

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE VETERINARIA

DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CIRCULANTES
CONTRA LA ENFERMEDAD DE PACHECO, A TRAVES DE SERO-
NEUTRALIZACION VIRAL EN EMBRION DE POLLO, EN GUACAMAYA
ROJA (*Ara macao*) DEL ZOOLOGICO "LA JUNGLA", EN LA CIUDAD DE
GUATEMALA.



Como requisito previo a optar al titulo profesional de

MEDICO VETERINARIO

Guatemala, Marzo del 2000.

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO:	Lic. RODOLFO CHANG SHUM
SECRETARIO:	Dr. MIGUEL ANGEL AZAÑON R.
VOCAL PRIMERO:	Lic. ROMULO GRAMAJO LIMA
VOCAL SEGUNDO:	Dr. FREDY GONZALEZ
VOCAL TERCERO:	Lic. EDUARDO SPIEGELER
VOCAL CUARTO:	Br. JEAN PAUL RIVERA
VOCAL QUINTO:	Br. FREDDY CALVILLO

ASESORES:	Dra. LUCERO SERRANO
	Dr. EDY MEOÑO
	Dr. HECTOR FUENTES

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

CUMPLIENDO CON LOS PRECEPTOS QUE ESTABLECE LA LEY
DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA,
PRESENTO A SU CONSIDERACIÓN EL TRABAJO DE TESIS TITULADO:

DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CIRCULANTES
CONTRA LA ENFERMEDAD DE PACHECO, A TRAVES DE SERO-
NEUTRALIZACION VIRAL EN EMBRION DE POLLO, EN GUACAMAYA
ROJA (*Ara macao*) DEL ZOOLOGICO "LA JUNGLA", EN LA CIUDAD DE
GUATEMALA.

EL CUAL ME FUERA APROBADO POR LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, PREVIO A OPTAR EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO

ACTO QUE DEDICO

A DIOS TODO PODEROSO:

Por darme la bendición de un hogar ejemplar y una educación superior.

A MIS PADRES

Alfredo y Chiqui, por guiarme por la senda del bien y apoyarme incondicionalmente.

A MI HERMANO

Carlos Armando, como una muestra de que todo esfuerzo tiene un resultado. Para que siga adelante sin desmayar.

A MI FAMILIA

A todos en general, en especial a mis tíos que nos apoyaron en los momentos difíciles.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS

Por su amistad y apoyo en todo momento.

TESIS QUE DEDICO

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS: Por la oportunidad que brinda a la juventud con deseo de superación.

AL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS: Por brindarme su apoyo incondicionalmente.

A MIS ASESORES: Por su apoyo y amistad brindada durante toda mi carrera.

A MIS CATEDRÁTICOS: Por su tiempo, dedicación y paciencia.

A MIS PADRINOS DE GRADUACION: Porque de una manera u otra son parte importante el desarrollo integral de mi persona, y por brindarme su amistad.

INDICE

	PAGINA
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	2
HIPOTESIS	3
REVISION BIBLIOGRAFICA	4
A. Enfermedad de pacheco (PDV)	4
1. Etiología	4
2. Especies susceptibles	4
3. Transmisión	5
4. Comportamiento clínico y patológico	6
5. Diagnóstico	7
6. Diagnóstico diferencial	9
7. Tratamiento	9
8. Control	10
B. Guacamaya roja (<i>Ara macao</i>)	13
1. Clasificación	13
2. Descripción	13
3. Distribución	13
4. Generalidades	14
5. Crianza	15
V. MATERIALES Y METODOS	16
A. Materiales	16
1. Recursos humanos	16
2. Materiales de Laboratorio	16
3. Materiales de campo	16
4. Recursos de tipo biológico	17
B. Metodos	17
1. Area de estudio	17
2. Centros de referencia	17
3. Metodología	18
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	22
VII. CONCLUSIONES	26
VIII. RECOMENDACIONES	27
IX. RESUMEN	29
X. ANEXOS	30
XI. BIBLIOGRAFIA	38

I. INTRODUCCION

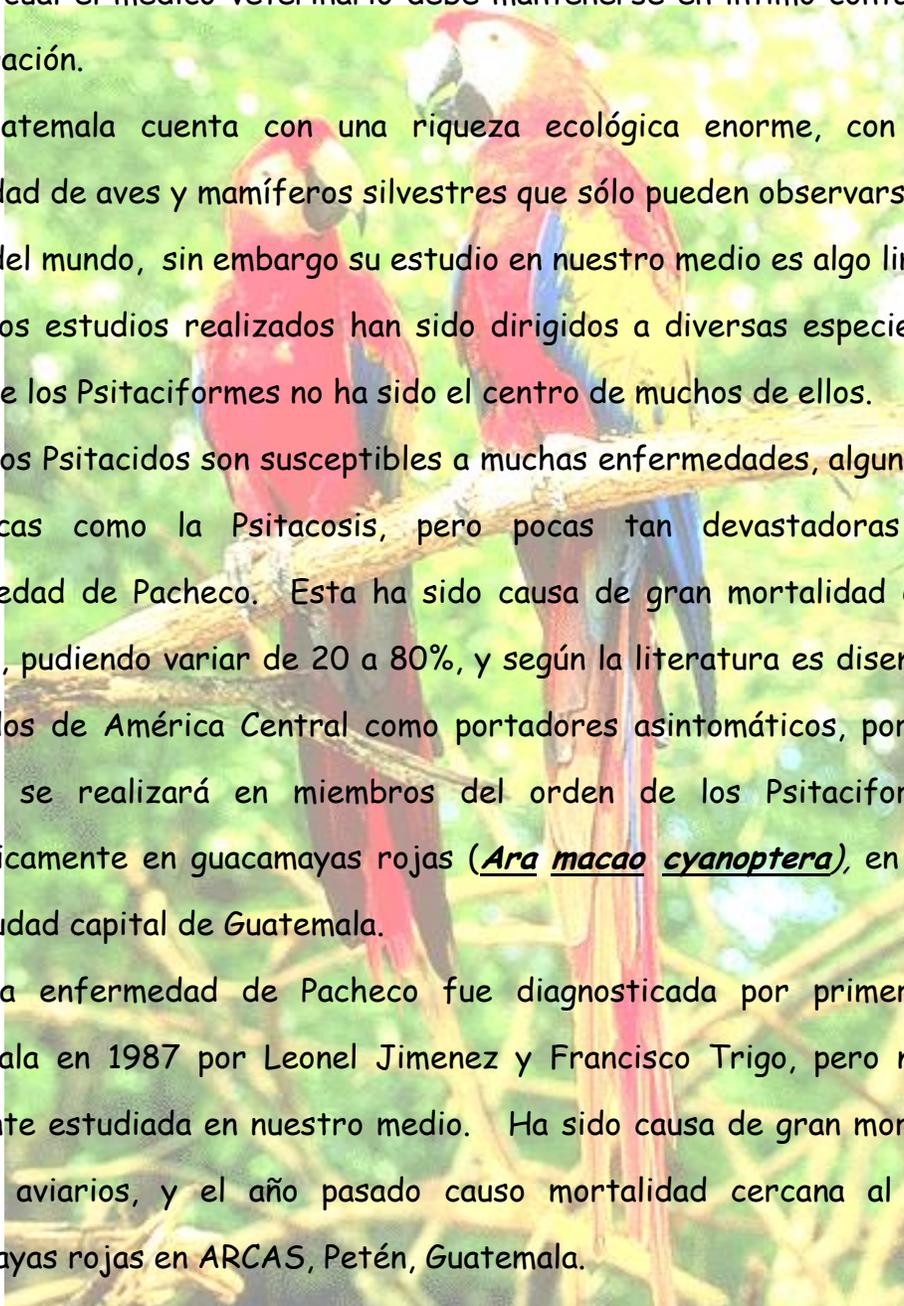
En los últimos tiempos el estudio de la vida silvestre ha venido tomando un auge importante en el desarrollo de la medicina veterinaria en nuestro país, para lo cual el médico veterinario debe mantenerse en íntimo contacto con la investigación.

