

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**MONITOREO DE INFLUENZA AVIAR EN GRANJAS
AVÍCOLAS EN LA REGIÓN LAGUNERA EN EL 2007**

POR

LUÍS AGUSTÍN JIMÉNEZ ZAVALA

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

Septiembre del 2007

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**MONITOREO DE INFLUENZA AVIAR EN GRANJAS
AVÍCOLAS DE LA REGIÓN LAGUNERA EN EL 2007**

TESIS

POR:

LUÍS AGUSTÍN JIMÉNEZ ZAVALA

ASESOR PRINCIPAL:

M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

COLABORADORES:

M.V.Z. JOSE LUÍS GÜEMES JIMÉNEZ

M.C. SERGIO I. BARRAZA ARAIZA

M.V.Z. HILDA RUTH SAGREDO ULLOA

Torreón, Coahuila, México

Septiembre del 2007

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**MONITOREO DE INFLUENZA AVIAR EN GRANJAS
AVÍCOLAS DE LA REGIÓN LAGUNERA EN EL 2007**

TESIS POR:

LUÍS AGUSTÍN JIMÉNEZ ZAVALA

ASESOR PRINCIPAL

M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

Torreón, Coahuila, México

Septiembre del 2007

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**MONITOREO DE INFLUENZA AVIAR EN GRANJAS
AVÍCOLAS DE LA REGIÓN LAGUNERA EN EL 2007**

TESIS POR:

LUÍS AGUSTÍN JIMÉNEZ ZAVALA

ASESOR PRINCIPAL

M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA
ANIMAL**

M.C. JOSE LUÍS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS

Torreón, Coahuila, México

Septiembre del 2007

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Presidente del jurado

M.C. Ernesto Martínez Aranda

Vocal

M.V.Z. José Luís Güemes Jiménez

Vocal

M. C Sergio Ignacio Barraza Araiza

Vocal Suplente

M.C. Jorge Iturbide Ramírez

Torreón, Coahuila, México

Septiembre del 2007

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por darme el privilegio de vivir y tener la mejor familia, por darme la oportunidad de estudiar y aprender para ser una mejor persona y por tus bendiciones que me permitieron alcanzar mi sueño.

A MIS PADRES

Por ayudarme en mi carrera y darme todo sin nada a cambio y por ayudar a que cumpliera mí sueño.

A MI ALMA TERRA MATER

Por haberme brindado la oportunidad de haber sido parte de ella y darme las herramientas para poder ser un profesionista.

A MIS ASESORES

M.C. Ernesto Martínez Aranda por su gran apoyo, asesoramiento para la realización de esta tesis sobre todo por su valiosa amistad, consejos y confianza brindada.

M.V.Z. José Luís Güemes Jiménez por su gran apoyo incondicional para terminar mi carrera, sobre todo por su gran amistad y grandes consejos.

M.C. Sergio Ignacio Barraza Araiza por su enseñanza, comentarios, corrección para el desarrollo de esta tesis, así como por su amistad.

DEDICATORIAS

A DIOS

Por haberme dado las fuerzas en cada momento difícil de mi vida y ayudarme a levantarme con más fuerza.

A MIS PAPAS

Maria Eugenia Zavala Gómez, por haberme dado la vida y por ser la mujer mas maravillosa por que día a día se preocupo por mi, por darme todo sin condiciones y por darme buenos consejos para ser una persona de valor y por que estoy orgulloso de ser su hijo, gracias mama por existir y ser mi madre. Dios te bendiga y te guarde siempre. TE AMO MAMA.

Agustín Jiménez Casanova, por ser un gran padre y ser un buen ejemplo y darme todo sin condiciones, por enseñarme a respetar y ser respetado, por tu apoyo en todo momento, gracias por ser mi padre y estoy orgulloso de ser tu hijo. Dios te bendiga y te cuide mucho. TE AMO PAPA.

A MIS HERMANOS

Teresa Guadalupe Jiménez Zavala.

Rocio Lilian Jiménez Zavala.

