

97
090 2

PATOGENESIS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

EN LA FAMILIA PSITTACIDAE

TESIS

Presentada al Programa de Estudios para Graduados
Universidad Nacional - Instituto Colombiano Agropecuario

Por:

BENJAMIN DUQUE SUAREZ

Como requisito parcial para optar al
grado de:

"MAGISTER SCIENTIAE"

BOGOTA - COLOMBIA

1974

TESIS APROBADA POR

COMITE CONSEJERO:

Dr. JAIME ESTUPIÑAN ARIAS _____

Dr. EDUARDO AYCARDI BARRERA _____

Dr. RICARDO OCHOA O. _____

El Presidente de tesis y el consejero examinador de grado,
no serán responsables de las ideas emitidas por el candi-
dato.

(Artículo 217 de los Estatutos de la Universidad Nacional)

A MI ESPOSA Y A MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) por el apoyo económico, y al personal de la Sección de Virología por su colaboración.

MICROBIOGRAFIA

BENJAMIN DUQUE SUAREZ, nació en Salamina, Departamento de Caldas el 23 de Mayo de 1943. Culminó sus estudios de Bachillerato en el Instituto del Carmen de Bogotá en 1961, y en la Universidad Nacional de Bogotá, recibió el título de Médico Veterinario y Zootecnista en 1967.

Desde Diciembre de 1967 se vinculó al Instituto Zooprofiláctico Colombiano en Bogotá y Barrancabermeja, posteriormente en Enero de 1969 se vinculó al ICA como Director del Centro de Diagnóstico de Pereira, cargo en el cual permaneció hasta su ingreso a la Escuela.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1. Objetivos	2
2. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. Descripción de la enfermedad	3
2.2. Distribución geográfica de la enfermedad de Newcastle	4
2.3. Comportamiento del virus	6
2.4. Excreción del virus por las heces	6
2.5. Excreción del virus por el sistema respiratorio	7
2.6. Distribución del virus en el cuerpo	8
2.7. Identificación del virus de la enfermedad de Newcastle	9
2.8. Diagnóstico	9
2.9. Huéspedes	11
3. MATERIALES Y METODOS	32
3.1. Animales de experimentación	32
3.1.1 Punción de la vena alar	33
3.1.2 Muestra de secreción traqueal	33
3.2. Virus	34
3.3. Métodos de Laboratorio	36
3.3.1 Estudio de la Cepa 4160 de Newcastle	36
.1. Poder hemaglutinante para glóbulos rojos	36

	Página
.2. Hemaglutinación de glóbulos rojos de equino, bovino, curí, y conejo.	36
.3. Estabilidad de la hemaglutinina	36
.4. Tiempo promedio de mortalidad para embriones de pollo	36
.5. Determinación DL50	37
.6. Tratamiento con éter	37
.7. Determinación de la capacidad para producir hemólisis de glóbulos rojos de diferentes especies animales	37
.8. Determinación estabilidad a pH ácido	37
3.3.2 Cepa OR	37
3.4. Diagnóstico de la enfermedad de Newcastle	38
3.4.1 Preparación de solución salina bufferada	38
3.4.2 Glóbulos rojos de pollo	38
3.4.3 Prueba de hemaglutinación	39
3.4.4 Prueba de inhibición de la hemaglutinación	40
3.4.5 Prueba de seroneutralización	41
3.5. Técnica para aislamiento de virus	42
3.5.1 Recolección de material	42
.1. Muestras de materia fecal	42
.2. Muestras de hisopos traqueales	42
3.5.2 Inoculación de muestras en embriones, de pollo de 9-11 días de edad.	43
.1. Cavidad alantoidea	43

	Página
3.5.3 Recolección de muestras a partir de embriones de pollo	44
.1. Líquido alantoideo	44
3.6. Histopatología	44
4. RESULTADOS	46
4.1. Inoculaciones	46
4.2. Aislamiento de virus de la enfermedad de Newcastle de heces y secreción traqueal de loros (<u>Amazona</u> <u>achrocephala</u>).	47
4.3. Respuesta inmunitaria	48
5. DISCUSION	50
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
7. RESUMEN	56
8. SUMMARY	57
BIBLIOGRAFIA	83

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1 Susceptibilidad de la enfermedad de Newcastle en aves exóticas.	21
2 Aves silvestres susceptibles experimentalmente a la enfermedad producida por el virus de Newcastle y métodos de evaluación.	30
3 Inoculación de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), con cepas 4160 y OR de la enfermedad de Newcastle.	34
4 Vacunación de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), con cepa La Sota (Laverlam).	35
5 Características de las cepas 4160 y OR de la enfermedad de Newcastle.	58
6 Aislamiento de virus en base a la prueba HA de líquido alantoideo de embriones de pollo de 9-11 días de edad inoculados con suspensión de vísceras de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), inoculados previamente con 100.000 DL50 cepa 4160 de la enfermedad de Newcastle. Vías IM - IN	59
7 Aislamiento de virus en base a la prueba HA de líquido alantoideo de embriones de pollo de 9-11 días de edad inoculados con suspensión de vísceras de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), inoculados previamente con 100.000 DL50 cepa OR de la enfermedad de Newcastle. Vías IM - IN	60
8 Inhibición de la hemaglutinación en sueros de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), 10 ^m , 30, 45, 60 días después de inoculados con 10.000 DL50 cepa 4160 de la enfermedad de Newcastle. Vía intramuscular.	61
9 HI en sueros de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), 10,30,45 60 días después de inoculados con 100.000 DL50 cepa 4160 de la enfermedad de Newcastle. Vía intramuscular.	62
10 HI en sueros de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), 10,30,45, 60 días después de inoculados con 100.000 DL50 cepa 4160 de la enfermedad de Newcastle. Vía intranasal.	62

Tabla	Página
11 HI en sueros de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), 10, 30,45, 60 días después de inoculados con 100.000 DL50 cepa OR de la enfermedad de Newcastle, Vía intramuscular.	63
12 Inhibición de la hemaglutinación en sueros de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), 10,30,45,60 días después de inoculados con 100.000 DL50 cepa OR de la enfermedad de Newcastle. Vía intranasal.	63
13 HI en sueros de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), 10,30, 45, 60 días después de inoculados con 100.000 DL50 cepa OR de la enfermedad de Newcastle. Vía oral.	64
14 HI en sueros de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), 15, 30, 45,60 días después de vacunados con la cepa La Sota de la enfermedad de Newcastle. Vía nasal	64
15 HI en sueros de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), 15, 30, 45,60 días después de vacunados con cepa La Sota de la enfermedad de Newcastle. Vía ocular.	65
16 Aislamiento de virus en base a la prueba HA de líquido alantoideo de embriones de pollo de 9-11 días de edad inoculados con muestras de secreción traqueal y heces de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), inoculados previamente con 100.000 DL50 cepa 4160 de la enfermedad de Newcastle. Vías intramuscular, intranasal.	66
17 Aislamiento de virus en base a la prueba HA de líquido alantoideo de embriones de pollo de 9-11 días de edad inoculados con muestras de secreción traqueal y heces de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), inoculados previamente con 100.000 DL50 cepa OR de la ENC. Vías intramuscular, intranasal y oral.	67
18 Aislamiento de virus en base a la prueba HA de líquido alantoideo de embriones de pollo de 9-11 días de edad inoculados con muestras de secreción traqueal y heces de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), vacunados previamente con tra la enfermedad de Newcastle con cepa La Sota. Vías ocular y pasal.	68

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Inhibición de la hemaglutinación en suero de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), inoculados con 100.000 DL50 cepa 4160 intramuscular	69
2 Inhibición de la hemaglutinación en suero de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), inoculados con 100.000 DL50 cepa 4160 intranasal.	70
3 Inhibición de la hemaglutinación en suero de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), inoculados con 100.000 DL50 cepa OR intramuscular.	71
4 Inhibición de la hemaglutinación en suero de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), inoculados con 100.000 DL 50 cepa OR intranasal.	72
5 Inhibición de la hemaglutinación en suero de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), inoculados con 100.000 DL50 cepa OR digestiva.	73
6 Inhibición de la hemaglutinación en suero de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), vacunados con cepa La Sota contra la enfermedad de Newcastle, vía nasal.	74
7 Inhibición de la hemaglutinación en sueros de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), vacunados con cepa La Sota controla enfermedad de Newcastle, vía ocular.	75
8 Ciegos de pollo inoculado con virus de Newcastle mostrando ulceraciones a nivel de las amígdalas cecales.	76
9 Intestino de loros (<u>Amazona achrocephala</u>), con ulceraciones y hemorragias, inoculando previamente con virus de Newcastle.	77
10 Tráquea hemorrágica de loro (<u>Amazona achrocephala</u>) inoculando previamente con virus de Newcastle.	78
11 Pulmón de loro (<u>Amazona achrocephala</u>), con hemorragias microscópicas. Inoculando con virus de Newcastle.	79

Figura	Página
12 Cerebro de loros (<i>Amazona achrocephala</i>), con hemorragias y congestión. Inoculando con virus de Newcastle.	80
13 Infiltración monocitaria perivascular en cerebro de loros (<i>Amazona achrocephala</i>), inoculado con virus de Newcastle.	81
14 Edema y hemorragia en la mucosa traqueal de loro (<u><i>Amazona achrocephala</i></u>), inoculado con virus de Newcastle.	82

1. INTRODUCCION

Uno de los factores importantes que ha intervenido para lograr el desarrollo que actualmente tiene la avicultura en Colombia, es el de la aplicación de métodos modernos en las explotaciones avícolas aumentándose así la productividad y eficiencia de la industria. Pero al lado de estos avances, también aumenta el peligro de presentación de enfermedades y su control se dificulta más.

Así tenemos que la enfermedad de Newcastle, se ha convertido en el principal enemigo representando una seria amenaza económica a todos los sectores de la industria avícola.

El espectro de huéspedes del virus de la enfermedad de Newcastle que incluyen no solo a aves domésticas y salvajes sino al hombre y otros mamíferos, aumenta muchísimo su peligro potencial y actual.

La alta resistencia del virus a condiciones ambientales adversas y la facilidad con que se propaga especialmente en los exudados, excretas, y despojos de las aves infectadas juegan un papel importante en la diseminación de la enfermedad de Newcastle.

Esta es la razón por la que se propone hacer un estudio de la importancia epizootiológica de la familia Psittacidae, especialmente el papel que pueda desempeñar en la diseminación y perpetuación de la enfermedad de Newcastle.

1.1. LOS OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO FUERON:

Establecer la patogenesis de la enfermedad de Newcastle en loros.

Averiguar el papel de portadores que los loros puedan jugar en la diseminación de la enfermedad de Newcastle.

Estudiar la respuesta inmunitaria en loros a cepas patógenas y vacunales de Newcastle de pollos.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD.

De una revisión de literatura publicada durante el período 1926-1964 por Lancaster, parece el virus de la enfermedad de Newcastle de haber cambiado de virulencia cuando se identificó la enfermedad en 1926 era extremadamente virulenta y causaba 100% de mortalidad.(19)

La forma de la enfermedad se reconoció cerca de 10 años más tarde llamándose neumoencefalitis era menos virulenta. Después de un intervalo de 10 años por el año de 1944 brotes sistemáticos fueron reportados.(19)

Tres cepas de virus de la enfermedad de Newcastle pueden ser diferenciadas de acuerdo con la patogenicidad para los embriones de pollo, para pollos de un día, y para pollos de 6-10 semanas de edad la diferencia en la patogenicidad para huevos embrionados es determinada por la diferencia en el tiempo de la muerte y por la dosis mínima letal (D.M.L.), las cepas lentogénicas necesitan más de 100 horas para matar embriones. Las cepas mesogénicas toman de 60 a 90 horas para matarlos y las cepas velogénicas, por lo general, matan alrededor de las 50 horas. (19).