Guatemala cuenta con una riqueza ecológica enorme, con una gran diversidad de aves y mamíferos silvestres que sólo pueden observarse en pocos países del mundo, sin embargo su estudio en nuestro medio es algo limitado.

Los estudios realizados han sido dirigidos a diversas especies, pero el orden de los Psitaciformes no ha sido el centro de muchos de ellos.

Los Psitacidos son susceptibles a muchas enfermedades, algunas de ellas zoonóticas como la Psitacosis, pero pocas tan devastadoras como la enfermedad de Pacheco. Esta ha sido causa de gran mortalidad en algunos aviarios, pudiendo variar de 20 a 80%, y según la literatura es diseminada por psitacidos de América Central como portadores asintomáticos, por lo que el estudio se realizará en miembros del orden de los Psitaciformes, más específicamente en guacamayas rojas (*Ara macao cyanoptera*), en cautiverio en la ciudad capital de Guatemala.

La enfermedad de Pacheco fue diagnosticada por primera vez en Guatemala en 1987 por Leonel Jimenez y Francisco Trigo, pero no ha sido realmente estudiada en nuestro medio. Ha sido causa de gran mortalidad en algunos aviarios, y el año pasado causo mortalidad cercana al 90 % en guacamayas rojas en ARCAS, Petén, Guatemala.



II. OBJETIVOS

GENERAL:

Generar información referente a la enfermedad de Pacheco en psitácidos en Guatemala.

ESPECIFICOS:

1. Determinar la presencia de anticuerpos circulantes contra la enfermedad de Pacheco en psitacidos en cautiverio en la ciudad de Guatemala.
2. Establecer la prueba de seroneutralización viral en embrión de pollo, como método de diagnóstico para la enfermedad de Pacheco.

III. HIPOTESIS

La prevalencia de anticuerpos circulantes contra la enfermedad de Pacheco, en las guacamayas rojas (*Ara macao cyanoptera*) del zoológico "LA JUNGLA" del IRTRA PETAPA es del 50 %.

IV. REVISION BIBLIOGRAFICA

A. ENFERMEDAD DE PACHECO (PDV)

Es una enfermedad altamente contagiosa, aguda y fatal, que afecta a Psitacidos. Fue diagnosticada por primera vez en Guatemala, en septiembre de 1987 por los doctores Leonel Jimenez y Francisco Trigo. Se asocia con estrés que puede causar que los portadores sanos escreten el virus e inicien la infección en aves sensibles. Es una enfermedad cosmopolita (4, 15, 19, 20).

1. ETIOLOGIA:

Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Pacheco y Bier en 1930 en loros de Brazil, que murieron en el curso de 8 días sin tener más signos que somnolencia y plumaje erizo. (10, 16) También es conocida como hepatoesplenitis y/o hepatitis por cuerpos de inclusión por herpes. Esto último ha sido mal entendido a causa que frecuentemente las aves mueren de necrosis masiva hepatica, antes que las inclusiones se hagan evidentes (3). Causa hepatoesplenitis necrosante que es rápidamente mortal, y es causada un herpesvirus perteneciente a la sub-familia Beta, y que son envueltos, poseen doble cadena DNA y mide de 180 a 200 nm de diámetro, del cual se sabe hay diferentes patotipos (2, 4, 10, 15, 19, 11).

2. ESPECIES SUSCEPTIBLES

Una gran variedad de Psitácidos pueden infectarse, como por ejemplo: Guacamayas, loros, cacatuas, pericas australianas, cocotilos, **Concyuros**, periquitos del amor, miembros del genero **Poicephalus**, loros del género Eos (3, 4, 10, 11, 15, 16, 17, 19, 24). Los conuros como *Cyanoliseus patagonus*, *Nandayus nenday* y *Aratinga mitrata* son frecuentemente portadores asintomáticos. Cualquier ave que sobreviva un ataque puede considerarse un portador latente del virus. En estos animales ha sido reportada una elevación de la aspartato aminotransferasa y marcada leucopenia (2, 4, 7, 16).

3. TRANSMISION:

Se piensa que la fuente de infección son aves nuevas, que ingresan al aviario, y son portadores aparentemente sanos (5).

Aunque se desconoce la vía exacta de transmisión del virus de la enfermedad de Pacheco, se sabe que este virus se ha recuperado en gran número, de heces y secreciones faríngeas de aves sintomáticas y portadoras asintomáticas. Por tanto, el contacto directo con aerosoles contaminados y la vía oral-fecal parecen ser las vías probables de transmisión del virus (2, 4, 11). Experimentalmente el virus ha sido transmitido por nebulización, ingestión e intraocularmente (24). En pericas australianas, la enfermedad de Pacheco puede ser inducida por inoculación intramuscular del virus (17).

Los informes sugieren que los humanos pueden servir como medio de transporte para el virus, aun cuando existan intervalos relativamente grandes

entre la exposición del ave. Es común un período de incubación de 3 a 7 días (4), aunque puede variar de 3 a 14 días, y casos inusuales que pueden tomar varias semanas (2, 22).

4. COMPORTAMIENTO CLINICO Y PATOLOGICO:

La enfermedad clínica es por regla general hiperaguda y las aves pueden morir súbitamente o mostrar signos no específicos como letargia, anorexia, plumas erizadas, sinusitis, disnea, poliuria así como uremia, biliverdinuria y diarrea intermitente. Los uratos pueden aparecer amarillos o verdes, indicando que el daño hepático está presente. A veces se observan secreciones por los orificios nasales, sinusitis y conjuntivitis. Regurgitación, diarrea sanguinolenta y signos terminales del sistema nervioso central, como convulsiones o tremores en el cuello y en la musculatura de las alas y piernas, han sido reportados infrecuentemente. Los signos a menudo progresan hasta la muerte en unos cuantos días (4, 10, 15, 17).

En 1998, se describió que el virus de Pacheco es causante de la enfermedad de dilatación proventricular (PDD)(13).

A la necropsia las aves afectadas presentan un hígado agrandado que puede estar moteado o presentar otros cambios de color (por ejemplo verde) (15). A veces se observan petequias en la banda coronaria del corazón, los ventrículos y la grasa mesentérica. En ocasiones también ocurre edema de la grasa mesentérica y ascitis. Los riñones y los pulmones también están alterados frecuentemente por una infección bacteriana secundaria. Focos necróticos en hígado, esplenomegalia. Se pueden encontrar inclusiones intranucleares eosinofílicas, llamadas cuerpos de Cowdry tipo A, en las células

del parénquima que rodea los focos necróticos en el hígado y los riñones. También se han descrito ocasionalmente cuerpos de Cowdry en las células del pulmón, bazo, canalículos biliares, epitelio intestinal, buche y páncreas (4, 11, 15, 16).