Juan José Jiménez Zavala.

Gracias por estar en todo momento conmigo, por comprenderme y darme consejos de suma valía e impulsarme a lograr mi objetivo, gracias hermanos por su amor y cariño.

M.V.Z. JOSÉ LUÍS GÜEMES JIMÉNEZ.

Por ayudarme ha retomar mi carrera y poder terminarla en especial por los consejos y el apoyo que en todo momento me brindo se lo agradeceré todo la vida.

M.V.Z. SILVESTRE MORENO AVALOS Y FAMILIA

Gracias por su apoyo incondicional, ya que fueron parte fundamental para lograr terminar mi carrera. Dios los bendiga. Los llevo en mi corazón.

A TODOS LOS MAESTROS

Que fueron parte para la formación de mi carrera y que tuvieron influencia a lo largo de está, ya sea con su apoyo moral y/o social que para mi lo poco ó mucho asido parte fundamental para concluir mi meta. Dios los bendiga hoy y siempre.

A MIS AMIGOS

Gracias por la amistad que me brindaron, por su compañía, por los momentos maravillosos que compartimos y sobretodo porque hicimos una bonita familia y gracias por los logros que hicimos juntos.

INDICE

Índice	1
Resumen.	2
Introducción	3
Revisión y literatura	5
Antecedentes de la enfermedad	5
Descripción del virus	6
Clasificación de la cepa	7
Transmisión del virus	8
Signos clínicos de la enfermedad	10
Patogenia	12
Importancia a nivel mundial	13
Material y métodos	14
Norma para la toma de muestras	14
Procedimiento para la toma de muestras de aves con papel filtro	15
Técnica para la punción de la vena braquial	15
Selección de las aves a muestrear	16
Extracción de la muestra	16
Forma de envío	17
Equipo, instrumentos, reactivos y condiciones ambientales requeridas para el diagnóstico	18
Titulación del antígeno	20
Procedimiento de la prueba de Inhibición de la hemaglutinación	21
Interpretación de los resultados	23
Resultados y discusión	25
Literatura citada	26

RESUMEN

Se realizó un monitoreo de aves en granjas tecnificadas para verificar si eran portadoras del virus de la Influenza Aviar. El estudio se realizó en granjas avícolas en los municipios de Torreón Coahuila, Gómez Palacio y Cd. Lerdo, Durango, que forman parte de la Región Lagunera. Se tomaron un total de 13,475 muestras de suero en el mes de abril de 2007. Se obtuvieron muestras de sangre las cuales fueron obtenidas a través de la punción de la vena braquial en el ala y recolectadas en papel filtro para su posterior análisis en laboratorio por medio de la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (IH). Y se tomaron 2,750 hisopos traqueales y cloacales. Todas las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de C.P.A, a través de la prueba de Inhibición de la hemaglutinación, de las cuales todas resultaron con Dx negativo. Con el resultado obtenido de este trabajo, se confirma que las aves que se encuentran en las granjas tecnificadas de Torreón, Coah.; Gómez Palacio y Cd. Lerdo, Dgo. Se encuentran libres del virus de la enfermedad de Influenza Aviar.

I. INTRODUCCIÓN

La influenza aviar es una enfermedad que se presenta en todas las aves silvestres y domesticas. Aunque en algunas formas de presentación puede afectar al humano y algunos mamíferos menores. Antiguamente se le conoció como “Plaga Aviar”. La influenza aviar es una enfermedad que se encuentra clasificada dentro de la lista A de la OIE. (OIE, 2004)

Es causada por un virus de la familia Orthomyxoviridae, tiene dos formas de presentación: de baja patogenicidad y de alta patogenicidad; la primera se presenta con algunos signos respiratorios leves y poca mortandad, y la segunda se presenta con signos digestivos y nerviosos graves, pudiendo llegar al 100% de mortalidad. La patogenicidad del virus se establece en base a los antígenos de superficie de hemaglutinina (HA) y neuroaminidasa (NA). De esta se derivan diferentes cepas las cuales varían en el grado de patogenicidad (Calnek *et al.*, 2000)