Se hace énfasis por la forma velogénica por ser esta la cepa de referencia que se utilizó para la investigación. Los embriones de pollo de 9-11 días inoculados con la cepa velogénica, se presenta la muerte del 2o. al 4o. día, como lesiones se observan: hemorragia craneal, congestión del hígado, con frecuencia hemorragia y congestión de la membrana vitelina, pequeñas manchas grisáceas, como placas o focos en la membrana corioalantoides.

Los pollos por infección natural o por exposición en forma de aerosol con la cepa velogénica presentan síntomas de decaimiento seguida de depresión marcada, a menudo diarrea mucosa y cianosis de la cresta; si la muerte no ocurre se presentan incoordinaciones, temblores, ataques rítmicos, parálisis y postración. La muerte ocurre generalmente de los 4 a los 14 días y cuando hay recuperación, esta sigue su secuela.

Lesiones aparentes: hemorragias del proventrículo y de la mucosa de la molleja y de las vías linfáticas del intestino con características de algunas pero no de todas las cepas. (7).

2.2. DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE.

Kraneveld en 1926, informó de una infección altamente difusible y mortal de las gallinas, que prevalecía en las Indias Orientales Holandesas. El mismo año, Doyle observó la enfermedad cerca de Newcastle-on Tyne, Inglaterra. Doyle dió a la enfermedad el nombre de esta localidad y demostró que era una entidad distinta de la temible peste de las aves.

Durante el decenio consecutivo al descubrimiento de la que ahora se denomina generalmente Enfermedad de Newcastle, se informó de la presencia de esta enfermedad en la India, Filipinas, Corea, Japón, Australia, Ceilan y Kiña. Posteriormente apareció en Palestina, Siria, y Congo Central y en la segunda guerra mundial, se difundió a Europa por la vía de Sicilia e Italia. En los Estados Unidos se difundió en 1944. Hacia 1948 la enfermedad se propagó por todos los Estados Unidos, Hawai y Canadá y, en 1951 se había diseminado ampliamente en Europa y varias partes de Africa. Se ha

descubierto también en Magdalena, Méjico y América Central y del Sur, en Colombia apareció en 1949. (5).

Muchos de los brotes anteriores de la enfermedad de Newcastle fueron asociados con muertes de aves a los alrededores. Sin embargo, esto no fue hasta 1950 que el virus fue recobrado con alguna irregularidad en aves tales como paloma (Columba livia), gorriones (Passer domesticus), faisanes (Phasianidae) y perdices (Pedix sp.) (5).

Hay poca información sobre la enfermedad de Newcastle de existir en forma endémica en poblaciones de aves silvestres pudiendo jugar un papel importante en la diseminación de la enfermedad de un país a otro.

Los pollos son más susceptibles a la enfermedad clínica que otras aves domésticas. Sin embargo, en pollos un estado permanente de portador es poco común. Torcazas son susceptibles a la enfermedad pero brotes en estas especies a menudo permanecen en forma subclínica. Aparentemente las torcazas han contribuido a la extensión de la enfermedad de Newcastle entre países y también entre un país. La extensión de la enfermedad entre aves puede ocurrir por una variedad de formas, el transporte de aves domésticas ha sido considerada de mayor importancia de extensión. Aunque el virus ha sido recobrado de huevos, la transmisión por éstos es raramente reportada. Sin embargo, esta forma de transmisión permanece potencialmente peligrosa, el virus ha sobrevivido por fuera del huésped en forma variable como a menudo largos períodos, este se considera que la sobrevivencia del virus en el medio ambiente juega un papel en la perpetuación y diseminación

de la enfermedad. (5).

2.3. COMPORTAMIENTO DEL VIRUS.

El virus de Newcastle está clasificado como Paramixovirus, 150 a 200 mu. de tamaño con envoltura, sensible al eter contiene ribonucleoproteínas con simetría helicoides. (12).

Posee cuatro actividades biológicas. a) aglutinación de los eritrocitos; b) actividad neuroamidasa; c) hemólisis de heritrocitos; d) estimulación de la hemaglutinación. Puede ser desintegrado por tratamiento con solventes de lípidos como eter butanol. Es muy resistente a las bajas temperaturas, puede vivir en la carne de gallina congelada por más de dos años, resisten temperaturas de 56° durante 30 minutos, el agua hirviendo lo destruye casi inmediatamente; es susceptible a los rayos solares y muere en 30 minutos de exposición. (1,12,25).

El virus ha sobrevivido fuera del huésped por períodos variables. Se considera que la sobrevivencia del virus en el medio ambiente es un factor importante en la perpetuación y diseminación de la enfermedad. (25)

2.4. EXCRECION DEL VIRUS POR LAS HECES.

La excreción del virus de la enfermedad de Newcastle en varias especies de aves condujo a Gillespie et al (1950); Gustafson and Moses (1958), Karstad et al (1959), Seetharaman (1951), y Spatalin (1959), citados por Lancaster (19), a creer que las gallinas podrían infectarse a través de heces de aves.

Kaschula (1950), citado por Lancaster (19), ha sugerido que las heces de aves salvajes podrían jugar una parte en la extensión de la enfermedad de Newcastle en Sur América.

En pollos previamente vacunados la excreción de virus virulento de campo ha sido encontrado en una variedad de períodos.

7 días (Kraneveld and Mansjoer, 1950).

9 días (Asplin 1952).

2 semanas (Brunner 1957).

3 semanas (Adler et al 1951).

5 semanas (Van Waveren, 1955).

Pollos no vacunados experimentalmente infectados con virus de campo excretan virus en las heces hasta 11 días (Jungherr, 1948), 34 días (Walker 1954), citados por Lancaster (19).

2.5. EXCRECION DE VIRUS POR EL SISTEMA RESPIRATORIO.

La diseminación del virus de la enfermedad de Newcastle de pollos susceptibles colocados en contacto ocurre en mayor grado cuando el virus es administrado por el grupo donador por la ruta respiratoria. Esto indica que la transmisión es principalmente por aerosol (13).

En pollos inmunes la reinfección con virus virulento parece ser confinado al tracto respiratorio y dura 4-5 días (Doll et al 1950), 30 días

(Zhydaor, 1951). En pollos no inmunes el virus ha sido recobrado del tracto respiratorio de 6 días (Miller 1950); 21 días después de la infección (White et al 1954), citado por Lancaster (19).

La enfermedad se transmite rápidamente por aerosol en forma experimental o naturalmente, Hanson recobró el virus del aire en las proximidades de pollos infectados del 30. al 60. día después de exposición bajo condiciones experimentales esto fué mostrado que en cada minuto de aerosol pollos podían inhalar cinco partículas de virus. (16).

2.6. DISTRIBUCION DE VIRUS EN EL CUERPO.

Hanson (16), demostró que cuando el virus se inyectaba a un ave susceptible, se extendía rápidamente de el sitio de la inoculación y podía ser detectado en casi todos los tejidos en 48 horas y en todos en 72 horas, los siguientes tejidos han sido adecuados: pulmón y traquea, bazo y cerebro.

El tejido cerebral probablemente tiene la más alta concentración de virus, sin embargo, Kohler (1960), citado por Jungherr (17), observó considerables cantidades de virus de Newcastle en los leucocitos por 3 días después de la infección artificial.

Kohn 1953, citado por Hanson (16), en una comparación de filtración y tratamiento con antibióticos (penicilina y estreptomicina) encontró que en 22 muestras con filtro fueron negativos a virus al inocular embriones, mientras que los materiales antibrotados fueron positivos.

2.7. IDENTIFICACION DE VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE.

Varios criterios para identificar el virus de la enfermedad de Newcastle han sido reportados por Hanson et al (16).

Patogenicidad para huevos embrionados de pollo.

Tiempo medio de mortalidad por dosis mínima letal.

Patogenicidad para pollos de un día de edad.

Patogenicidad para pollos de seis semanas de edad.

Manifestación de la enfermedad.

Antigenicidad (anticuerpos protectivos).

Seroneutralización (Homólogos DL50 neutralizados).

Hemaglutinaciones con eritrocitos de pollo y otros animales.

Pruebas de inhibición de la hemaglutinación.

Estabilidad al calor de la hemaglutinación a 56°C.

Toxicidad en ratones.

2.8. DIAGNOSTICO

Las pruebas de la hemaglutinación, inhibición de la hemaglutinación y seroneutralización se utilizaron para el diagnóstico de la enfermedad de Newcastle en el presente trabajo.

La hemaglutinación propiedad del virus de la enfermedad de Newcastle ha sido descrita por Burnet (1942), que encontró que aglutinaba células rojas de hombre, cerdo, ratón, pollo, gorrión y rana.(19).

La aglutinación de espermatozoides de humanos, bovinos, aviares por

virus de Newcastle ha sido descrita por Chu (1953), siendo similar a la aglutinación de glóbulos rojos. Citado por Lancaster. (19).

Similar aglutinación de leucocitos y plaquetas ha sido descrito por (Jerushalmy et al 1963). El virus no aglutina células de mono, oveja, caballo, conejo, marsupial. Sin embargo, el virus puede aglutinar eritrocitos de camello, búfalos y vacas. Citado por Lancaster (19).

Diagnóstico rápido usando extractos de tejidos en la prueba de la hemaglutinación se han estudiado, para este fin han sido preparados extractos de pulmones, hígado y bazo. El método podría ser de valor en las etapas iniciales de la infección antes que los anticuerpos aparezcan, sin embargo, Belie (1962), citado por Lancaster (19), ha reportado un alto porcentaje de HA negativo y ha concluido que tal prueba rápida es de limitado valor.

Dos procedimientos para HI han sido usados. El procedimiento alfa (Fabricant 1949), la suspensión de virus se diluye en forma seriada mezclado con iguales volúmenes de suero, y el procedimiento Beta el suero se diluye en forma seriada y mezclado con una cantidad constante de dilución de virus, conteniendo un número conocido de unidades hemaglutinantes.

Discos de papel absorbente (serodiscos), han sido usados para coleccionar muestras de toda la sangre, usando la prueba beta. Esta técnica resultó en la identificación de 85% de faisanes con un título en el suero de 200 o más alto. (19).

La prueba de HI depende de la presencia de anticuerpos circulantes a

un alto nivel. En la enfermedad de Newcastle están generalmente presentes 5-10 días después de la infección, 0-2 días después de los primeros síntomas respiratorios. (8).

Algunos pollos pueden aparentemente vencer el virus virulento sin desarrollar alto título de HI; hay variación de título en sueros en individuos.

Para el diagnóstico de la enfermedad de Newcastle la prueba HI ha sido satisfactoria cuando se aplica con extractos de órganos hígado, bazo proventrículo, sangre coagulada. (19).

Burnet (1942), citado por Lancaster (19), demostró que suero de aves que se habían recuperado de la enfermedad contenían anticuerpos capaces de inhibir la hemaglutinación de los glóbulos rojos por el virus.

La aglutinación de glóbulos rojos por virus de Newcastle puede ser inhibida por sustancias extraídas de pulmones de humanos y porcinos y otros. Similares sustancias en el fluido alantoico normal de embriones de pollo de 13 días han sido encontrados. (19).