5. DIAGNOSTICO:

Aunque la historia y la apariencia clínica puede sugerir la enfermedad de Pacheco, para confirmar la infección se requiere realizar una necropsia, o en los casos en que las aves sobreviven a la infección, el aislamiento viral de las heces o su observación directa en las heces por microscopía electrónica. Macroscópicamente las lesiones incluyen hepatomegalia, esplenomegalia, nefritis y hemorragia en serosa cardíaca y pericardio. A veces el hígado afectado puede ser amarillo pálido. En otras aves el hígado puede aparecer moteado o tener focos descoloridos. En muchos casos las lesiones macroscópicas no se observan en el hígado. También se ha reportado la presencia de aerosaculitis (2, 15). El virus puede ser aislado de hígado, bazo, riñones y páncreas (4).

Histológicamente hay acúmulo de sangre, hemorragia diseminada, necrosis de coagulación, parénquima hepático con degeneración vacuolar de los hepatocitos. La necrosis hepática está presente en la gran mayoría de los casos. La necrosis puede ser circunscrita pero generalmente es extensiva, y en ocasiones solo los hepatocitos que rodean las venas centrales y triada portal están libres. Variables grados de hiperplasia linfoide esplenica y necrosis, pancreatitis, y enteritis también pueden ocurrir (2, 15).

La ocurrencia de cuerpos de inclusión es patognomónico de infección por herpesvirus, pero esto no indica el tipo del mismo. En casos hiperagudos, las inclusiones pueden no estar presentes. Por lo tanto para el diagnóstico definitivo es frecuentemente necesario el aislamiento viral. El virus se replica en embriones de pollo y de pato de Muscovy o en cultivos celulares de estos embriones. Comparado con otros herpesvirus de aves, el virus de Pacheco y cepas relacionadas causan únicamente lesiones discretas en la membrana corioalantoidea, pero el embrión revela necrosis hepática (con cuerpos de inclusión). El diagnóstico final se hace por identificación serológica (16).

El diagnóstico de ésta enfermedad puede confirmarse de diferentes maneras:

- a. Cultivo y aislamiento: Este virus crece fácilmente en fibroblastos de embrión de pollo, y en células renales de pollo, produciendo un efecto citopático caracterizado por formación de células sincitiales redondas con cuerpos de inclusión. También se pueden inocular embriones de pollo a través de la membrana corioalantoidea, los cuales mueren por efecto del virus 4 a 8 días después, con presencia de placas en la membrana corioalantoidea. El examen histológico de las placas de la membrana corioalantoidea y del hígado de embriones inoculados revela la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares (19)
- b. Inoculación de animales: El animal más adecuado para la inoculación experimental es la perica australiana (*Melopsittacus undulatus*) (19).
Identificación del virus: Se realiza detectando los cuerpos de inclusión intranucleares en la membrana corioalantoidea de embriones y en los hepatocitos de animales infectados. Al estudio en el microscopio electrónico se observan partículas virales en el núcleo midiendo de 110 a 115 nm y

partículas virales con envoltura en el citoplasma con un tamaño de 150 nm. (19).

c. Estudio serológico: Se realiza la prueba de sero-neutralización viral en embriones de pollo, ELISA y Anticuerpos Fluorescentes (19).

6. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL:

Ya que tanto el hígado, riñones y pulmones pueden estar envueltos en el proceso de la enfermedad, la lista para diferenciar es grande. Las más importantes de éstas son infecciones, como psitacosis, salmonelosis y Newcastle (24). Además se mencionan a las enfermedades causadas por Reovirus, las cuales son similares a las hepatitis por herpesvirus, pero principalmente a los loros grises africanos, los loros grises de Timneh y las cacatúas. No se observan cuerpos de inclusión y se usa serología para el diagnóstico (11).

7. TRATAMIENTO:

No se conoce un tratamiento específico. Las aves enfermas deben ser aisladas y proveerles calor. Vitamina C (50 mg/Kg de peso vivo), fluidos parenterales, y metionina (20 mg/Kg de peso vivo). Antibióticos (de sensibilidad probada) pueden ser administrados para prevenir una infección bacteriana secundaria, pero su hepatotoxicidad debe ser considerada (11, 16). A esto debe sumarse la administración de un alimento balanceado, preparado con 24% de proteína y 9% de grasa (15).

En una parvada expuesta, todas las aves clínicamente saludables, debe recibir vitamina C y/o un inmunomodulador como PIND ORF (2 ml/Kg de peso vivo), o Levamisol en dosis de 15 - 20 mg/Kg. En intervalos de 3 días (15, 16).

Si algún brote ocurre, se puede usar medicina para herpes virus humanos como Acyclovir (Zovirax' Burroughs-Wellcome)(3, 16), por vía oral: 80 mg/Kg cada 8 horas por 10 días, si la administración oral no es posible o es impráctica puede adicionarse en la comida en dosis tan altas como 240 mg/Kg. (para ésto se disuelven las cápsulas de 200 mg. en 8 onzas de agua, lo cual podrá usarse por las siguientes 2 semanas, (20)), o la administración IM de la presentación para aplicación IV en dosis de 40 mg/Kg de peso vivo cada 8 horas para disminuir la morbilidad y la mortalidad de las aves. El tratamiento es más efectivo si se inicia antes de que los signos clínicos sean evidentes. La regla de que Acyclovir puede inducir portadores asintomáticos no ha sido determinada (16).

Esto tiene la desventaja que la administración IM puede causar necrosis en el sitio de inyección, por lo que no habrá que aplicarla por más de 72 hrs (2, 20).

8. CONTROL:

Las medidas de control se incluyen en varias categorías: Inmunización, prácticas de manejo seguras, monitoreo serológico, estrictas medidas de higiene y cuarentena (2, 5, 11, 16).

La vacunación en el inicio de un brote es considerado controversial por algunos, porque el manejo puede ayudar a diseminar el virus(2).

La vacunación usando virus muerto (Psittamune PDV, Biomune, 8906 Rosehill Road, Lenexa, KS 66215) está disponible en los Estados Unidos de Norteamérica y puede administrarse en una serie de 2 inyecciones, con intervalo de 4 - 8 semanas. Algunas especies como las cacatuas han tenido reacción a la vacuna (granulomas y parálisis), para lo cual se recomienda la administración subcutánea. Sólo las aves con alto riesgo de exposición al virus, como una venta de aves pueden o deben vacunarse y debe aclararse que la vacunación no previene la existencia de portadores aparentemente sanos (2, 3, 4, 11, 15, 16, 20).

El uso de la vacuna no es reconocido o aceptado mundialmente ya que puede provocar otros problemas, principalmente en especies pequeñas, reportándose inclusive la muerte de éstas aves, granulomas en el sitio de inyección. La inyección SC e IM sólo puede hacerse en aves por arriba de los 100 gr. de peso corporal. Otros informes incluyen disminución de la fertilidad e incremento de muerte embrionaria de huevos de hembras vacunadas. (2, 4)

Debido a que el virus de pacheco y las cepas relacionadas con él pueden causar portadores con eliminación intermitente de virus a través de las heces, la cuarentena debe incluir aves centinelas tan jóvenes como sea posible y que no sean importantes para el programa de crianza. La cuarentena debe ser por lo menos de seis, y preferiblemente 12 semanas. Durante este periodo deberán correrse pruebas parasitológicas, bacteriológicas y virológicas así como también pruebas serológicas, para eliminar a los posibles portadores sanos (15, 16).