Esta enfermedad se ha descrito desde hace más de un siglo y ha sido reportada en varias partes del mundo. El primer caso fue descrito por el científico italiano Eduardo Perroncito en 1878, en Turín Italia. Se han registrado reportes de brotes en Alemania, Irlanda, África del Sur, Hungría, Corea, China, Hong Kong, Irán, Pakistán, Estados Unidos, Australia, y países del medio oriente, esto ha representado grandes pérdidas económicas para estos países (Cox y Subbarao, 2000)

En México se observaron signos clínicos compatibles con los de la influenza aviar en 1993, y en 1995 se identificó como virus de la influenza aviar con antígenos de superficie H5N2, considerados como de baja patogenicidad. A nivel nacional, una investigación serológica determinó que se encontraba infectadas las parvadas de 11 estados de la parte central de México, en ese entonces resultaron negativas las parvadas del sur y norte del país (Gurria, 2000).

Esta enfermedad ha adquirido gran importancia en México por el gran impacto económico que ha representado en la industria avícola, la forma en que se han incrementado la movilización comercial de las aves, y a que la participación de aves silvestres como fuente de infección a las domésticas (Cedo, 2001)

En la Región Lagunera la explotación avícola es de suma importancia ya que se cuenta con un gran número de granjas tecnificadas lo que magnifica la importancia de mantener libre de influenza aviar a esta zona, esta es la justificación epidemiológica que sustenta este muestreo.

Se realizó un monitoreo en aves en granjas tecnificadas en los municipios de Torreón Coahuila, Gómez Palacio y Cd. Lerdo, Durango, con el fin de verificar la posible presencia de el virus de la influenza aviar.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

La influenza aviar (IA), es un modelo de enfermedad tipo peste, que ha causado grandes estragos en la avicultura mundial, teniendo un gran impacto económico en el país o región afectado.

La infección en aves puede ser inaparente o variar las manifestaciones clínicas, desde trastornos respiratorios leves hasta infecciones generalizadas con elevada morbilidad y mortalidad (García *et al.*, 2002)

2.1. Antecedentes de la enfermedad

Uno de los primeros casos que se reportaron fue en 1878 por el italiano Edoardo Perroncito, el cual los describe como una septicemia en pollos que no era causada por bacterias y denominada “peste aviar”. En 1901 Centanni y Savunozzi describen que la enfermedad es causada por un agente filtrable y demostraron que la enfermedad podía ser reproducida en el laboratorio administrando homogenizados ultra filtrados obtenidos de aves muertas. No fue sino hasta 1955 cuando el Dr. Schafer en Alemania demuestra que la enfermedad es producida por un virus semejante al virus de la influenza que causa la enfermedad en los humanos, cerdos y caballos (García *et al.*, 2002).

En América se diagnosticó por primera vez en el año de 1924 en Nueva York diseminándose a varios estados hasta Missouri, volviendo a reaparecer en el condado de Morris, Nueva Jersey en 1929 (Meede *et al.*, 2001).

Siempre se a tenido que lidiar con este virus, en especial en los lugares donde se tienen grandes cantidades de aves para producción constantemente se han reportado casos de aislamientos de virus de la influenza aviar (IA), altamente patógenos desde Irlanda, México, Pakistán y recientemente en Asia (Calnek *et al.*, 1995).

Se cree que la primera observación de los signos compatibles con IA en México fue durante el otoño de 1993. En la primavera de 1995, el virus se identifico como IA con antígenos de superficie H5N2, en ese momento se clasifico de baja patogenicidad y se determino que se encontraban parvadas de 11 estados del centro del país, los estados del sur y del norte resultaron serológicamente negativos (Jordán y Pattison, 1998).