2.9. HUESPEDES.

Las aves desde el comienzo de la incubación de la enfermedad de Newcastle y durante el período clínico son el más potente foco de infección.

Gordon (1948) citado por Biester (5), dedujo que la introducción de pavos sanos provenientes de regiones infectadas fue al parecer la causa

de algunos brotes de la enfermedad de Newcastle. Otras aves especialmente las silvestres (gorriones, tórtolas y corvejones), parecen haber actuado como vectores o portadores.

Se ha comprobado la presencia de virus en las heces de varios mamíferos: ratas, perros, zorros, gatos, por períodos hasta de 72 horas después de haber ingerido el virus de enfermedad de Newcastle, contenidos en cadáveres de aves infectadas.

No se ha culpado a ningún artrópodo como vector de enfermedad de Newcastle, Komarov (1940), citado por Biester (5), halló abundantes garrapatas en una pavada infectada, pero dadas a comer a un ave sana no transmitieron la enfermedad. Por inoculación en aves susceptibles de garrapatas provenientes de aves enfermas se demostró que el virus sobrevive fuera o dentro de la garrapata hasta 7 días, pero no diez o trece.

El mismo autor halló el virus en el piojo común de las gallinas recogido de éstas (a los 35 días) de la inyección subcutánea del virus.

Hoftad (1949), citado por Biester (5), obtuvo resultados negativos con el traslado de ácaros (Liponissus sylvianum) de aves infectadas, pero fue positiva la inoculación en el lavado de ácaros que se habían alimentado de aves infectadas.

Datos recientes, que informan de la existencia de enfermedad de Newcastle entre aves que antes no se sabía que la sufrieran, indican que la susceptibilidad de las especies está aumentando, quizá en parte, como

resultado de mutación adaptativa. Cabe hacer algunas adiciones a las especies que desde hace tiempo sabemos contraen espontáneamente la enfermedad y que son: gallina, pavo, pintada, pato, ganso, paloma, faisán, perdiz, cuervo, gorrión, maya y martín, así como especies no identificadas de aves silvestres. (19).

Hay reportes de haberse encontrado el virus de la enfermedad de Newcastle en otras especies: un caso de infección natural de un estornino europeo (*Sturnus vulgaris*). En Nueva York (Gillespie et al 1950); hallazgo del virus en la médula ósea de una bavia (*Sula bassana*); en los Orkneys (Wilson, 1950); en una lechuza cornuda gigante (*Buho virginianus*), en Ohio, que mostraba complicación nerviosa en una osifraga (*Pandion Haliaetus*), en tres pericos (Paleornia), en Holanda, infectadas naturalmente, en un brote ocurrido en el jardín zoológico, se encontraron la lechuza pequeña (*Athene noctua*), cuervo (*Bucorvus* sp.), aguililla de cola blanca (*Haliaetus albicilla*), y un halcón (*Dacelo gigas*), citados por Biester (5).

Entre las aves susceptibles a la inoculación tenemos la gaviota, el gorrión, el tetrao y la tórtola reidora (5). De posible orientación sobre la conducta previsible de las especies consideradas relativamente resistentes sirve la infección del pato y del ganso. Los primeros informes referían casos de muerte y susceptibilidad incompleta entre estas especies, durante brotes que atacaron a gallinas alojadas en las mismas granjas y regiones, corrobora en lo fundamental la resistencia del pato y el ganso a la enfermedad de Newcastle (5). La paloma y la paloma torcaz (16), son susceptibles a la cepa GB en inhalación, les causa enfermedad grave y a menudo mortal.

Moses 1951, citado por Lancaster (19), infectó a pájaros, vacas, grajos, estorninos y gorriones ingleses, con aerosoles de la cepa 11914. Los gorriones fueron además sometidos a aerosoles de la cepa GB y contrajeron la infección.

El ratón hamster, mono, perro, cobayo, conejo, huron, cerdo, ternera, gato, murciélago, musarafa, erizo y chinchilla mostraron manifestaciones clínicas después del contacto artificial con un virus de enfermedad de Newcastle, principalmente por vía parenteral. (19).

Matzer (21), describió aislamiento e identificación de una cepa del virus de la enfermedad de Newcastle aislada de loros (Amazona achrocephalus), capturados en la costa sur de Guatemala. El virus se caracterizó por su marcado tropismo por el sistema (respiratorio) nervioso central, tanto en los huéspedes donde se aisló como también en pollitos de 10 días de edad inoculados intraqueal e intramuscularmente.

El virus fue altamente mortal para el embrión de pollo en los que se obtuvo un título DL50 de $10^{-9.6}$ por ml. de suspensión. Se identificó el virus por su poder hemaglutinante (Ha), y por la inhibición de la hemaglutinación (HI), con suero inmune específico contra el virus de la enfermedad de Newcastle.

Como sistemas predominantes tenían anorexia, depresión, y convulsiones clónicas y tónicas, después de 2 a 3 días de postración morían. Se presentaron dos casos de recuperación parcial después de haber presentado síntomas similares menos dramáticos; como lesiones macroscópicas presentaron

aerosaculitis purulenta o gaseosa, peritonitis, con una hepatitis necrótica focal y pericarditis fibrinosa. En las meninges hemorragias equináticas o patequiales; como lesiones microscópicas había en cortes de cerebro degeneración neuronal, del parenquima cerebral.

Gaurini y Cabasi (1960) citado por Alfonso (2), reportaron un brote de la enfermedad de Newcastle en loros (Amazona achrocephalus), tres días después de su llegada a Italia por vía aérea procedentes de Colombia. La enfermedad se extendió por contacto directo a un pavo real, a un ave salvaje, a un macaco (HRA severa), a una gallina de guinea (Heryllus vulturinum), el macaco y el ave silvestre murieron y los sobrevivientes desarrollaron síntomas nerviosos; el virus de la enfermedad de Newcastle fué aislado en embriones de pollo con sus características biológicas, habiéndose sugerido que se trataba de una cepa exótica.

Según Francis (14), la distribución geográfica de la enfermedad de Newcastle en la familia ^{Psittacidae} durante los años 1970 y 1971 es:

Holanda: de acuerdo a Roepke (1971), citado por Francis (13), se aisló cepa velogénica de la enfermedad de Newcastle en Enero de 1970, de Psittacines importados, esto fue seguido por nueve aislamientos más entre Febrero y Septiembre de 1970. Posteriormente a la importación de esos Psittacines de Paraguay y Colombia, brotes de la enfermedad de Newcastle ocurrió en aves domésticas.

Alemania: empezando en Mayo 25 de 1970 aislamientos frecuentes de la enfermedad de Newcastle fueron hechos de Psittacines importados. La mayoría

de estos procedían de Paraguay.

Pohl (1971), citado por Francis (13), reportó otro aislamiento en Septiembre de 1970 de Psittacines importados de Colombia.

República de Sur Africa: en agosto de 1970 la enfermedad de Newcastle ocurrió en loros en cuarentena pocos días después de llegar de Holanda. Se sospechó que el lugar de origen fue Paraguay. La enfermedad se extendió en forma intensiva en áreas de aves (6).

Sur América: Hincapié y Yates (1968), reportaron cepas velogénicas en Colombia. (15).

En Perú se reportó que la enfermedad de Newcastle empezó en Enero de 1970 y terminó hasta Agosto del mismo año, pollos de todas las edades fueron afectados (Pinedo 1972), citado por Grass (15).

El primer aislamiento de virus de la enfermedad de Newcastle fue hecho en Octubre de 1970, Hanson (15), en su reciente reporte de enfermedad de Newcastle indicaron que dos aislamientos fueron recibidos de Colombia; una de estas cepas fue aislada en 1969, de un lote de 6.000 broilers y todos murieron.

La otra cepa fue posiblemente aislada en 1970, de loros que fueron tomados en el río Amazonas en la región de Colombia y Perú; ellos presentaron una alta mortalidad y morbilidad en cuarentena.

América Central: Matzer y De Mota (21), describieron un caso de la

enfermedad de Newcastle en loros que habían sido capturados dos semanas antes. Las cepas aisladas fueron de tipo velogénico.

Inglaterra: en Agosto 24 de 1970 un brote de la enfermedad de Newcastle ocurrió en Essax sobre la costa Este. Este brote fue cinco días después de un envío de loros llegados al aeropuerto de Hesthrow.

Keimer (17), ha indicado tres aislamientos de enfermedad de Newcastle en aves de la familia Psittacidae importado de Colombia en Julio 26 de 1970. En una importación de treinta aves, catorce murieron pocos días después de llegar a Inglaterra. Esto parece muy probable que la imputación de Psittacines podría haber jugado un papel importante en el brote de 1970.

Estados Unidos: hubo considerable confusión con respecto a la enfermedad de Newcastle que ocurrió en los Estados Unidos de 1970-1971. El primer caso reportado fue en catorce Psittacines en Brooklyn (Nueva York) en Marzo de 1970. Estos habían sido importados dos semanas antes. Esto fue seguido por un brote, cerca de cuatro mil pollos nuevamente por una importación de Psittacines en Agosto en Nueva York, estas aves eran originarias de Paraguay, cepa velogénica viscerotrópica de la enfermedad de Newcastle apareció en los Estados Unidos en aves caseras en Nueva York en Agosto de 1970. En Abril de 1971 apareció en Miami también en aves Psittacines importadas. Por ese tiempo la enfermedad apareció en ponedoras en el Oeste de Texas y Nuevo México. La enfermedad permaneció en una relativamente pequeña área y no se extendió. (6).

La enfermedad ha sido introducida en los Estados Unidos por importación de Psittacines y probablemente por movimiento de aves ornamentales.

En los últimos dieciocho meses, setenta y dos aislamientos de cincuenta y ocho brotes de la enfermedad de Newcastle han sido reportados en la Universidad de Wisconsin por investigadores.

Número de cepas viscerotrópicas recibidas durante los últimos 18 meses.

Especie	No. Viscerotrópicas Total examinado.
Pollos	83/35
Aves ornamentales	16/16
Loros	13/14
Pavos	1/6
Patos	1/1

Sesenta y cuatro de estos setenta y dos aislamientos obtenidos de cinco diferentes especies de aves fueron caracterizados como cepas viscerotrópicas (velogénica) las restantes 8 fueron neurotrópicas (6).

Estudillo (10), describió un reporte clínico de un caso de la enfermedad de Newcastle ocurrido en una amplia variedad de especies de aves enjauladas en el mismo lugar. La localización fue en una área tropical de México.

Las siguientes órdenes o familias de aves fueron incluidas durante

el brote epizootiológico.

- Galliformes: Golden, gighy, ring neck, tragopan, teminick, nika-do, silvers, carmelito y azul manehurian, java verde, azul y blanco, curassao, gallina guinea y gallina jungla.

- Columbiformes: incluye unas pocas palomas y tres grandes variedades de Australianas, Nueva Guinea, paloma coronada, goura cristata y goura victoria.

- Psittaciformes: tales como guacamayas azul del Brasil, guacamayo rojo y loro con cabeza amarilla del Amazonas.

- Ramphastidae: toucan tocotucan, couvier toucan y tucanet verde.

- Anatidae: diferentes especies de patos: mandarina Shelduck, muscovy, pochard y otros.

- Anseriformes: pavos canadienses, pavo egipcio, screamers.

- Phoenicopteridae: flamingo rojo y flamingo chileno.