Las pruebas serológicas han sido usadas como una tendencia limitada para demostrar una exposición previa al virus. Se cree que si un ave es seropositiva, ésta puede estar infectada latentemente y puede eliminar el virus

en el futuro. Existen dos problemas con este concepto; el primero, no se conoce que porcentaje de las aves seropositivas eliminará el virus. Segundo, los títulos de anticuerpos pueden no persistir después de la infección, y pueden encontrarse aves negativas a los anticuerpos, pero eliminando el virus. Para identificar la aves infectadas pero serológicamente negativas, se ha sugerido la vacunación de estas unas pocas semanas después de la prueba. Las aves con altos títulos de anticuerpos siguientes a una vacunación, se presume que fueron expuestas al virus antes o que fueron previamente vacunadas, pero las aves con títulos bajos son negativos (2).

La prevención es el mejor camino para evitar un brote. Pueden llevarse a cabo reglamentos estrictos de cuarentena. No mezclar conuros con loros, algunos conuros pueden ser portadores asintomáticos y servir como fuente de infección para aves susceptibles (2, 7).

La sanidad es crítica en la prevención de la enfermedad, debido a que la diseminación del virus en el aviario ocurre principalmente por el contacto con heces contaminadas y secreciones faríngeas (4, 5, 6).

Limpiar continuamente los comederos y bebederos y después tratarlos con un desinfectante. El herpesvirus de ordinario se inactiva por desecación y por el contacto con la mayor parte de desinfectantes (5).

Instruir al personal del aviario para que practique medidas de higiene, lavando y desinfectándose las manos antes de entrar al aviario y después de manejar las jaulas individuales de las aves. La reducción del estrés ayuda a prevenir la eliminación y diseminación del virus (4, 5).

B. GUACAMAYA ROJA

(*Ara macao cyanoptera*)

1. CLASIFICACION:

Reino:	Animal
Filum:	Chordata
Super clase:	Tetrápoda
Sub clase:	Neornites
Clase:	Aves
Super orden:	Neognatas
Orden:	Psitaciformes
Familia:	Psitacidae
Género:	Ara
Especie:	macao
Subespecie:	cyanoptera

1. DESCRIPCION:

Una de tantas aves tropicales que son fácilmente reconocible, es la guacamaya roja (*Ara macao cyanoptera*) que es conocida por su gran tamaño (aproximadamente 35 pulgadas), y su magnificente cola larga y colores brillantes (1).

Las guacamayas rojas son pericos grandes de colores rojo y amarillo que viven en Centroamérica y Sudamérica. Las guacamayas de Sudamérica se ven diferentes a las que viven en Centroamérica (1, 12).

2. DISTRIBUCION:

La guacamaya roja de Sudamérica, *Ara macao macao*, vive en Brasil, Colombia, Ecuador y Perú, y tiene algo de verde en sus alas. La guacamaya roja de Centroamérica, *Ara macao cyanoptera*, se encuentra en México, Guatemala, y Belice, es más grande que la sudamericana y tiene color azul en sus alas (1, 12)



3. GENERALIDADES:

La guacamaya roja vive en bosques de lluvia no perturbados, se alimenta de frutos, nueces, flores y néctar. A veces se alimenta de fruta verde y de nueces que otros animales no consumen. También consumen arcilla de algunos bancos ribereños. Nadie está seguro de por qué hacen eso, pero la arcilla parece ser importante para ellos, ya que se arriesgan a ser capturados por felinos silvestres y otros depredadores cuando se posan en el suelo para consumirla (1, 12).

La guacamaya roja es probablemente la más conocida de las guacamayas de toda América Central, y es frecuentemente retratada en folletos de turismo. Sin embargo, viéndola en estado silvestre es otro tema, porque la

cacería, artesanía y colecta de crías de aves ha forzado a irse lejos de los distritos asentados (1, 12).

Esta espectacular guacamaya es vista generalmente en parejas, partidos familiares o en pequeñas parvadas de más de 30, y muchos autores han descrito sus impresionantes vivencias observándolas en estado salvaje (1, 12).

Como otros psitacidos grandes, éstas son muy ruidosas, y esto es más evidente cuando parvadas vuelan juntas en parejas. Ellos vuelan diariamente de sus lugares de aperchamiento a los lugares en donde se alimentan (1, 12).

4. CRIANZA:

Su período de incubación es de aproximadamente 28 días. Las guacamayas rojas anidan en cavidades en los troncos, lo cual les provee protección a los adultos y a los jóvenes. Cada par de guacamayas rojas cría solo uno o dos polluelos por año, y estos permanecen con sus padres por uno a dos años. Esto significa que solo algunos adultos tendrán crías en cada año y que el número de aves en la población no aumenta significativamente (1, 12).

La deforestación ha tenido un gran impacto en la guacamaya roja. Sin árboles, ellas no tendrán en donde anidar ni de que alimentarse. Las guacamayas rojas son también mascotas populares, lo que nos indica que muchas han sido sacadas de su estado silvestre. Sin embargo, hay personas que están estudiando como viven las guacamayas rojas, y al entender esto podrán diseñar la mejor manera de ayudar a estas hermosas aves (1, 12).

V. MATERIALES Y METODOS

A. MATERIALES:

1. Recursos Humanos:

- Estudiante que realiza la investigación.
- Médicos veterinarios asesores.
- Personal de zoológico

2. Materiales de laboratorio

- Solución salina estéril (2 lts.)
- 25 jeringas de 1 cc.
- Algodón (2 lb.)
- Alcohol isopropílico (1 lt.)
- Incubadora
- Micropipetas
- Perforador de huevos
- Jeringas desechables de 3 cc. (100 unidades)
- Tiras de papel filtro de 0.5 por 3 cm.

3. Materiales de Campo:

- Alcohol isopropílico (16 Onzas).
- Algodón (1/2 libra)
- 100 Jeringas desechables de 3 CC.
- 100 Agujas hipodérmicas de $\frac{3}{4}$ " X 25.
- 5 Redes para captura.
- 5 Toallas.

- Masking tape (un rollo).
- Un sobre papel mayordomo.
- Polivitamínico inyectable (un frasco de 50 cc.).

4. Recursos de tipo biológico:

- 15 ejemplares de guacamaya roja (*Ara macao*), en cautiverio en la ciudad de Guatemala.
- Antígeno viral.
- 525 Embriones de pollo de 9 días de edad.
- Albúmina bovina.

B. METODOS:

1. Area de estudio: El presente estudio se realizará en el zoológico privado LA JUNGLA.

2. Centros de referencia:

- Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala (BICIDIVEZ).
- Hospital Medico Veterinarios de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Internet.
- Biblioteca zoológico la Jungla, IRTRA Petapa.