2.2. Descripción del virus

Los virus de la Influenza Aviar pertenecen a la familia Orthomyxoviridae, género Influenzavirus y se dividen en tres tipos antihigiénicamente diferentes: A, B Y C. El virus de IA tiene la facultad de hemaglutinar. Los tipos B y C se encuentran típicamente solo en humanos, los virus de influenza tipo A se hallan en los seres humanos, además en cerdos, caballos y ocasionalmente otros mamíferos como el mink, focas, ballenas y muchas especies aviares (Capua *et al.*, 2000)

Los virus de IA son virus con ARN, pleomorficos con un diámetro de 80 a 120 nm; no obstante, a menudo hay formas filamentosas del mismo diámetro con longitudes variables. La superficie del virión está cubierta con proyecciones o espigas espaciadas de manera estrecha de 10 a 12 nm de longitud, dentro de la envoltura esta incluida la nucleocapside

helicoidal; contiene proyecciones de glucoproteínas de la envoltura que tiene actividad hemoaglutinante (HA) y de neuroaminidasas (NA): la HA es un trímero en forma de bastón y la NA es un tetrámero en forma de hongo, las cuales pueden ser identificadas serológicamente para la clasificación final en el diagnóstico de laboratorio (NOM-056-ZOO-1995).

El virón puede romperse con detergentes, liberando las espigas que tienen sus actividades respectivas. La HA es causante de la fijación del virón a los receptores de la superficie celular y de la actividad hemoaglutinante de los virus y protección contra la infección. La actividad de la NA libera nuevos virus de la célula por su acción en el ácido neuramínico en los receptores: los anticuerpos contra la NA también resultan importantes en la protección, parece ser por medio de la restricción de la propagación del virus de las células infestadas (Cisterna y Barajas, 2002).

2.3. Clasificación de la Cepa

2.3.1. Clasificación del virus de acuerdo a su base Hemaglutinina y Neuroaminidasa

Esta clasificación se basa en el subtipo de hemaglutinina (HA) y neuroaminidasa (NA). En la actualidad existen 15 HA y 9 NA, las cuales se han identificado en varias combinaciones en aislamientos aviares. Para identificar la HA y la NA de un virus, se somete el aislamiento a pruebas de inhibición de la hemoaglutinina (IH) e inhibición de las neuroaminidasas (IN) con el uso de un panel de antisueros específicos para los distintos subtipos (Calnek *et al.*, 1995).

Las HA tienen características de combinarse con las NA, en teoría, las posibilidades de combinación darían como resultado la formación de 135 virus diferentes de la IA cada uno con características antigénicas diferentes (Rivera, 2001).

2.3.2 Clasificación del virus de acuerdo con su patogenicidad.

Esta clasificación se da en base al grado de morbilidad que se presenta en un brote de IA, esta se divide en Influenza Aviar de alta patogenicidad o de Influenza Aviar de baja patogenicidad.

Cualquier virus que inoculado con una dilución 1:10 de fluido alantoideo o cultivos de tejidos libres de bacterias, por vía intravenosa, en 8 pollos susceptibles de 4 a 8 semanas de edad, cause la muerte en 6, 7 u 8 de ellos, en un término de 10 días después de la inoculación se considera de alta patogenicidad.

Si el virus mata de 1 a 5 pollos y no pertenece a los subtipos H5 y H7, se requieren las siguientes pruebas adicionales.

- Replicación del virus en cultivo celular, para determinar si produce efecto citopático o formación de placas en ausencia de tripsina.
- Para los virus H5 y H7 de baja patogenicidad o de otro subtipo, si se cultiva en tejidos, en ausencia de tripsina, se les debe determinar las secuencias de aminoácidos del péptido conector de la hemoaglutinina. Si dicha secuencia es similar a la observada en los virus de alta patogenicidad se le considera en esa categoría (OIE, 2004).

Los cambios en la HA que se asocian a la patogenicidad son dos: uno que permite cambio en su forma de glicosilación en la que el rompimiento de la HA1, se sustituye por otro en esa capacidad. El otro cambio que ocurre en la estructura molecular del sitio del rompimiento con cambio en los aminoácidos básicos, el rompimiento de la cadenas se debe a la acción de las enzimas proteolíticas del tipo de la tripsina que se encuentra en las células que infectan (García *et al.*, 2002).