- Gruiformes: demoisele crane, crane coroneado.

- Rheiformes: Rhea.

- Casuariformes: como negro cassowari.

Fue difícil decidir como empezó el brote, aparentemente los primeros infectados fueron Psittacines y Galliformes, al menos en estas

especies, los síntomas y mortalidad fueron más aparentes que en otras especies por su más alta susceptibilidad natural al virus.

Psittociformes: loros y guacamayas fueron después de Gallinaformes las aves de más alta susceptibilidad con morbilidad y mortalidad. Hubo una alta incidencia de síntomas nerviosos con incoordinación, ataxia, torticolis y parálisis, los síntomas respiratorios fueron leves, en cuanto lesiones predominaban vísceras congestionadas y hemorrágicas, úlceras casi tan severas como en Galliformes, lesiones necróticas en Miocardio, hígado, riñón y bazo, pulmones congestionados y hemorrágias.

TABLA 1. Susceptibilidad de la Enfermedad de Newcastle en aves exóticas.

Huéspedes	Síntomas						
	Orden familias especies	Morbilidad	Mortalidad	Nervioso	Respiratorio	Digestivo	Aislamiento Virus
Galliformes							
Faisanes	+++	+++	+++	+	+	+++	+
Peafowl	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Gallina guinea	++	++	++	+	+	++	+
Gallina jungla	+++	+++	+++	+	+	++	+
Curasaw	++	+	+	-	-	+	-
Columbiformes							
Palomas	++	+	+	+	+	-	+
Growned							
Gorrion	++	++	++	++	-	-	+
Psittaciformes							
Loros	+++	++	++	+++	+	-	+
Guacamayas	+++	+++	+++	+++	+	+	+

Continuación TABLA 1

Rheiformes								
RHGA	+	+	-	+	-	-	-	-
Casuariiformes								
Cassowary	+	-	(+)	-	-	-	-	-
Passariiformes								
Gorriones ferral	+	+	++	-	-	-	-	+

+++ Más del 50%

++ Cerca del 25%

+ Cerca 10% o menos

(+) Recuperado de infección

- No infectado (19).

Cincuenta pollos broiler susceptibles fueron descargados intranasalmente con una gota de una dilución de fluido aminoalantoico conteniendo 1000 DL50 dosis embrión de pollo resultando 100% de mortalidad entre 72 horas después de la descarga. Depresión aguda se observó antes de las muertes con incoordinación y síntomas nerviosos.

Lesiones: Úlceras en intestino y proventrículo, hemorragias subcutáneas y musculares.

Enfermedad de Newcastle otros (animales) huéspedes.

Palomas: el papel que juega la paloma doméstica (Columba livia), en la diseminación de la enfermedad de Newcastle ha sido estudiada por varios autores.

Observaciones tanto de laboratorio como de campo han indicado que las palomas pueden diseminar la enfermedad. (3).

Kaschula (1952), citado por Lancaster (19), reportó que las palomas podían excretar virus en las heces por varios días después de ser dosificadas con virus virulento. Sin embargo, palomas infectadas no diseminan el virus durante cohabitación al menos que estas hayan sido infectadas intranasalmente. Esto ha sido observado que las palomas en contacto con pollos infectados, o en locales contaminados han permanecido clínicamente sanas.

Se ha concluido que las palomas bajo condiciones naturales no diseminan el virus a partir de lotes de aves de corrales infectados.

Reus (1961), citado por Lancaster (19), encontró que palomas infectadas oralmente excretaron el virus de la enfermedad de Newcastle por un mínimo de tres días en cantidad suficiente para infectar pollitos puestos en contacto con ellas. Palomas colocadas en contacto directo con pollos infectados de la enfermedad de Newcastle desarrollaban una infección subclínica. Estas a su vez transmitían la enfermedad a pollos jóvenes.

Patos y gansos: se han reportado casos de infección natural de la enfermedad de Newcastle en patos y gansos, pero se ha considerado que estas especies son más resistentes que las gallinas cuando estos animales se han infectado artificialmente excretan virus hasta 15 días.

Los gansos y los patos pueden jugar un papel importante en la diseminación del virus. Esto ha sido indicado por el aislamiento del virus de 48 de 263 muestras de tejidos de patos; la recuperación del virus del contenido intestinal de patos 6 meses después de la infección.
(3).

Pavos: estos juegan papel más importante en la diseminación de la

enfermedad de Newcastle que gansos y patos. Aparentemente pavos sanos procedentes de áreas infectadas han sido consideradas responsables de la diseminación de la enfermedad de Newcastle. En Gran Bretaña se ha sugerido que algunos pavos podrían permanecer como portadores. (26).

Mamíferos: varias especies de mamíferos han sido empleados para estudios de laboratorio. Los resultados de estos estudios indican que la habilidad del virus de la enfermedad de Newcastle de multiplicarse en mamíferos es limitado. En general la enfermedad de Newcastle no parece ser espontáneamente transmisible a mamíferos bajo condiciones naturales.

No hay evidencia todavía que mamíferos jueguen un papel en la diseminación del virus.

El hombre ha sido solamente el único mamífero en donde la infección ocurre naturalmente.

Murciélagos: se ha encontrado que son susceptibles a la inoculación intracerebral con diferentes cepas de virus de la enfermedad de Newcastle. El virus se ha mantenido también patógeno para embriones de pollo después de pasajes intracerebral en murciélago.

Gatos: la susceptibilidad de gatos domésticos al virus de la enfermedad de Newcastle han sido reportados por Feldberg (1958) y Bolin (1948), citados por Lancaster (19), aislaron virus en las heces de un

gato cinco meses después que fue alimentado con pollos infectados.

Perros y zorros: virus de la enfermedad de Newcastle ha sido recuperado de orina y heces de un zorro y perro del primer y quinto día después de ser alimentados con carcasas de gallinas que murieron de enfermedad de Newcastle.

Asplín (3): encontró que después de inoculación intramuscular de virus a cerdos, fue excretado en la orina por un máximo de 48 horas.

En un experimento con cerditos murieron en 3-11 días más tarde con desarrollo de síntomas nerviosos.

Hamsters: varios autores han reportado la susceptibilidad de Hamsters al virus de la enfermedad de Newcastle. Así Reagan (1947), citado por Lancaster (19), hizo 300 pasajes de virus virulento en cerebro de Hamster. El virus produjo síntomas de irritabilidad, parálisis y rápida muerte. La cantidad de virus necesaria para producir la enfermedad en Hamsters varía con la ruta de inoculación intracerebral, se concluyó que era la vía más apropiada.

Caballos: caballos han sido inoculados para producir suero hiperinmune (19).

Monos: la inoculación intracerebral de monos con virus de la enfermedad de Newcastle produce meningoencefalitis. Inyección intramuscular produce una leve o no efecto clínico. (19).

Conejos y curies: han sido usados en estudios de laboratorio.

Vacas: dos casos de infección natural de la enfermedad de Newcastle han sido reportados en terneras. El virus fue aislado de terneras muertas que tenían síntomas respiratorios.

Aunque en terneras han sido infectadas artificialmente, hay información pero no confirmada que el ganado juega un papel en la diseminación de la enfermedad. Varios estudios han sido hechos sobre la propagación del virus de la enfermedad de Newcastle en la glándula mamaria de vacas. El virus ha permanecido en la glándula mamaria por períodos variables, aproximadamente dos semanas y en la mayoría de los casos ha estimulado la producción de anticuerpos neutralizantes. La glándula mamaria parece ser el principal lugar de producción de anticuerpos. (19).

Aves de caza: algunas aves de caza particularmente faisanes han sido asociados con brotes de la enfermedad de Newcastle en aves de corral. No ha sido claros en afirmar si las aves de caza han sido infectadas por aves de corral o viceversa.

En Essex (Inglaterra), hubo una apreciable mortalidad en faisanes. Al exámen postmortem típicas lesiones de la enfermedad incluyendo traqueitis, hemorragias del proventrículo y úlceras y hemorragias en el intestino. El virus fue aislado de dos casos.

Perdices: en 1971 hubo un brote de enfermedad de Newcastle, al Este de Anglia, pero ninguna de las aves mostraron lesiones sugestivas de Newcastle. El aislamiento del virus se intentó cuando se había hecho el diagnóstico no alternativo pero con resultados negativos. (6).

Animales de sangre fría - reptiles y pescados: Qures (1957), citados por Lancaster (19), inoculó intracerebralmente el virus de la enfermedad de Newcastle en peces (Garassius auratus), culebras de jardín (Thamnophis sirtalis), pero no encontró ningún estado de portador.

Tortugas pequeñas (Graptemya geographicole suers), ha reportado Lancaster (19), que el virus de la enfermedad de Newcastle podía ser recuperado por varios meses después de la inoculación intracerebral de las tortugas y de 3 especies de culebras (Natrix natrix, Natrix vipernia y Malpolon monspessulana).

Invertebrados: Insectos. Estudios de invertebrados y de ectoparásitos en particular indican que ellos juegan un papel similar a mamíferos en la diseminación de la enfermedad de Newcastle, Hofstad (19), mostró que (Liponyssus silvarium), hospedaba el virus después de alimentarse con aves infectadas durante el estado de verenia. Sin embargo, la picada del insecto no transmitía el virus de la enfermedad de Newcastle a aves susceptibles. Los ectoparásitos (Genera menopon. Lipeurus), no juegan papel en la diseminación de la enfermedad.

Lombrices: virus de la enfermedad de Newcastle ha sido encontrado en lombrices durante cuatro días o dieciocho días si las lombrices fueran guardadas, a 21°C.

El papel que juega la lombriz (Ascaridia galli), en la transmisión del virus de la enfermedad de Newcastle, fue examinado por Lancaster (19), quién encontró que el virus podía ser recuperado de estos nemátodos removidos de pollos muertos por Newcastle.

Caracoles: el hallazgo del virus de la enfermedad de Newcastle permaneció vivo por varias semanas en el cuerpo del caracol (Achatina fulica), Se ha sugerido que el caracol podría diseminar el virus.

TABLA 2. AVES SILVESTRES SUSCEPTIBLES EXPERIMENTALMENTE
A LA ENFERMEDAD PRODUCIDA POR EL VIRUS DE NEW-
CASTLE Y METODOS DE EVALUACION

(Modificada por Gustafson y Moses, 1953b).

NAME			
Scientific	Vernacular	Methods of evaluation	Author
Bubulcus ibis	Stilt bird	S,D,V	Placidi and Santucci (1953a)
Lophortyx Xali- fornica.	California quail	S,D.	Beach (1942)
Colinus virgi- nianus.	Bobwhite quail	HI	
Perdix perdix	Hungarian par- tridge.	S,D,HI	
Alectoris grae- ca.	Chukar partrid- ge.	HI	Fonstermachar <u>et al</u> (1946).
Phasianus col- chicus.	Ring-neck phea- sant.	HI	
Gennaesus nycth- merus.	Silver pheasant	S,D	Beach (1942).
Francolineus capensis.	Cape pheasant	D,V	Kaschula (1950).
Columba livia	Pigeon	V	Beach (1942).
		HI	Fenstermacher <u>et al</u> (1946)
		S,D,V	Hanson and Sinha (1952).
		S,D, HI	Placidi and Santucci (1953a)
Geopelia Stria- ta	Japanese dove	S,D	Collier and Dinger (1950)
	Stone pigeon		Mansjoer (1961)
	Striped ground Dove	V	Kraneveld and Mansjoer (1950b)
			Martini and Kurjana (1950)
Columba palum- bus	Ringed pigeon	S,D,HI	
Streptopelia turtur	Forest turtle- dove.	S,D, HI	Placidi and Santucci (1953a)

Continuación Tabla 2.