- Biblioteca del departamento de Ornitopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

3. Metodología:

- a. Toma de la muestra: Las muestras fueron tomadas de 15 guacamayas rojas (***Ara macao***), aparentemente sanas. Para ésto se procedio a capturar a los animales con la ayuda de una red y toallas, fueron sujetadas por una persona tomándolos, con una mano de las patas y alas y con la otra la cabeza, mientras que otra persona inculó ketamina en dosis de 10 mg/Kg. de peso, en los músculos pectorales, para producir una anestesia leve, que permita manejar al animal con el menor estrés posible (este paso puede obviarse, dependiendo de la practica de los que manejen a los animales.). Luego se procedió a obtener la muestra por venipunción en la vena axilar, y colectada en tiras de papel filtro, debidamente identificadas, los cuales se depositaron en un sobre de papel mayordomo
- b. Traslado de la muestra: Las muestras fueron puestas en un sobre de papel mayordomo trasladarlas al laboratorio de ornitopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, donde fueron procesadas.
- c. Procesamiento de la muestra: Fue por el método de seroneutralización que se describe a continuación.

d.1 TEST DE SERO-NEUTRALIZACION VIRAL:

El test de sero-neutralización viral es independiente de que método o que clase de virus sea utilizado. Los pasos de la virus neutralización son:

1. Mezcla de los reactivos
2. Incubación
3. Inyección de la mezcla a embriones de pollo.
4. Observación y elaboración del protocolo de los cambios (9).

Se conocen 2 métodos del test de sero-neutralización:

Test sero-neutralización con virus constante contra diluciones de suero susceptibles (método de suero diluido) (9, 22,23).

Método de seroneutralización con cantidad constante de suero contra diluciones seriadas de virus (8, 9, 17).

1. METODO DE SUERO DILUIDO

Como costumbre se usa una dosis de 100 dosis infectivas de virus (DL 50 DI 50) en 0.1 ml. (9).

El grado de la neutralización es dependiente del contenido antígeno-anticuerpo. Entre más virus haya, menor será la neutralización y viceversa (9).

La dosis a usar actúa bajo el siguiente principio: El título del virus se divide dentro de la cantidad de dosis infectivas. El logaritmo del título del virus se resta de la dosis necesaria a usar. Como resultado se obtiene la dilución, que es necesaria realizar para tener 100 dosis infectivas. Por ejemplo:

Título viral : 10 elevado a la 7/0.1 ml

Dosis necesaria:100 partículas infecciosas/0.1 ml

= $10000000/100 = 10$ elevado a la 7/ 10 elevado a la 2 = 10 a la 5

1:100000

El virus material debe diluirse 1:100 (9)

2. REACCION:

El suero debe diluirse en 2 ó 4 partes. Igual parte de dilución viral constante e igual parte de las diferentes diluciones de suero (9).

Mezclar e incubar por 30-90 minutos a 37 °C (9).

Suero control I: Suero libre de anticuerpos.

Suero control II: El suero a usar diluido 1:2, mezclar e inocular, con este suero se controla si existe o no efecto tóxico

Suero control III: Suero control positivo (+)

Virus control positivo (+).

Los resultados del test de sero-neutralización se presentan como título de seroneutralización a través del método de Reed and Muench (9).

- el suero fue inactivado a 56 °C por 30 minutos.
- Se colocaron 7 tubos de ensayo numerados ascendentemente y se agregará a cada uno 140 microlitros de solución salina buferada con 2% de albúmina bovina.
- Se agrego 140 microlitros de suero problema en el tubo 1, luego se prosecio a homogenizar y extraer 140 microlitros de mezcla, y agregarlos al otro tubo hasta llegar al tubo 7.
- Se agrego 140 microlitros de virus titulado previamente, incluso a la última fila control de virus.
- Se incubo a 37 °C durante 1 hora.
- Se inoculo 0.1 ml. a cada embrión de 9 días en la membrana corioalantoidea
- Se incubaron durante 8 días.
- Se realizaron lecturas macroscópicas y microscópicas, observandose en las primeras, lesiones hepáticas como congestión y hepatomegalia,

y en las segundas, inclusiones intranucleares acidófilas en hígado y en membrana corioalantoidea.

VI RESULTADOS Y DISCUSION

En los sueros número: 3, 5, 8 y 14, se encontraron inclusiones intranucleares, en los cortes histológicos de hígado de embrión de pollo, desde la dilución 1:8. Esto se interpreta diciendo que en la dilución 1:4 existen anticuerpos contra la enfermedad de Pacheco, por lo que estos mismos neutralizaron al virus, y esto no permitió que se desarrollaran las inclusiones descritas. Por el contrario en la dilución 1:8 y siguientes, ya se encontrarán inclusiones, debido a que el los anticuerpos se encuentran muy diluidos por lo que no alcanzaron a neutralizar el efecto citopatico del virus, (ver gráfico 1 y 4).

En los sueros número 1, 9 y 10, se encontraron inclusiones intranucleares, en los cortes histológicos de hígado de embrión de pollo, desde la dilución 1:16. Por lo que se determina que hay presencia de anticuerpos hasta la dilución 1:8, (ver gráfico 1 y 4).

En el suero número 7 se encontraron inclusiones intranucleares en los cortes histológicos de hígado de embrión de pollo en la dilución 1:32 y siguientes, por lo tanto hay anticuerpos hasta la dilución 1:16. Este suero fue el que mayor cantidad de anticuerpos circulantes presento, (ver gráfico 4).

Con lo anterior concluimos que la prevalencia de anticuerpos circulantes contra la enfermedad de Pacheco, en el área de estudios es de 53 % (ver gráfico 2).

Por medio del método de Reed and Muench, se determinó la dosis infectiva 50 (DI 50) , la cual fue para los sueros 1, 9 y 10 de 0.33; seguidamente se determinó el índice de seroneutralización (IN), el cual fue para los mismos sueros igual a 1.098. Para los sueros número 3, 5, 8 y 14, la DI 50 fue de 0.5, y la IN es de 1.2. Así mismo el suero número 16 presentó una DI 50 de 0.33 y un IN de 1.497, (La dosis infectiva 50 es la concentración de un virus, con la cual se logra infectar al 50 % de los individuos desafiados) (ver gráficos 6 y 7).

En los sueros número 2, 4, 6, 11, 12, 13 y 15 se encontraron inclusiones en todas las diluciones, lo cual se interpreta diciendo que no tienen anticuerpos circulantes contra la enfermedad de Pacheco.

No existió diferencia en la relación macho/hembra, en cuanto a la presencia de anticuerpos circulantes(ver gráfico 2).

En el desarrollo experimental del proyecto de estudio, pudimos comprobar la hepatomegalia y las inclusiones (cuerpos de Cowdry tipo A), que son eosinofílicas, las cuales se logran observar con un halo claro alrededor de la misma. Además de esto en la gran mayoría de los cortes histológicos se pudo observar una degeneración hidrópica, la cual es resultado del efecto citopático que reporta la literatura (4, 11, 15 y 16).

El hecho de haber encontrado una prevalencia tan alta de aves seropositivas a la enfermedad de Pacheco, en la colección estudiada, es un factor muy importante a tomar en cuenta, ya que hasta ahora no se ha

desarrollado ningún brote, pero no se está libre de riesgo, debido a que son animales sometidos frecuentemente a estrés, por lo que habría que mantener las condiciones de manejo que hasta ahora han permitido evitar mortalidad, y si fuese posible mejorarlas un poco para prevenir que aparezca un brote.