La HA en si, es quien determina la patogenicidad viral y con las que el virus se adhiere a las células, mientras que las NA actúan como enzimas que rompen el ácido neuromínico, dando así el fenómeno de elusión. La patogenicidad puede ser determinada por la secuencia de aminoácidos en el punto de unión de la HA. La infectividad del virus depende del rompimiento de este punto de unión, lo cual se lleva a cabo por medio de las proteasas, depende directamente del número de aminoácidos y son sensibles a enzimas similares a la tripsina, limitándose así al tracto respiratorio y digestivo (Pearson, 1994)

2.4 Transmisión del virus

Las aves infectadas excretan virus de las vías respiratorias, conjuntiva y heces, por tanto las formas probables de transmisión incluyen tanto contacto directo entre aves infectadas y susceptibles como contacto indirecto, abarcando aerosol (gotitas) o exposición a fómites contaminados con virus. Como las aves infectadas pueden excretar concentraciones elevadas de virus en sus heces, la propagación se logra con facilidad mediante prácticamente cualquier cosa contaminada con materia fecal, por ejemplo, aves y mamíferos, alimentos, agua,

equipo, jaulas, ropas, vehículos de entrega, insectos, entre otros. Por tanto, los virus se transportan con gran facilidad a otras zonas por medio de personas y equipo compartido por servicios de apoyo, aves vivas en jaula en venta (Capua *et al.*, 2000)

Las vías experimentales de exposición en las cuales se tienen éxito incluyen el aerosol, intranasal, intraqueal, oral, conjuntiva, intramuscular, intraperitoneal, intracaudal del saco aéreo, intravenosa, cloacal e intracraneal (Hernández *et al.*, 2000).

Parte de la evidencia implica a las aves silvestres como la fuente circunstancial, esta causa es suficiente para ver a estas aves como fuente real. Se ha considerado importante también a las aves silvestres como parte de la transmisión de influenza en las focas, ya que estas y dichas a ves comparten a menudo el mismo hábitat (Eckroade y Davison, 1990).

Hay una amplia evidencia de la transmisión horizontal de virus de influenza, pero poca evidencia de que los virus se puedan transmitir de manera vertical (Baez, 1994). No obstante debe señalarse que los virus pueden estar presentes dentro o en las superficies de los huevos cuando la gallina está infectada, como se demostró en el brote de Pensilvania logrando aislar la cepa H5N2 de huevos de gallinas. Después de la infección experimental de gallinas con el virus, casi todos los huevos puestos durante los 3-4 días posinfección, contenía el virus (Eckroade y Davison, 1990).

El periodo de incubación transcurre desde la infección hasta la presentación de signos clínicos, esta puede variar de horas hasta días

y depende de la cantidad de virus circulante, del estado de salud del ave y de la raza de aves infectadas (Vui *et al.*, 2002).

La IA altamente patógena puede atacar rápidamente a las aves de corral sin ninguna señal de infección; una vez establecida se puede diseminar rápidamente de parvada a parvada (NOM-EM-016-ZOO-2002)

2.5 Signos clínicos de la enfermedad

Los signos de esta enfermedad son en extremo variables y depende de la especie afectada, sexo, edad, infecciones concomitantes, virus, factores ambientales, etc. (Calnek *et al.*, 2000). Los signos pueden reflejar anormalidades respiratorias, entéricas, reproductivas o del sistema nervioso; los cuales comprenden depresión, disminución de la actividad, menos ingestión de alimento y emaciación, aumento de cloquera en las gallinas y baja de la producción de huevo, los signos respiratorios van de grado leve a intenso y comprenden tos, estornudo, estertores y lagrimeo excesivo, acurrucamiento, plumas erizadas, edema de la cabeza y cara, cianosis de la piel sin plumas, trastornos nerviosos y diarrea; todos estos signos pueden presentarse solos o combinados (Schwartz, 1990).

