando la prueba de Inhibición de Hemaglutinación del 96.4 %.

El NDV es prevalente en Perú, principalmente en aves de riña y de traspatio, asimismo, las aves silvestres pueden ser portadoras del NDV y, de esa forma, ser una fuente diseminadora del virus hacia aves de producción (Ventocilla *et al.*, 2011)

Cuadro 2 Mortalidad embrionaria

Mortalidad embrionaria post inoculación en horas							
Horas	24	36	48	60	72	84	96
Embriones vivos	70	64	58	51	44	35	29
Embriones muertos	5	6	6	7	7	9	6
% de mortalidad	6,6	9,3	10,3	13,7	15,9	25,7	20,7

En el eje cafetero de Colombia se registró una prevalencia del 38.5 % en aves pertenecientes a la avicultura de traspatio y gallos de pelea (Romero y col., 2009).

En la parroquia Limones se presentó la menor mortalidad, con solo el 5 %, esta parroquia no dispone de humedales de importancia y la población de aves migratoria no es considerable.

Para el aislamiento del virus, se inocularon un total de 75 huevos embrionados de entre 9 y 10 días de edad, provenientes de gallinas criollas que no eran SPF, pero que no tenían anticuerpos contra Newcastle, todos los huevos se inocularon el mismo día por la mañana, se hicieron tres repeticiones por cada pool, la mortalidad se consideró desde el segundo día post inoculación.

El NDV no causa mortalidad en las primeras 24 horas post inoculación en el huevo embrionado, por lo que los datos de mortalidad que se presentaron, corresponden a errores durante la inoculación.

Es importante señalar que la mortalidad de los primeros horas podría asociarse a que se identificaron diez muestras positivas y no necesariamente se trate de la misma cepa del virus.

Los porcentajes más altos de mortalidad se presentan entre las 84 y 96 horas post inoculación, esto nos podría sugerir que las cepas virales que circulan en la Región Sur del Ecuador, basados en la mortalidad embrionaria corresponderían a una cepa lentogénica, como lo sugiere el Manual de Animales Terrestres (OIE, 2012).

La presencia del APMV-1 en aves silvestres

está bien documentada, resaltando el hecho que casi todas las cepas aisladas son lentogénicas (Ventocilla *et al.*, 2011)

A las 96 horas post inoculación se registró una mortalidad total de 58,5 % de los embriones, el resto continuaron con vida, finalmente se colocaron todos los huevos a 4 °C y horas después se cosecharon todos los fluidos alantoideos.

Para determinar la actividad hemoaglutinante, se corrió la prueba de hemoaglutinación HA y se identificó la presencia de 10 muestras positivas que mostraron actividad hemoaglutinante,

La hemoaglutinación es uno de los métodos indirectos más comunes para cuantificar partículas virales o antígenos virales en suspensión, el presente estudio encontró 8 unidades hemoaglutinantes (UHA) de virus.

Adecuadamente diluido el fluido alantoideo infeccioso puede ser usado como antígeno en las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación HI para todos los paramixovirus aviares excepto APMV-5 (Dufour, 2008).

La prueba de inhibición de la hemoaglutinación HI comprobó que el virus hemoaglutinante presente en el fluido alantoideo corresponde al virus de la enfermedad de Newcastle.

La prueba rápida de ELISA de captura a partir de fluidos alantoideos presentó una banda roja en la posición C y otra banda un poco más tenue en la posición T, la presencia de dos bandas es resultado positivo, esta prueba rápida no determina niveles de anticuerpos, ni tipo de cepa, únicamente es una

prueba confirmatoria que identifica la presencia o ausencia de virus de Newcastle con más del 96 % de sensibilidad y especificidad.

La prueba rápida de ELISA de captura está diseñada para usarse con hisopados traqueales y cloacales, pero en este trabajo utilizó fluido alantoideo de huevos embrionados y los resultados fueron positivos.

Estas pruebas rápidas de ELISA de capturas son muy difundidas en campo virológico para obtener datos tempranos de la enfermedad (Acosta, 2008).

### Conclusiones

El uso de aves centinelas para monitoreo de la enfermedad de Newcastle en zonas geográficas de riesgo como humedales y zonas de tránsito a nivel frontera, es un recurso práctico y valioso.

La utilización de huevos embrionados que no son SPF, pero provenientes de gallinas libres de anticuerpos para la enfermedad de Newcastle, se constituye en una alternativa segura para realizar el cultivo del virus de Newcastle.

Las pruebas de HA y HI son apoyos diagnósticos serológicos específicos y que siguen vigentes, para cuantificar antígenos virales en suspensión.

El uso práctico de la prueba rápida de ELISA de captura, en campo, está en función de la carga antigénica de las aves y en etapas iniciales y tardías de la infección, sus resultados pueden ser poco satisfactorios.

Es necesario profundizar aún más el estudio de la circulación del NDV en base a estudios moleculares RT-PCR que permitan identificar el tipo y origen de la cepa viral que circula en las zonas rurales de la Región Sur del Ecuador.

### Literatura citada

Acosta G, Ribas M, Tejero Y, et.al (2008). Normalización de un ELISA de captura para la detección de anticuerpos de tipo IgM al virus de la parotiditis *Rev Cubana Med Trop* v.60 n.3 Ciudad de la Habana sep.-dic.

Briceño J, Rodríguez J, Rodríguez S. (2012). Seroprevalencia de la enfermedad de Newcastle en gallos de pelea (*Gallus gallus*) del municipio de Saboyá, Boyacá. Recuperado el 16 de septiembre de 2014 de: <http://www.revistasjdc.com/main/index.php/conexagro/article/view/182>

Dufour L, Swayne D, Glisson J, et.al (2008). A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens. American Association of Avian pathologists. Fifth edition. P:139.

Kang Y, Li Y, Yuan R, Li X, Sun M, Wang Z, Feng M, Jiao P1, Ren T. Phylogenetic relationships and pathogenicity variation of two Newcastle disease viruses isolated from domestic ducks in Southern China. *Virol J.* 2014 Aug 12;11:147. doi: 10.1186/1743-422X-11-147.

Office International des Epizooties/World Organization for animal Health OIE. (2012). Manual de la OIE sobre animales terrestres. Recuperado el 15 de septiembre de 2014 de <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2014). El Manual de Preparación para la Influenza Aviar de Alta Patogenicidad fue elaborado por la División de Producción y Salud Animal de la FAO. Recuperado el 15 de septiembre de 2014 de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a0632s/a0632s.pdf>.

Romero, M. Narváez, S, Sánchez J. (2009). Enfermedad de Newcastle en aves de traspatio del Eje Cafetero Colombiano. Universidad de Caldas. Recuperado el 14 de septiembre de 2014 de <http://www.scielo.unal.edu.co/scielo>.

Villacís, G. (2012). La Avicultura Rural de la frontera sur ecuatoriana, Loja - Ecuador.