Debido a que la literatura sugiere que el humano puede ser un medio de transporte mecánico para el virus (4), deben tomarse medidas de bioseguridad mínimas, por parte del personal que labora en el área de estudio, para evitar la contaminación de las áreas que hasta ahora no tienen problema. Esto es debido a que el estudio realizado fue en una sola especie de psitacidos, pero en la colección existes más especies, y no se sabe si también tienen anticuerpos o no.

Todos los animales muestreados presentan una condición corporal aceptable, y todos son o están aparentemente sanos, por lo tanto, atendiendo a la literatura, debemos concluir que la gran mayoría de los psitacidos de Centro América son portadores sanos de la enfermedad de Pacheco (2, 4, 7 y 16).

La inoculación de embriones de pollo vía membrana corioalantoidea, es la mejor opción para correr pruebas serológicas en nuestro medio, ya que según lo observado en nuestro experimento, en el examen histológico se observaron las placas en membrana corioalantoidea y así mismo los cuerpos de inclusión (19), los cuales variaron en tamaño, dependiendo de qué día murió el embrión, de tal manera, que las inclusiones observadas en los embriones que murieron antes fueron más pequeñas que las de los que se sacrificaron al día 8 post-inoculación.

El porcentaje obtenido entre individuos positivos no fue significativamente diferente del número de individuos negativos ($\chi^2 = 0.066$; g.L. = 1, $P < 0.005$.), lo cual corresponde a la predicción establecida.

VII CONCLUSIONES

- Existen anticuerpos circulantes contra la enfermedad de Pacheco, en 53 % de las guacamayas rojas (*Ara macao*) del zoológico del IRTRA "LA JUNGLA".
- Todas las aves que presentaron anticuerpos circulantes, son portadores sanos.
- La mejor forma de controlar la enfermedad de Pacheco en una población de aves sero positivas (en algún porcentaje a la presencia de anticuerpos) es evitando el estrés, mejorando la dieta y dar suplementos vitamínicos.
- La prevención es el mejor camino para evitar un brote de la enfermedad de Pacheco.
- No existió diferencia en la relación macho/hembra, en cuanto a la presencia de anticuerpos circulantes.
- La gran mayoría de los psitacidos de Centro América son portadores sanos de la enfermedad de Pacheco.
- La inoculación de embriones de pollo vía membrana corioalantoidea, es el método de elección para la prueba de seroneutralización viral en el diagnóstico de la enfermedad de Pacheco.

VIII RECOMENDACIONES

- Evitar el estrés en las aves.
- Trabajar con el enriquecimiento ambiental de los recintos para favorecer la salud mental de las aves.
- Administrar suplementos de vitaminas a las aves durante una semana previo a cualquier actividad de manejo con las aves.
- Proporcionar vitamina C (50 mg/Kg. De peso) en caso de que las aves estén padeciendo alguna enfermedad, o que se sospeche de la enfermedad de Pacheco.
- Realizar necropsias a todas las aves muertas, no importando si se conoce la causa de la muerte, haciendo histopatología de rutina de hígado de psitácidas muertas sin sintomatología previa.
- No mezclar conuros con loros.
- Si se piensa iniciar una colección de psitácidos, hacer pruebas serológicas, para, desde el principio, introducir solamente aves no portadoras de enfermedades e implementar un estricto control de cuarentena a las aves nuevas.

- Debido a que el herpesvirus se inactiva al tener contacto con la mayor parte de desinfectantes, se recomienda utilizar desinfectantes después de lavar los comederos y bebederos.
- Realizar un estudio bromatológico a la dieta de las aves de la colección estudiada, para determinar si cumple con los requerimientos de cada especie, de no ser así, hacer los ajustes necesarios.
- Instruir al personal del zoológico para que practique medidas de bioseguridad mínimas dentro del recinto, ya que la prevención es el mejor camino para evitar el brote de una enfermedad.
- A las aves sospechosas de cualquier enfermedad viral, administrar Levamisol por vía oral en dosis de 15 - 20 mg/Kg.
- Considerar que en el mercado norteamericano existe una vacuna, y estudiar la posibilidad de su uso.
- Se recomienda a las autoridades correspondientes, dar un seguimiento a la enfermedad de Pacheco en los psitacidos de Guatemala, ya que previo a éste no existía ningún estudio, y la prevalencia es alta; todo encaminado a prevenir un brote.
- Realizar más estudios relacionados con la vida silvestre como un aporte de nuestra profesión a la conservación de nuestra fauna silvestre.

IX RESUMEN

En el presente estudio se muestrearon 15 guacamayas rojas (*Ara macoo cyanoptera*) del zoológico "La Jungla", del IRTRA, las cuales constituyen el 50% de la población de las mismas.

Se tomaron muestras sanguíneas por medio de papel filtro, las cuales fueron trabajadas en el laboratorio de Ornitopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Para el diagnóstico se utilizó la prueba de seroneutralización viral en embrión de pollo, obteniendo como resultado un alto porcentaje de animales seropositivos (53%), en la colección estudiada.

En el estudio macroscópico y microscópico se confirmaron las lesiones que reporta la literatura, tales como hepatomegalia, nefritis y los cuerpos de Cowdry, los cuales son patognomónicos de la enfermedad de Pacheco.

VIII ANEXOS

TABLA No. 1

No. tubo	No. Animal	Sexo	Condición Corporal	Peso en Lb.	Presencia de anticuerpos
1	90001	M	Buena	3	+
2	9030	H	Buena	3,5	-
3	desconocido	H	Buena	3	+
4	90005	H	Regular	3	-
5	9000017	M	Buena	3,5	+
6	desconocido	M	Buena	3,5	-
7	900006	H	Buena	3	+
8	900013	H	Buena	3,5	+
9	desconocido	M	Buena	3,5	+
10	90007	H	Buena	4	+
11	900070	M	Buena	3	-
12	90018	H	Buena	3	-
13	desconocido	M	Buena	4	-
14	900008	M	Buena	3,5	+
15	900012	M	Buena	4	-

TABLA No

2

SUEROS 1, 9 Y 10.

Dilución del Suero		Radio de	RESPUESTA		Valores acumulados			Porcentaje
Numerica	Log 10	Infectividad	Infectados	no infectados	infectados	no infectados	RADIO	de infectados
1 en 4	0,6	0 de 3	0	3	0	5	0 de 5	0
1 en 8	0,9	1 de 3	1	2	1	2	1 de 3	25
1 en 16	1,2	3 de 3	3	0	4	0	4 de 4	100
1 en 32	1,5	3 de 3	3	0	7	0	7 de 7	100
1 en 64	1,8	3 de 3	3	0	10	0	10 de 10	100

Dosis infectiva 50 (DI 50) = X/Y
 $DI\ 50 = \frac{50 - 25}{100 - 25} = \frac{25}{75} = 0,33$
 $IN = (DI\ 50) (\text{Log } 10 < 50\%) + \text{Log } 10 = 50$
 $IN = (0,33) (0,6) + 0,9 = 1,098$

TABLA No
3

SUEROS 3, 5, 8 y 14.