En algunos casos la enfermedad es rápidamente fulminante y se encuentran las aves muertas sin signos aparentes. De manera similar los virus que son iguales antigénicamente pueden tener características biológicas muy diferentes; uno puede producir una enfermedad grave en una especie dada y una infección inaparente en otra (Tamayo *et al.*, 1997)

Las lesiones que provoca esta enfermedad son muy variables pero se pueden generalizar como lesiones hemorrágicas, congestión y necrosis. Las más importantes son; ausencia de lesiones en los casos de muerte súbita, hemorragias equimóticas, particularmente en la unión de la molleja, erosiones y hemorragias en el epitelio de la molleja, hemorragia en tonsilas cecales, enteritis catarral o fibrinosa , nefritis con congestión severa, congestión grave de musculatura, petequias en el interior del esternón, en la grasa serosa y abdominal, en la superficies serosas de la cavidad corporal, peritonitis fibrosa o producida por la ruptura de óvulos, inflamación de senos orbitarios, exudación mucosa excesiva en el lumen de la traquea o traqueitis hemorrágica grave, traqueitis congestiva, edema con exudado seroso o caseoso en la mucosa de la traquea, hemorragias o degeneración en los ovarios, exudados en los oviductos, sinusitis, edema subcutáneo de la cabeza y cuello, secreciones nasal y oral, congestión grave de la conjuntiva, a veces con petequias, focos hemorrágicos en los tejidos linfoides de la mucosa intestinal. Las lesiones en los pavos son similares a las de las gallinas pero pueden ser menos marcadas. Los patos infectados por IAAP y que excretan el virus pueden no presentar síntomas clínicos ni lesiones (Godoy, 1996).

2.6 Patogenia

Comienza con una infección local en el tracto respiratorio superior, el virus se transmite por vía aérea mediante aerosoles, se reproduce en las células de las vías respiratorias, conduciendo a un rápido desencadenamiento del proceso inflamatorio local que se activa secuencialmente, con una importante secreción de citocinas,

especialmente proinflamatorias, responsables en gran medida del síndrome clínico gripal (Cisterna y Barajas, 2002).

El virus excretado por el animal enfermo penetra por las vías respiratorias superiores y se multiplica rápidamente en las células que infecta, posteriormente se dirige hacia los tramos inferiores de las vías respiratorias e infecta a las células bronquiales, lo que provoca diferentes efectos tales como: destrucción del epitelio ciliado, infección de leucocitos mono y polimorfo nucleares o la sensibilización a las endotoxinas bacterianas. La infección de los epitelios respiratorio y digestivo, en los que se puede observar tapones de exudados seroso o caseoso, se ven los sacos aéreos engrosados y puede haber una enteritis catarral o fibrinosa. En infecciones con virus de alta patogenicidad, después de que el virus se replica en el tracto respiratorio y digestivo, se inicia una viremia que permite al virus viajar e infectar a todas las células del huésped (Leonart *et al.*, 1991)

Debido a la gran variedad de signos que se pueden presentar en la IA, es necesario hacer notar que existen otras enfermedades que presentan algunos signos que son muy similares a esta, por lo que hay que realizar pruebas para la diferenciación con enfermedades como cólera aviar agudo, newcastle en la presentación velogénica, cabeza hinchada, laringotraqueitis infecciosa, bronquitis infecciosa o reacción postvacunal. Para esto se cuenta con una gran gama de pruebas que se pueden realizar para su identificación como son la inhibición de hemaglutinina, por medio de cultivo, aislamiento del virus en embrión de pollo, inmunofluorescencia y ELISA (Calnek *et al.*, 2000)