Streptopelia	Ringed dove	S,D	
Risoria			Kaschula (1950)
Streptopelia	Laughing dove	D,V	
Senegalensis			
Streptopelia	Spotted dove	S,D	Martini and Kurjana (1950)
chinensis.			
Tigrina			
Zenaidura ma-	Mourning dove	S,D	Jeziarski (1950)
crourea			
Streptopelia	Dove	S,D	Hanson and Sinha (1952)
(hybrida)			
Munis punctu-	Prit		
lata			
Misoría			
Munia maja za-	Bondol	S in some	
perena			
Munia ferrigi-	Bondol	D and serial	
nosa			
Uroloncha leu-	Prit	Passages in	Collier and Dinger (1950)
cogastra.		last 2 species	
Leucogastroi-			
des			
Padda pryzivo-	Glatik		
ra			
Ploceus manyar	Manyar		
Passer melanurus	Cape sparrow	D,V	Kaschula (1950)
Passer domesti-	English sparrow	S,V	Gustafson and Moses (1953a)
cus			Manajoer (1961)
Corvus monedula	Jackdaw	V, HI	Baczynski (1960a)
			Keymer (1961)
Corvus bráchy-	American	D, HI,V	Karstad <u>et al</u> (1959)
hynchos.			

S Symptoms

D Death

HI Haemagglutination inhibition activity of serum.

V Virus isolation or virus transmission
citado por Lancaster (19).

3. MATERIALES Y METODOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias, del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), en la ciudad de Bogotá, Colombia.

3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron loros (Amazona achrocephala), procedentes de Barranquilla, los cuales se colocaron en unidades de aislamiento previa comprobación de ausencia de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle, mediante la prueba Inhibición de la Hemaglutinación.

Clasificación

Orden: Psittaciformes

Familia: Psittacidae

Especie: achrocephala

Género: Amazona achrocephala

Son arborícolas, se alimentan de frutas y anidan en huecos de árboles, algunos aunque raro en agujeros de rocas; los huevos son ovales o redondos lisos y blancos, el macho ayuda a su compañera a la incubación, los polluelos nacen ciegos, desvalidos y pronto se cubren de espeso plumaje, se les alimenta con comida ya preparada que los padres vomitan en el pico de los pequeñuelos (rejurgitación).(23).

En Colombia existen 50 especies entre 316 existentes en el mundo,

La Amazona achrocephala, tiene un plumaje general verde, coronilla amarilla, speculum rojo, la cola con rojizo en la base; longitud total 25-35 cms.

Otras especies son: Amazona autumnoles,

Amazona jarnosa, Amazona amazonica,

Amazona mercenaria. El conjunto del ave es robusto y su tamaño algo mayor que el de una paloma doméstica, habitan las zonas cálidas prefiriendo las selvas. (24).

Técnicas para obtención de muestras en loros.

Para el manipuleo de los animales se usan guantes de asbesto con el fin de protegerse de el ataque con el pico y las patas. Con un movimiento rápido y preciso se toma el animal por la cabeza; con la mano izquierda se sujetan las patas, en esta forma el animal está listo para realizar el trabajo que se desee como son sangrías, inoculaciones, etc.

3.1.1. Punción de la vena alar.

Se utiliza esta vía para toma de sangre. Se emplea una aguja calibre 23 de 1½ pulgada longitud y una jeringa de 5 ml. Una cantidad de 1½ cms. es suficiente para obtener 0.4 ml. de suero.

3.1.2. Muestra de secreción traqueal.

Se toma con un hisopo, colocando la muestra en un tubo de 15 cc.X 13 mm.

que contiene 1 ml. de infusión de corazón, penicilina 10.000 U/cm³ y estreptomicina mg/cm³, si había necesidad de procesar las muestras posteriormente se llevaban al congelador a -20°C.

3.2. VIRUS

Las cepas de virus usadas en este estudio fueron la cepa 4160 suero-trópica velogénica y la cepa OR viscerotrópica velogénica de la enfermedad de Newcastle proporcionadas por la Sección de Virología.

TABLA 3. Inoculación de loros (Amazona achrocephala), con cepas 4160 y OR de la enfermedad de Newcastle.

ANIMALES				
Inoculados	Controles	Cepa	DL50	Vía
5	2	4160	10.000	Intramuscular
5	2	4160	10.000	Intranasal
5	2	4160	100.000	Intramuscular
5	2	4160	100.000	Intranasal
5	2	OR	100.000	Intramuscular
5	2	OR	100.000	Intranasal
5	2	OR	100.000	Oral

Después de la inoculación de los diferentes grupos se procedió a examinar diariamente los animales inoculados y los controles para observar síntomas y determinar el período de incubación del virus de la enfermedad de Newcastle.

Se tomó muestras de secreción traqueal y materia fecal durante 45 días para recuperar el virus.

Cinco días después de la inoculación se sacrificó un loro de cada grupo, para observar lesiones, recogiendo separadamente pulmón tráquea, cerebro, hígado y bazo e intestino para aislar el virus y determinar su concentración en las diferentes vísceras.

TABLA 4. Vacunación en loros (Amazona achrocephala), con cepa La Sota (Laverlam).

Animales vacunados	Vía	Animales controles
5	Ocular	2
5	Nasal	2

A los veintiún días de inoculados se tomó sangre para efectuar la prueba inhibición de la hemaglutinación y se hizo descarga con 100.000 DL50 cepa OR velogénica viscerotrópica.

También se tomó muestras de materia fecal y secreción traqueal tanto a los vacunados por vía intranasal como intraocular para recuperar el

virus.

3.3. METODOS DE LABORATORIO

3.3.1. Estudio de las cepas 4160 de Newcastle.

.1. Poder hemaglutinante para glóbulos de aves.

Se diluyó el virus desde 1:5 hasta 1:5120 en bandejas plásticas para aglutinación 0.2 ml. del virus en 0.8 ml de PBS, se hizo diluciones agregando 0.5 ml de glóbulos rojos de pollo al 0.5%. La prueba se debe leer cuando las células rojas en la celda central se han sedimentado formando un depósito central o botón bien demarcado, situado en el centro de la celdilla.

.2. Hemaglutinación de glóbulos rojos de equino, bovino, curí y conejo.

La técnica se hizo de la misma manera que la anterior.

.3. Estabilidad de la hemaglutinina.

Se colocó 1 ml de fluido alantóico de cepa 4160 de Newcastle sin diluir en ampollitas durante los tiempos 5', 10', 20', 30', 50', 60', 70', 80', y 90' y se determinó su poder hemaglutinante, se consideró como positivos un título de 1:10 o superior.

.4. Tiempo promedio de mortalidad para embriones de pollo.

Se hizo diluciones 10^{-1} hasta 10^{-10} y se inocularon 5 embriones de

pollo de 9-11 días de edad con 0.1 ml de las diluciones 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} por embrión.

Para determinar el tiempo promedio de mortalidad se dividió la suma de los tiempos de muerte de los embriones por el número de embriones inoculados.

.5. Determinación DL50.

Se inocularon cinco embriones de pollo de 9-11 días de edad con cada una de las diluciones siguientes: 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y se calcula el título siguiendo el método de Reed y Muench.

.6. Tratamiento con éter.

Se colocó 1 ml de virus (líquido alantoico), con 0.25 ml de éter químicamente puro, después se determinó el título hemaglutinante.

.7. Determinación de la capacidad para producir hemólisis de glóbulos rojos de diferentes especies animales.

.8. Determinación estabilidad a pH ácido.

Se agregó 1 ml de fluido alantoico a 9 ml de una solución salinabuferrada pH 2.5, luego se determinó el poder hemaglutinante.

3.3.2. Cepa OR.

Se hizo el mismo estudio que la cepa 4160.

3.4. DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE.

La enfermedad de Newcastle se diagnostica en el laboratorio por métodos serológicos y por aislamiento del virus. En el presente estudio se realizaron 2 pruebas serológicas: inhibición de la hemaglutinación (HI), y seroneutralización (SN) y para aislamiento del virus se utilizó la prueba de hemaglutinación (HA).

La prueba de hemaglutinación (HA) es la más ampliamente usada y se basa en la propiedad del virus de la enfermedad de Newcastle de aglutinar los glóbulos rojos de aves y de varias especies de mamíferos. Esta aglutinación puede ser inhibida específicamente por los anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle. (28).

3.4.1. Preparación de solución salina bufferada.

La solución madre se prepara de la siguiente manera:

NaCl	170 gramos
KH_2PO_4	13,6 gramos
NaOH	3 gramos.

Agua destilada a usar se prepara diluyendo la solución madre 1:20(en agua destilada). El pH deberá estar entre 7.1 a 7.2 (9).

3.4.2. Glóbulos rojos de pollo.

Se toma sangre de pollos adultos usando como anticoagulante heparina

(1 ml de anticoagulante para 9 ml de sangre). Agregar igual cantidad de solución salina fisiológica y separar los eritrocitos de los otros componentes sanguíneos centrifugado a 2000 r.p.m. durante 15 minutos. Lavar las células rojas suspendiéndolas en 50 volúmenes de solución salina fisiológica y luego centrifugarlas a 1000 r.p.m. durante 10 minutos.

Los glóbulos rojos así lavados se pueden diluir al 50% y se guardan en la nevera hasta por cinco días. Para usarlos, se prepara una suspensión al 0.5% en solución salina. (8).

3.4.3. Prueba de hemaglutinación.

Se llevó a cabo en bandejas plásticas, colocando 0.8 ml de solución buferada en la primera celdilla y 0.5 ml en los demás.

Con una pipeta de 1 ml. estéril, tomar 0.2 ml del virus y agregarlo a los 0.8 ml. de solución salina buferada que existe en la primera celdilla. En esta forma tendremos una dilución 1:5.

Usando la misma pipeta, mezclar suficientemente el virus y la solución salina, luego transferir 0.5 ml de la mezcla a la segunda celdilla. Mezclar nuevamente hasta la celdilla 11.

De esta manera tendremos diluciones desde 1:5 hasta 1:5120. El siguiente paso consiste en agregar a cada una de las celdillas 0.5 ml de glóbulos rojos de pollo al 0.5%.

La última celdilla queda como control de los glóbulos rojos y únicamente

contiene solución salina buferada más glóbulos rojos.

La prueba se debe leer cuando las células rojas en la celda control se han sedimentado formando un depósito control o botón bien demarcado, situado en el centro de la celdilla, más o menos a los 45' después a temperatura ambiente. Una prueba negativa es semejante al tubo control. El punto final, 1 unidad hemaglutinante, fue la dilución más alta de virus que mostró completa aglutinación. (9).

3.4.4. Prueba de inhibición de la hemaglutinación.

Se usó el procedimiento Beta,(9), en el cual la cantidad de virus es constante y la cantidad de suero es variable.

Se llevó a cabo en bandejas plásticas colocando en la primera celdilla 0.8 ml. de la dilución de virus que contiene 10 unidades hemaglutinantes; desde la segunda celdilla hasta la décima se agregan 0.5 ml de la misma dilución.

Agregar 0.2 ml del suero problema a la primera celdilla y a partir de esta hasta la novena inclusive, transferir después de mezclar bien con la pipeta 0.5 ml de la segunda celdilla, de esta 0.5 ml a la tercera y así sucesivamente hasta la novena.