Dilución del Suero		Radio de Infectividad	RESPUESTA		Valores acumulados		RADIO	Porcentaje de infectados
numerica	Log 10		infectados	no infectados	infectados	no infectados		
1 en 4	0,6	1 de 3	1	2	1	3	1 de 3	33,33
1 en 8	0,9	2 de 3	2	1	3	1	3 de 4	75
1 en 16	1,2	3 de 3	3	0	6	0	6 de 6	100
1 en 32	1,5	3 de 3	3	0	9	0	9 de 9	100
1 en 64	1,8	3 de 3	3	0	12	0	12 de 12	100

$$DI_{50} = 50 - 33,3 = 16,7 = 0,4$$

$$\frac{66,6 - 33,3}{33,3}$$

$$IN = (0,5) (0,6) + 0,9 = 1.2$$

TABLA No

4

Dilución del Suero		Radio de	SUERO 7. RESPUESTA		Valores acumulados			Porcentaje
Numerica	Log 10	Infectividad	infectados	no infectados	infectados	no infectados	RADIO	de infectados
1 en 4	0,6	0 de 3	0	3	0	9	0 de 9	0
1 en 8	0,9	0 de 3	0	3	0	6	0 de 6	0
1 en 16	1,2	1 de 3	1	2	1	3	1 de 4	25
1 en 32	1,5	2 de 3	2	1	3	1	3 de 4	100
1 en 64	1,8	3 de 3	3	0	6	0	6 de 6	100

$$DI_{50} = 50 - \frac{25}{75 - 25} = 25 = 0,33$$

$$IN = (0,33)(0,9) + 1,2 = 1,497$$

GRAFICO No. 1 PRESENCIA DE ANTICUERPOS CIRCULANTES EN DIFERENTES DILUCIONES, Guatemala, Octubre 1999.

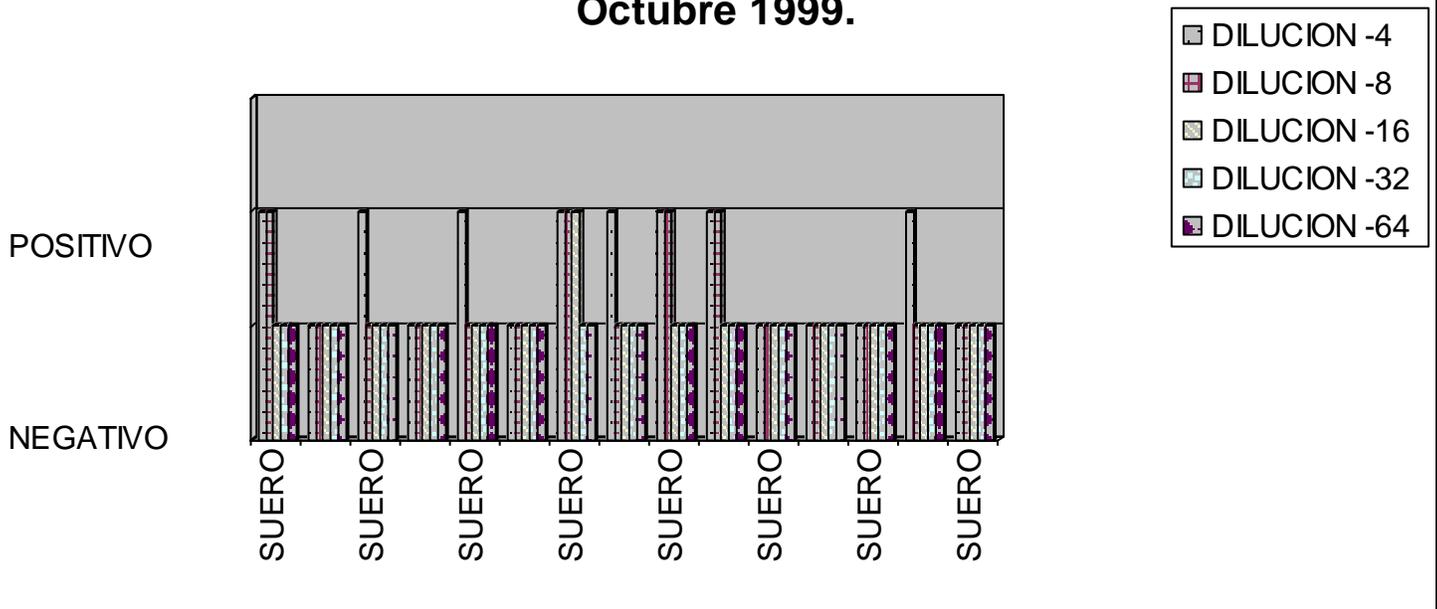


GRAFICO No.2 PORCENTAJE DE AVES POSITIVAS Y NEGATIVAS A ANTICUERPOS CIRCULANTES CONTRA LA ENFERMEDAD DE PACHECO. Guatemala, Octubre 1999.