De esta manera se han hecho diluciones desde 1:5 (primera celdilla), hasta 1:1280 (novena celdilla). Para efectuar la prueba se utilizan 3 controles (celdas No.10, 11, 12).

La celdilla No.10, es el control del virus y contiene 0.5 ml de las diluciones del virus que contiene 10 unidades hemaglutinantes.

La celdilla once es el control del suero y contiene 0.25 ml del suero y -0.25 ml de la solución salina buferada. La celdilla doce es el control de glóbulos rojos y contiene 0.5 ml de solución salina buferada. Después se agrega a todas las celdillas 0.5 ml de glóbulos rojos de pollo al 0.5%.

La prueba tiene una duración aproximada de 45' a temperatura ambiente y se lee cuando la celda doce (control de glóbulos rojos), ha formado el botón. (9).

El control del suero celda once también debe formar botón, el control de el virus no debe formar botón. El título del suero es la dilución más alta en la cual la hemaglutinación está completamente inhibida.

3.4.5. Prueba de seroneutralización.

Se realizó en embriones de pollo de 9-11 días de edad inoculados con el antígeno 0.1 cm^3 vía alantoides de una mezcla a partes iguales de virus en diluciones seriadas 10X y suero homólogo incubado durante 30 minutos a 37°C . Se determinó el índice de seroneutralización como la diferencia entre el título de una mezcla virus solución salina procesada igualmente y la mezcla virus-suero en estudio. (9).

3.5. TECNICA PARA AISLAMIENTO DE VIRUS.

3.5.1. Recolección de material.

Las muestras o tejidos seleccionados para estudio se tomaron lo más asépticamente posible mediante disección cuidadosa de los cadáveres. Para su almacenamiento se utilizaron bolsas plásticas, si había necesidad de procesarlas posteriormente se llevaban al congelador a -20°C .

Los tejidos se cortan en pedazos pequeños, se maceran en infusión de corazón estéril pH 7.2 como diluyente, en morteros. Los fragmentos gruesos se sedimentaron por centrifugación a 2.500 rpm. durante 10 minutos, luego se trató el sobrenadante con antibióticos, penicilina 10.000 u/cm^3 y estreptomicina 100 mg/cm^3 . (8-10).

.1. Muestras de materia fecal.

Se siguió la misma técnica anterior, se maceró en caldo de infusión de corazón, se centrifugó a 2.500 rpm. durante 10', luego se trató el sobrenadante con penicilina 10.000 u/cm^3 y estreptomicina 100 mg/cm^3 . (10).

.2. Muestras de hisopos traqueales.

Se tomó muestras de secreción traqueal en hisopos colocándose en tubos de 15 cc X 13 mm que contenían 1 ml de caldo de infusión de corazón con 10.000 u/cm^3 de penicilina y 100 mg/cm^3 de estreptomicina.

3.5.2. Inoculación de muestras en embriones de pollo de 9-11 días de edad.

.1. Cavity alantoidea.

Se examina al ovoscopio el huevo y se elige una zona de la membrana alantoidea distante del embrión y de la cavidad amniótica, libre de grandes vasos hemáticos y a unos 3 mm por debajo de la cámara de aire. Marcar con un lápiz el punto de inoculación en esta zona.

- Hacer una marca superior en el polo de el huevo sobre la cámara de aire.
- Practicar un pequeño orificio en la cáscara en cada una de las señales, pero no desgarrar la farfara o membrana interna de la cáscara.
- Desinfectar los orificios con tintura de yodo o cualquier otro desinfectante adecuado, dejándolo secar.
- Con una aguja estéril perforar la membrana de la cáscara en la zona correspondiente a la cámara de aire.
- Usando una jeringa de tuberculina de 1 cc. armada con una aguja de calibre 27 y $\frac{1}{2}$ pulgada de longitud (0.40 mm X 12-13 mm) insertarla a través del orificio lateral del huevo hasta una profundidad de $\frac{1}{4}$ de pulgada (6 mm) aproximadamente, e inocular, por lo general se inoculara 0.1 ml para titulaciones y 0.2 ml para aislamiento de virus.

- Cerrar los orificios de inoculaciones del huevo con parafina fundida u otro adhesivo apropiado. (8).

3.5.3. Recolección de muestras a partir de embriones de pollo.

.1. Líquido alantoideo.

Se desinfecta la cáscara que cubre la cámara de aire con tintura de yodo o cualquier desinfectante similar. Se rompe con auxilio de unas pinzas estériles eliminándola desde unos 5-10 mm. por encima de la cámara de aire.

Se inserta la aguja en la cavidad alantoidea y aspirar el líquido. La cantidad del recogido por huevo varía, pero en los de 11 días de incubación pueden obtenerse aproximadamente unos 5 cc. por unidad, Los embriones inoculados con virus de Newcastle murieron a las 48 horas, se comprobó presencia del virus en el líquido alantoico por medio de la prueba de la hemaglutinación. (8-17).

3.6. HISTOPATOLOGIA

Se siguió la técnica del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas (21); modificada por la Sección de Patología del LIMV.

Se colocan las vísceras en formol al 10% por 24 horas, cortar en trozos pequeños y fijar en formol al 10% luego se pasan los tejidos al Tecnicon, colocando los tejidos en dos formoles al 10% durante 4½ horas luego pasar a 4 alcoholes, el primer alcohol de 65% durante una hora, se-

gundo alcohol de 75% por una hora, tercer alcohol de 85% por una hora, y el cuarto alcohol de 95% por una hora.

Pasar a dos acetonas cada una durante una hora; luego pasar 2 bensoles cada uno por una hora; el paso siguiente a dos parafinas a 53°C; la primera durante una hora y la segunda $\frac{1}{2}$ hora.

Luego se coloca los tejidos en canastillas plásticas en un infiltrador de parafina a 56°C., sometiéndolos al vacío por 5 minutos. Después se incluye en cajitas de papel hasta solidificación, hacer bloques, pegándolos en portabloques, por último hacemos los cortes.

La coloración es como sigue: se somete el tejido a 3 xiloles por 20 minutos, pasar luego a tres alcoholes descendentes absoluto, 80 y 70 cada uno por dos minutos, luego agua corriente dos minutos, pasamos a Hematoxilina de Harris durante 3 - 5 minutos, lavar con agua corriente, luego alcohol ácido para diferenciar, en seguida se pasa el tejido a agua amoniacal hasta que tome un color azul intenso, pasar a Eosina por dos minutos, lavar, luego se pasa el tejido por tres alcoholes ascendentes 80°, 90° y absoluto cada uno por dos minutos; por último a 3 xiloles por 1 minuto cada uno.

4. RESULTADOS

Características de las cepas 4160 y OR de la enfermedad de Newcastle.

Las características de las cepas utilizadas en presente trabajo se pueden ver en la Tabla 5.

4.1. INOCULACIONES.

Los experimentos de inoculaciones en loros con cepas 4160 y OR de la enfermedad de Newcastle, se hicieron paralelamente en pollos con el fin de probar su potencia.

Los pollos que fueron inoculados con 100.000 DL 50 cepa 4160 de la enfermedad de Newcastle, por vía intramuscular murieron en un tiempo comprendido de 3-5 días presentando síntomas nerviosos y respiratorios típicos de la enfermedad. A la necropsia presentaron úlceras en intestinos, tráquea, pulmón y cerebro hemorrágico. Fig. 8.

Los pollos inoculados con 100.000 DL50 cepa OR de la enfermedad de Newcastle por vía intramuscular murieron en un tiempo comprendido de 4-6 días con síntomas respiratorios y nerviosos. A la necropsia también se observó úlceras en intestino, pulmón, tráquea y proventrículo hemorrágico.

Los loros inoculados con 100.000 DL 50 cepa 4160 de la enfermedad de Newcastle vía intramuscular presentaron síntomas nerviosos y respiratorios

más leves que en los pollos a los 5 días de inoculados. A la necropsia se observó pulmón, traquea e intestino hemorrágicos. Figuras 9-10.

Al exámen histopatológico se observó hemorragia y edema en la mucosa traqueal, pulmón con hemorragias y cerebro con infiltración perivascular. Figuras 13,14.

Los loros inoculados con 100.000 DL 50 cepa OR de la enfermedad de Newcastle vías intranasal y oral presentaron síntomas respiratorios a los 6 días de inoculados, más leves que con la inoculación de la cepa 4160.

4.2. AISLAMIENTO DE VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE DE HECES Y SECRECIÓN TRAQUEAL DE LOROS (Amazona achrocephala).

Los loros inoculados con 100.000 DL50 cepa 4160 de la enfermedad de Newcastle vía intramuscular, se aisló el virus de la secreción traqueal hasta el día 9 y de la materia fecal hasta el día 11 después de inoculados. Tabla 16.

Con la inoculación intranasal de 100.000 DL50 Cepa 4160 de la enfermedad de Newcastle, se aisló el virus de la secreción traqueal hasta el día 11 y de la materia fecal hasta el día 14. Tabla 16. Con un inóculo de 10.000 DL50 de la misma cepa vía intramuscular, se aisló el virus de la secreción traqueal hasta el día 8 y de la materia fecal hasta el día 7. Los loros inoculados con 100.000 DL50 cepa OR de la enfermedad de Newcastle se aisló el virus de la secreción traqueal hasta el día 15 y de la materia fecal hasta el día 9 después de inoculados. Tabla 17.

Con la misma cepa y dosis por vía intranasal, se aisló el virus de la secreción traqueal hasta el día 10 y de la materia fecal hasta el día 8, después de la inoculación. Tabla 17, y por vía oral el virus fue aislado de la secreción traqueal hasta el día 9, y de la materia fecal hasta el día 10 después de inoculados con cepa OR. Tabla 17.

En los loros vacunados contra la enfermedad de Newcastle Cepa La Sota también se aisló el virus de la secreción traqueal y materia fecal, cuando se vacunó por vía intranasal se aisló el virus de la secreción traqueal hasta el día 11 y de la materia fecal hasta el día 4. Tabla 18. En la vacunación por vía ocular de la materia fecal no se aisló el virus pero sí de la secreción traqueal hasta el día 6. Tabla 18.

Los loros vacunados con cepa La Sota de la enfermedad de Newcastle y descargados 21 días después con 100.000 DL50 cepa OR vía intramuscular, se aisló el virus de la secreción traqueal hasta el día 5 y de la materia fecal hasta el día 4 después de la descarga.

La inhibición de la hemaglutinación de sueros de pollos controles que fueron puestos en contacto con loros inoculados 15 días antes con 100.000 DL50 cepa OR de la enfermedad de Newcastle, fueron negativos a la prueba HI 15, 30, 45 días después de entrar en contacto.

4.3. RESPUESTA INMUNITARIA

Se detectaron anticuerpos en los loros inoculados con cepa 4160 y OR

de la enfermedad de Newcastle a partir del 10o. día de inoculados hasta 60 días fecha en la cual se suspendió el muestreo observándose disminución progresiva de los títulos. Tablas 8 a 13.

En los loros vacunados con cepa La Sota de la enfermedad de Newcastle vías nasal y ocular también presentaron respuesta inmunitaria; observándose disminución progresiva de los títulos HI a los 60 días después de la vacunación. Tablas 14-15.

Los loros vacunados con cepa La Sota de la enfermedad de Newcastle y descargados 21 días después con 100.000 DL50 cepa OR presentaron aumento de títulos para HI.

5. DISCUSION

Los loros son más resistentes a la enfermedad de Newcastle que los pollos, ya que con inóculos de 100.000 DL50 cepas 4160 y OR no murieron, presentando solo ligeros síntomas respiratorios y nerviosos, en cambio los pollos con los mismos inóculos murieron en un período de 3-5 días con síntomas y lesiones típicas de la enfermedad.

No obstante en los loros se aisló el virus de la secreción traqueal y materia fecal por un lapso de 15 días después de la inoculación con virus patógeno de Newcastle.

La concentración de virus en vísceras de loro (Amazona achrocephala), empleándose la técnica mediante inoculación de macerados de cerebro, traquea y pulmón, hígado, intestino en embriones de pollo de 9-11 días de edad, determinación del título hemaglutinante del líquido alantoideo por la prueba HA, y DL50 fueron variables; encontrándose mayor título en cerebro $10^{8.2}$, cuando la inoculación previa fue con cepa 4160 vía intramuscular y $10^{7.8}$ vía intranasal.

Matzer (22), reportó un título DL50 $10^{9.6}$ de vísceras de loros empleando la misma técnica reportada.

En cuanto a la recuperación del virus de la secreción traqueal y materia fecal de loros, se aisló en períodos diferentes dependiendo de la cepa como la ruta de inoculación.

La inoculación intranasal con la cepa 4160 se aisló el virus durante más tiempo que la inoculación intramuscular. En el primer caso se aisló el virus de la secreción traqueal hasta el día 11 y de la materia fecal hasta el día 14. Tabla 16.

Se observaron diferencias en el comportamiento de las cepas 4160 y OR empleadas en la persistencia del virus en la secreción traqueal y materia fecal. En la inoculación con cepa OR de Newcastle en loros vías intramuscular e intranasal se detectó el virus durante mayor tiempo de la secreción traqueal y materia fecal que con las inoculaciones con la cepa 4160 por las mismas vías. En el primer caso se aisló el virus de la secreción traqueal hasta el día 15 y de la materia fecal hasta el día 9. Tabla 17.

Utilizando la misma cepa OR, la vía intranasal se detectó el virus durante menos tiempo que con la inoculación intramuscular. En el primer caso se aisló el virus de la secreción traqueal hasta el día 10 y de la materia fecal hasta el día 8. Tabla 17.

La misma cepa OR por vía oral, la detección del virus de la materia fecal y secreción traqueal fue durante menos tiempo que con las inoculaciones intramuscular e intranasal. Se aisló el virus de la secreción traqueal hasta el día 9 y de la materia fecal hasta el día 10. Tabla 17.

También se aisló el virus con un inóculo de 10.000 DL 50 cepa 4160 en loros vía intramuscular, pero durante menos tiempo que con las inocula-

ciones de 100.000 DL50 cepas 4160 y OR vías intramuscular e intranasal. En el primer caso se aisló el virus de la secreción traqueal hasta el día 8 y de la materia fecal hasta el día 7.

Jungherr, 1948 y Walker 1954, citados por Lancaster (19) reportaron la eliminación de virus por los heces en pollos sin vacunar inyectadas experimentalmente con virus de campo de la enfermedad de Newcastle hasta 11 y 34 días, y la eliminación del virus por el sistema respiratorio 6, 21 días después de inyectadas con el virus de Newcastle.

En vacunación de loros con cepa La Sota de la enfermedad de Newcastle por vía intranasal se aisló el virus durante más tiempo que con la vacunación ocular. En el primer caso se aisló el virus de la secreción traqueal hasta el día 11 y de la materia fecal hasta el día 4.

Tabla 18.

En pollos previamente vacunados contra la enfermedad de Newcastle la excreción de virus virulento de campo ha sido encontrado en una variedad de periodos 7 días (Kraweveld, 1950), 9 días (Asplin, 1951), 2 semanas (Adler, 1951) citados por Lancaster (19).

Los pollos controles puestos en contacto con loros inoculados 15 días antes con 100.000 DL50 cepa OR de la enfermedad de Newcastle resultaron negativos a la prueba HI, 15, 30, 45 días después de entrar en contacto.

En relación con la respuesta inmunitaria del virus, se detectaron

anticuerpos en loros a partir del 10 días después de las inoculaciones con cepas 4160 y OR de la enfermedad de Newcastle. Según Hanson (1956), citado por Lancaster (19), en pollos se detectan anticuerpos 5-10 días después de la infección o 2 días después de los primeros síntomas respiratorios. Por observaciones parece indicar que la respuesta inmunitaria no es muy sólida y que de ésta manera podría contribuir a enmascarar la infección con virus natural virulenta.

Teniendo en cuenta la importancia de estas observaciones, sería muy conveniente estudiar muy a fondo la respuesta de los loros a cepas provenientes de gallinas y principalmente adelantar los experimentos con cepas aisladas de loros.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El loro es susceptible a infectarse con virus de la enfermedad de Newcastle, ya que fue posible reproducir la enfermedad y aislarse el virus por 15 días después de inoculaciones con cepas 4160 y OR de Newcastle. Sin embargo, la sintomatología es menos severa que la observada en aves inoculadas con la misma dosis lo que implica un grave peligro para la diseminación de la enfermedad en caso de infecciones de esta especie con virus natural procedente de gallinas.

Las inoculaciones de 100.000 DL 50 cepa 4160 de la enfermedad de Newcastle, por vías intramuscular e intranasal produjeron síntomas nerviosos y respiratorios 4-6 días después de inoculados.

Las inoculaciones de 100.000 DL50 cepa OR de la enfermedad de Newcastle, por vías intramuscular, intranasal y digestiva produjeron síntomas respiratorios más leves que la cepa 4160, 5-7 días después de inoculados.

Las inoculaciones de 10.000, 100.000 DL50 de la cepa 4160 como cepa OR de la enfermedad de Newcastle, no ocasionó la muerte en los loros (Amazona achrocephala). Las mismas dosis mataron pollos en un período de 3-5 días, lo que se concluye que los loros son mucho más resistentes a la enfermedad de Newcastle.

A la necropsia de los animales inoculados presentaron: pulmón, tráquea, cerebro, e intestino hemorrágicos.

El exámen histopatológico se observó hemorragia y edema en la mucosa traqueal y hemorragia pulmonar; en cerebro e hígado infiltración perivascular.

Las inoculaciones realizadas en embriones de pollo de 9-11 días de edad con muestras de materia fecal y secreción traqueal de loros (Amazona achrocephala), entre 1 y 45 días después de sus inoculaciones con cepas 4160 y OR de la enfermedad de Newcastle permitió demostrar que el virus es excretado en las heces y por el tracto respiratorio hasta 15 días después de inoculados. Las inoculaciones realizadas en embriones de pollo de 9-11 días de edad con muestras de materia fecal y secreción traqueal de loros (Amazona achrocephala), entre 1 y 25 días después de vacunados con cepa La Sota de la enfermedad de Newcastle vías intranasal permitió demostrar que el virus es excretado en las heces y por el tracto respiratorio hasta por 11 días.

Con la vacunación ocular no se aisló el virus de la materia fecal, pero si se aisló de la secreción traqueal hasta por 6 días.

De acuerdo a las observaciones, la inmunidad inducida por vacunas tradicionales no es muy sólida y solo disminuye aún más la sintomatología que se puede presentar cuando el loro se infecta con virus procedente de gallinas. Esta condición también es peligrosa para la diseminación de la enfermedad a partir de animales aparentemente sanos.

7. RESUMEN

Se hizo un estudio sobre la patogenesis de la enfermedad de Newcastle en la familia PSITTACIDAE, especialmente sobre el papel que pueda desempeñar en la diseminación y perpetuación del virus.

Se inocularon 70 loros (Amazona achrocephala), negativo a la prueba inhibición de la hemaglutinación, utilizando diferentes vías y dosis de virus patógeno de la enfermedad de Newcastle encontrando que la vía más efectiva fue la intramuscular inoculando 100.000 D.L.E.P. 50, dosis letal embriones pollo 50, presentando síntomas y lesiones características de la enfermedad.

El virus se recobró de los animales hasta 15 días post inoculación; los anticuerpos se detectaron a partir del 10o. día después de inoculados hasta 60 días, fecha en la cual se suspendió el muestreo encontrando disminución progresiva de los títulos de HI.

8. SUMMARY

An study on the pathogenesis of the New-castle disease in the family Psittacidae was carried, with special reference to the importance that members of this family could have in the spread and perpetuation of the disease.

Seventy sparrots (Amazona achrocephala), showing a negative H.I. test, were used in the experiment. Different doses and routes of inoculation were tested. I have found the intramuscular route is the most effective one and that 100.000 DLE P50 chicken embryo lethal dose 50 the most effective dose to induce the characteristic symptoms and lesions of the disease.

The virus was recovered even 15 days after inoculation. Antibodies were detected from the 10th. day after inoculation to the 60th day after inoculation, when the experiment was stoped; during this period I found a progressive decrease in H.I. titer.

TABLA 5. Características de las Cepas 4160 y OR de la enfermedad de Newcastle.

	CEPA 4160	CEPA OR
Poder hemaglutinante para glóbulos rojos de Aves.	1:640	1:640
Determinación DL 50	$10^{7.6}$ Xml	$10^{8.6}$ Xml
Tiempo promedio de mortalidad	42 horas	48 horas
Estabilidad de la hemaglutinina 56°C.	60' - 70'	30'

TABLA 6. Aislamiento de virus en base a la prueba HA de líquido alantoi-
deo de embriones de pollo de 9-11 días de edad inoculados con
suspensión de visceras de loros (Amazona achrocephala) inocula-
dos previamente con 100.000 DL50 cepa 4160 de la enfermedad
de Newcastle. Vías Intramuscular e Intranasal.

Tejidos	T I T U L O DL 50	
	IM	IN
Tráquea y pulmón	10 ^{7.6}	10 ^{7.8}
Hígado y bazo	10 ^{6.8}	10 ^{6.2}
Cerebro	10 ^{8.2}	10 ^{7.8}
Intestino	10 ^{5.8}	10 ^{6.8}

Los loros fueron sacrificados 5 días después de inoculados con
cepa 4160 de la enfermedad de Newcastle.

TABLA 7. Aislamiento de virus en base a la prueba HA de líquido alantoi-
deo de embriones de pollo de 9-11 días de edad inoculados pre-
viamente con 100.000 DL50 cepa OR de la enfermedad de Newcastle.
Vías intramuscular e intranasal.

Tejidos	T I T U L O DL50	
	IM	IN
Tráquea y pulmón	$10^{9.2}$	$10^{8.8}$
Cerebro	$10^{7.6}$	$10^{7.4}$
Hígado y bazo	$10^{6.8}$	$10^{6.4}$
Intestino	$10^{7.4}$	$10^{5.2}$

Los loros fueron sacrificados 5 días después de inoculados con
cepa OR de la enfermedad de Newcastle.

TABLA 8. Inhibición de la hemaglutinación en sueros de loros (Amazona achrocephala) 10⁷, 30, 45, 60 días después de inoculados con 10.000 DL50 Cepa 4160 de la enfermedad de Newcastle. Vía intramuscular.

SUERO	DIAS			
	10	30	45	60
1	80	80	20	20
2	320	160	80	80
3	640	320	160	80
4	1280	160	160	40
Control A	-	10	10	5
Control B	-	20	20	10

Controles en contacto directo sin inocular.