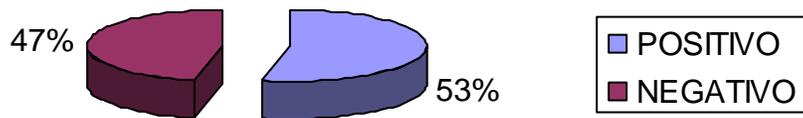
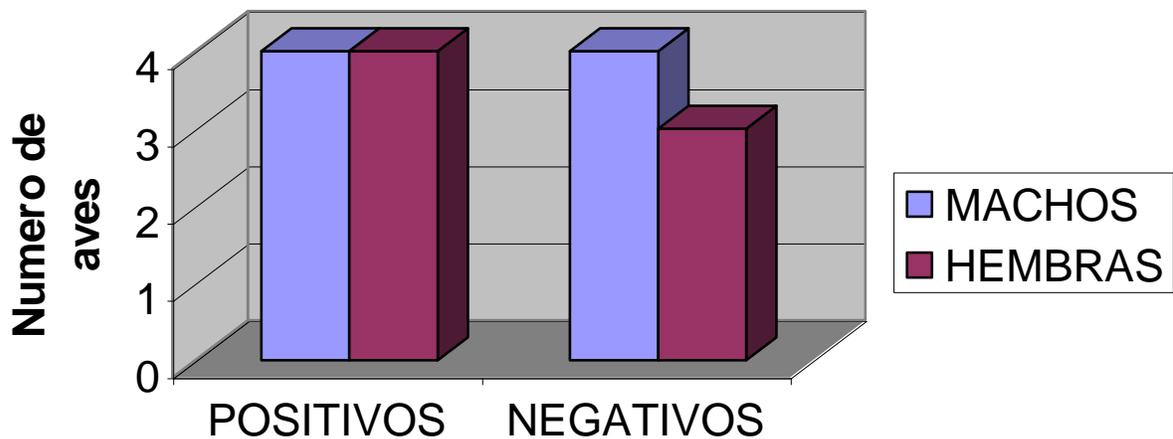
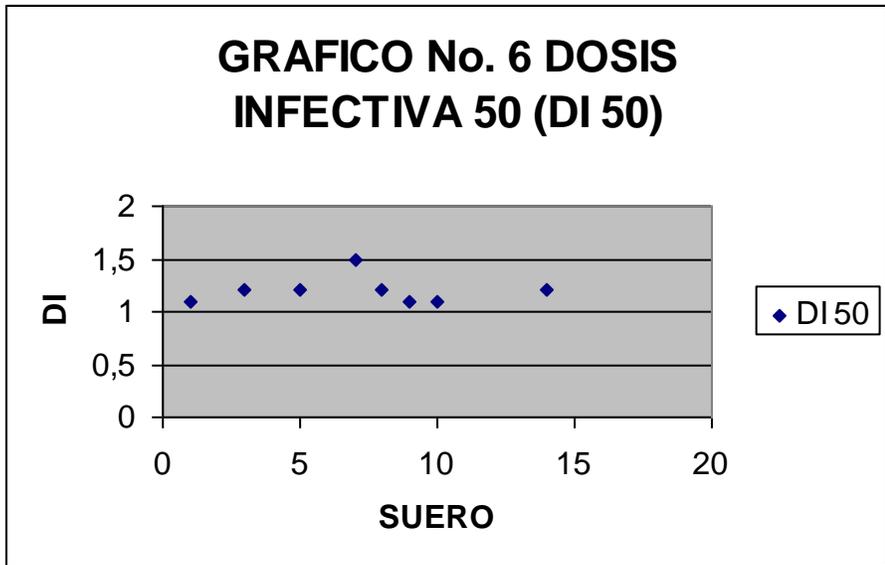
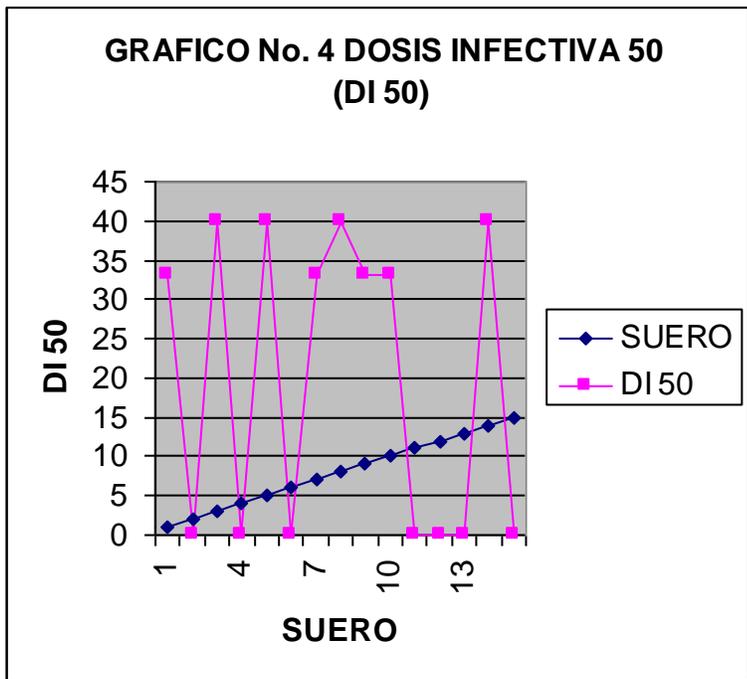


GRAFICO No.3 NUMERO DE AVES POSITVAS Y NEGATIVAS SEGUN SEXO A ANTICUERPOS CIRCULANTES Guatemala, Octubre 1999.





IX. BIBLIOGRAFIA

1. ALDERTON, D. 1991. The atlas of parrots of the world. USA. T.F.H. Publications. p. 207, 209.
2. ALTMAN, R. B. *et al.* 1995. Avian medicine and surgery. Philadelphia, USA., W.B. Saunders Company. p. 114-115, 296-299, 446, 651.
3. BACTERIAL ENTERITIS diseases s.f. s.l., s.n. 1 p.
<http://www.petsupport.com/BIRDS/diseases.html>.
4. BIRCHARD, S.; SHERDING, R. 1994. Manual clínico de pequeñas especies. México D.F., McGraw-Hill. p. 1506-1507.
5. BUTCHER, G.; MILES, R. 1993. Disease prevention in commercial aviaries. s.l., s.n. p. 7
http://edis.ifas.UFL.edu/scripts.htmlgen.exe?DOCUMENT_VM006
6. COLES, B.H. 1985. Innere medizín und chirurgie bei vögeln. Stuttgart, Germany, Blackwell Scientific Publication. p. 25, 28, 57, 260.
7. COMMON PET BIRD species and their respective characteristics and their respective characteristics and syndromes. s.f. s.l., s.n. 2 p.
<http://www.santaclarapethospital.com/avispec.htm>
8. CUNNINGHAM, CH.H. 1990. A laboratory guide in virology. 6 ed. Minnesota, USA., Burgess Publishing Company. p. 76-80
9. DIAGNOSTICO DE enfermedades virales animales:
Curso de actualización. 1991. Buenos Aires, Arg., Instituto de Virología p. 2-5.
10. EBERT, U. 1984. Vogen-krankheiten: Zier-und Wildvögel-Behandlung. Haltun, Pflege. Germany, Shaper Hannover. p. 307-308.

11. EL MANUAL merck de veterinaria: Un manual de diagnóstico, tratamiento, prevención y control de las enfermedades para el veterinario. 1993. Ed. por Clarence M. Fraser. 4 ed. Barcelona, Esp., Oceano. p. 1160- 1161.
12. FORSHAW, C. 1997. Parrots of the world. USA. T.F.H. Publications, Inc. p. 362-363.
13. FOWLER, M.E. 1990 Zoo / wild animal medicine: Current therapy. Philadelphia, USA., W.B. Saunders Company. p. 169, 245.
14. GREGORY, CH.; *et al.* 1998. Progress in understanding proventricular dilatation disease. University of Georgia. 3 p. <http://www.funnyfarmexotics.com/IAS/PDD98.htm>
15. GRIMM, F.; GYLSTORFF, I. 1987. Vogelkrankheiten. Stuttgart, Germany, Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co. p. 35, 130-131, 145-146, 270-271, 458, 460, 463, 475.
16. HAGEN, M. s.f. An outbreak of herpesvirus and its future prevention in an indoor parrot breeding facility. Canada, University of Guelph. 3 p. <http://www.pubnix.net/~mhagen/dow/herpes1.html>
17. HOEFER, H. 1997. Practical avian medicine. New Jersey, USA, Veterinary Learning Systems. p. 78-80.
18. ISOLATION AND identification of avian pathogens. 1950. Ed. por Stephen B. Hitchner. y otros. Ithaca, New York, USA., Arnold Printing Corporation. p. 320-326.
19. JIMENEZ, L.; TRIGO, F. 1987. Enfermedad de pacheco: Informe del primer caso en Guatemala. Boletín IICA (Guatemala). 1 (2): 29-30.
20. JUDY LEACH´S parrot babies. s.f. s.l. s.n. 1 p. <http://www.petparrot.com/Diseases.htm>

21. MORILLA, G.A.; BAUTISTA G., C.R. 1986. Manual de inmunología. México, D.F., Diana. p. 148-149, 158-159.
22. PESSEK, I. 1996. Ask the vet (pacheco's disease). Nestbury, N.Y., SyberSonic. 3 p. <http://theaviary.com/s1295-59.shtml>
23. RHODES, A.J.; ROYEN, C.E. 1962. Textbook of virology. 4 ed. Baltimore, USA., The Williams/Wilkins Co. p. 117-119.
24. RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, C.R. 1994. Avian medicine: Principles and application. Florida, Wingers Publishing. p. 878-879.
25. TIZARD, I. 1980. Inmunología veterinaria. 3 ed. México, D.F., Interamericana. p. 157-158.