TABLA 9. HI en sueros de loros (Amazona achrocephala), 10,30,45,60 días después de inoculados con 100.000 DL50 Cepa 4160 de la enfermedad de Newcastle. Vía intramuscular.

SUERO	DIAS			
	10	30	45	60
1	640	640	160	160
2	320	320	80	40
3	1280	320	320	80
4	1280	1280	80	80
Control A	-	40	20	10
Control B	-	80	40	20

TABLA 10. HI en sueros de loros (Amazona achrocephala) 10,30,45,60 días después de inoculados con 100.000 DL50 Cepa 4160 de la enfermedad de Newcastle. Vía intranasal.

SUERO	DIAS			
	10	30	45	60
1	5120	640	80	80
2	5120	1560	2560	640
3	2560	1280	320	160
4	1280	640	640	160
5	1280	1280	320	160
Control A	-	160	20	10
Control B	-	40	10	10

TABLA 11. HI en sueros de loros (Amazona achrocephala) 10,30,45,60 días después de inoculados con 100.000 DL50 Cepa OR de la enfermedad de Newcastle. Vía intramuscular.

SUERO	DIAS			
	10	30	45	60
1	10.240	2.560	60	320
2	5.120	2.560	1280	320
3	1.280	640	320	160
4	10.240	5.120	2560	1.280
Control A	160	160	160	80
Control B	-	80	80	40

TABLA 12. Inhibición de la hemaglutinación en sueros de loros (Amazona achrocephala) 10,30,45,60 después de inoculados con 100.000 DL50 Cepa OR de la enfermedad de Newcastle. Vía intranasal.

SUERO	DIAS			
	10	30	45	60
1	5.120	1.280	640	640
2	5.120	2.560	1.280	640
3	1.280	2.560	1.280	1.280
4	5.120	320	320	320
Control A	40	40	40	20

TABLA 13. HI en sueros de loros (Amazona achrocephala), 10,30,45,60 días después de inoculados con 100.000 DL50 Cepa OR de la enfermedad de Newcastle. Vía oral.

SUERO	DIAS			
	10	30	45	60
1	1.280	640	160	80
2	320	80	40	20
3	80	80	80	80
Control	-	20	10	10

TABLA 14. HI en sueros de loros (Amazona achrocephala), 15,30,45,60 días después de vacunados con La Cepa La Sota de la enfermedad de Newcastle. Vía nasal.

SUERO	DIAS			
	15	30	45	60
1	160	80	40	20
2	320	160	40	40
3	640	160	80	80
4	40	80	40	20
Control	-	20	10	5

TABLA 15. HI en sueros de loros (Amazona achrocephala), 15,30,45,60 días después de vacunados con Cepa La Sota de la enfermedad de Newcastle. Vía ocular.

TITULO				
SUERO	DIAS			
	15	30	45	60
1	160	40	20	20
2	320	80	20	20
3	320	160	80	40
4	160	80	40	40
Control	20	20	10	10

Control en contacto directo sin vacunar

TABLA 16. Aislamiento de virus en base a la prueba HA de líquido alantóico de embriones de pollos de 9-11 días de edad inoculados con muestras de secreción traqueal y heces de loros (Amazona achrocephala) inoculados previamente con 100.000 DL50 cepa 4160 de ENC. Vías intramuscular, intranasal.

DIAS	VIAS DE INOCULACION			
	Intramuscular		Intranasal	
	S Traqueal	Heces	S Traqueal	Heces
1	-	-	+	-
2	-	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+
10	-	+	+	+
11	-	+	+	+
12	-	-	-	+
13	-	-	-	+
14	-	-	-	+
15	-	-	-	-

Las muestras de secreción traqueal y heces que se tomaron durante 45 días, se aisló virus de Newcastle hasta el día 14 como se observa en la tabla anterior.

TABLA 17. Aislamiento de virus en base a la prueba HA de líquido alantóico de embriones de pollo de 9-11 días de edad inoculados con muestras de secreción traqueal y heces de loros (Amazona achrocephala) inoculados previamente con 100.000 DL50 cepa OR de la enfermedad de Newcastle. Vías intramuscular, intranasal y oral.

DIAS	VIAS DE INOCULACION					
	Intramuscular		Intranasal		Oral	
	S Traqueal	Heces	S Traqueal	Heces	S Traqueal	Heces
1	+	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	+	-
3	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	-	+	+
10	+	-	+	-	-	+
11	+	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	-

Las muestras de secreción traqueal y heces que se tomaron durante 45 días, se aisló virus de Newcastle hasta el día 15 como se observa en la tabla anterior.

TABLA 18. Aislamiento de virus en base a la prueba HA de líquido alantoi-
deo de embriones de pollo de 9-11 días de edad inoculados con
muestras de secreción traqueal y heces de loros (Amazona achro-
cephala) vacunados previamente contra la enfermedad de Newcas-
tle con cepa La Sota. Vías ocular y nasal,

DIAS	VIAS DE INOCULACION			
	Intrañasal		Ocular	
	S Traqueal	Heces	S Traqueal	Heces
1	+	-	-	-
2	+	+	+	-
3	+	+	+	-
4	+	+	+	-
5	+	-	+	-
6	+	-	+	-
7	+	-	-	-
8	+	-	-	-
9	+	-	-	-
10	+	-	-	-
11	+	-	-	-
12	-	-	-	-

Se aisló virus hasta el día 11 de las muestras tomadas durante 25
días por vacunación con cepa La Sota de la ENC.

FIGURA 8. Ciegos de pollo inoculado con virus de Newcastle mostrando ulceraciones a nivel de las amígdalas cecales.

FIGURA 9. Intestino de loro (Amazona achrocephala), con ulceraciones y hemorragias, inoculando previamente con virus de Newcastle.

TABLA 10. Tráquea hemorrágica de loro (Amazona schrocephala), inoculando previamente con virus de Newcastle.

FIGURA 11. Pulmón de loro (Amazona achrocephala), con hemorragias microscópica. Inoculando con virus de Newcastle.

FIGURA 12. Cerebro de loro (Amazona achrocephala), con hemorragias y congestión. Inoculando con virus de Newcastle.

FIGURA 13. Infiltración monocitaria perivascular en cerebro de loro (Amazona achrocephala), inoculando con virus de Newcastle.

FIGURA 14. Edema y hemorragia en la mucosa traqueal de loro (Amazona achrocephala), inoculando con virus de Newcastle.

BIBLIOGRAFIA

- 1 ACKERMANN, W.W. 1964. Properties of New-Castle disease virus. In Hanson, R.P. New-Castle disease virus. Madison, University of Wisconsin. pp 153-160.
- 2 ALFONSO, R. 1967. Importancia del Coragyps atratus en la transmisión de la enfermedad de New-Castle. Tesis M.V. Bogotá, Universidad Nacional, Facultad de Veterinaria. pp 18-19
- 3 ASPLIN, F.D. 1947. New-Castle disease in ducks and geese. Vet. Rec. (Inglaterra) 59: 621-624.
- 4 BANG, F.B. 1964. Pathogenesis in the embryo. In Hanson, R.P. New-Castle disease virus. Madison, University of Wisconsin pp140-145.
- 5 BIESTER, H.E. and L.H. SCHWARTE. 1964. Propagation New-Castle disease. In Brandly, C.A. Disease of poultry. 4ed. México, UTEHA pp 487-488.
- 6 BORLAND, E.D. 1972. New-Castle disease in pheasants, partridges and wild birds in East Anglia. 1970-1971. Vet. Rec. (Inglaterra) 90: 431-482.
- 7 CAMARGO, N.F. 1960. Tipificación de cepas de la enfermedad de New-Castle. In symposium de la enfermedad de New-Castle. México, Secretaría de Agricultura y Ganadería. pp 59-60 (Folleto misceláneo, 11).
- 8 CUNNINGHAM, C.H. 1959. Vías de inoculación y recogida de muestras de los embriones de pollo. In _____ Virología práctica. Trad. de la 3ed. inglesa por M. Cordero del Campillo. Zaragoza, Acribia. pp 41-49.
- 9 _____ 1966. Laboratory in virology. 6ed. Minesota, Burgess. pp 16-28.
- 10 DUTTA, S.K. and B.S. POMERY. 1967. Isolation and characterization of an enterovirus from baby chicks having an enteric infection Avian Disease. (EE.UU). 11 (1): 1-8
- 11 ESTUDILLO, S. 1972. New-Castle disease outbreak in captive exotic birds. In poultry health symposium, 6 Davis, 1972. University of California. pp 70-73.

- 12 ESTUPIÑAN, A. J. 1966. Studies of physical and chemical stability of New-Castle virus. Thesis M.S. Madison, University of Wisconsin. pp 20-21.
- 13 FABRICANT, J. 1957. A modified chicken embryo inoculation technique for the isolation of viruses from the respiratory tract of chickens. Avian disease (EE.UU.) 1: 62-66.
- 14 FRANCIS, W.D. 1972. New-Castle and psittacines 1970-1971. Poul. Digest (EE.UU.) 31: 184-186.
- 15 GRASS, E.E. 1972. Exotic New-Castle disease in the United States. In poultry health symposium, 6 Davis 1972. University of California. pp 26-30.
- 16 HANSON, R.P. and R.T. SINHA. 1952. Epizootic of New-Castle in pigeons and studies on transmission of the virus. Poul. Sic. (EE.UU.) 31 (33): 404-408.
- 17 JUNGHERR, E.L. 1964. Pathogenicity of New-Castle disease virus for the chicken. In Hanson, R.P. New-Castle disease virus. Madison, University of Wisconsin. pp 135-138.
- 18 KEIMER, I.F. 1961. New-Castle disease in the jackdaw (Corvus monedula). Vet. Rec. (Inglaterra) 73: 119-122.
- 19 LANCASTER, J.E. 1966. New-Castle disease, a review 1926-1964. Canadá, Department of Agriculture. pp 25-67. (Monograph, 3).
- 20 LUNA, L.G. 1968. Preparation of tissue. In _____ Manual de Histologic staining methods. 3ed. New York McGraw-Hill pp 1-20.
- 21 LUQUE, G. 1964. Conferencias de patología aviar. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. pp 53-54 (mimeografiado).
- 22 MATZER, N.O. y E. MOTA. 1971. Descripción de un brote de la enfermedad de Newcastle en loros (Amazona achrocephala) en cautiverio. Rev. Fac. Med. Vet. y Zotec. (Guatemala) 3 (1): 23-28.
- 23 OLIVARES, C.A. 1969. Guacamayas, loros, loritos, periquitos. Rev. Familia (Colombia) 33: 25-29.
- 24 _____ 1969. Aves de Cundinamarca (Folleto de ciencias naturales), Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. Facul. de Ciencias. pp 132-137.
- 25 PICKEN, J.C. 1964. Ternostability of New-Castle virus. In Hanson, R.P. New-Castle disease virus. Madison, University of Wisconsin. pp 167-172.

- 26 SPALATIN, J. and R.P. HANSON. 1972. Comparison of B. and ulster strains of New-Castle disease virus as vaccines against the viscerotropic form of disease. In the Poultry health symposium, 6 Davis, 1972. University of California. pp 66-69.
- 27 TROPILO, J. 1964. New-Castle disease in partredges and pheasants. Vet. Med. (EE.UU.) 20: 164-167.
- 28 VILLEGAS, P.N. y C.H. CAYCEDO. 1972. Diagnóstico de la enfermedad de New-Castle. In _____. Enfermedad de New-Castle. hh. 4-16 (mimeografiado).