2.7 importancia a nivel mundial

El movimiento del virus de la influenza aviar ha cambiado su ritmo de expansión tradicional, se ha adaptado al ritmo de nuestra época, teniendo el potencial de ser transportado por personas, aviones, equipos biológicos, huevos y producto elaborado fresco, todo de manera muy rápida, haciendo que de esta manera, los virus de alta y baja patogenicidad, incrementen su presencia y su virulencia en la industria avícola, debido al intercambio comercial que existen entre los países, resultado de los tratados de libre comercio entre bloques de países no necesariamente vecinos e igualmente a causa de la globalización económica y cultural del mundo y a la intensa movilización de productos avícolas gracias a los modernos y rápidos medios de transporte, así como el desplazamiento de millones de personas. Lo anterior puede tener como consecuencia, grandes pérdidas económicas para el país o región afectada por la IA, debido a las limitaciones que esto ocasionaría para la movilización de sus productos avícolas a nivel nacional e internacional (Shane, 1997).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Ubicación geográfica

El estudio se realizó dentro de los límites que comprenden la Región Lagunera, localizada en la latitud 26° 23' N y la longitud 104° 47' 0, tomando en cuenta los municipios de Torreón, Coahuila, Gómez Palacio y Ciudad Lerdo, Durango, que se encuentran consideradas como las ciudades más importantes dentro de esta área. Las muestras fueron tomadas en aves de granjas tecnificadas que están dentro de las demarcaciones de los municipios antes mencionados con el fin de determinar si las aves presentan el virus de la Influenza Aviar.

3.2 Normas para la toma de muestras

La Influenza Aviar es una enfermedad de reporte obligatoria, y se encuentra regida por la NORMA Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, "Campaña Nacional Contra la Influenza Aviar". La cual exige realizar cuando menos dos muestreos por año y las muestras deben ser recolectadas para su envío y análisis al laboratorio de tres formas, para pruebas serológicas se pueden obtener sueros, por medio de tubos de ensayo o a través de papel filtro y para la realización de aislamiento viral se toman órganos y/o hisopos con muestras traqueales o cloacales.

3.3 Procedimiento para la toma de muestras de aves con papel filtro

3.3.1 Consideraciones generales para el sangrado de las aves

Para la realización de este trabajo se optó por la toma de sangre completa a través del papel filtro, y realizar la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, ya que es una forma más rápida y segura que por medio de tubos de ensayo, la cual se describe más adelante.

En muchas ocasiones, se requiere muestras para llevar a cabo pruebas serológicas o hematológicas, por lo que, es necesario obtener muestras de sangre. Para seleccionar la técnica más adecuada en un caso particular, se debe tener en cuenta:

- Edad de las aves.
- Volumen de sangre requerido.
- Destino posterior del ave, dentro del cual puede contraerse reingreso a la parvada, conservación de aquella para obtener muestras subsecuentes o sacrificio inmediato.

3.4 Técnicas para la punción de la vena braquial

Estas técnicas se emplean rutinariamente en parvadas de traspatio, para detectar rectoras positivas a Influenza Aviar. Se basa en una

prueba de inhibición de la hemoaglutinación con suero, se requiere de una gota de sangre impregnada en una tira de papel filtro.

Para poder observar la vena braquial, es necesario retirar algunas plumas de la superficie ventral de la región del ala. La vena corre a lo largo de la depresión entre músculos, el bíceps braquial y el tríceps humeral.

Una vez localizada la vena, se punciona con una lanceta, inmediatamente brota una gota de sangre, la cual se recoge con una tira de papel filtro. Por lo general, la punción se realiza en el nivel de la articulación humeroradiocubital.

3.5 Selección de las aves a muestrear

Se efectuar el muestreo serológico de acuerdo a la normatividad establecida por la Dirección General de Salud Animal, Dirección de Campañas Zoonosanitarias.

3.6 Extracción de muestras

- Las muestras se obtienen en una tira de papel filtro de 5 cm de largo por 0.5 cm de ancho. Estas medidas y el tipo de papel son específicas para lograr la concentración de sangre adecuada y poder realizar las pruebas de inhibición de hemoaglutinación en el laboratorio.
- Se debe escribir con lápiz el número de muestra correspondiente abarcando solo un centímetro del extremo de cada tira de papel filtro utilizado.

- Una persona sujeta al ave por la parte dorsal y con los dedos índice y pulgar, deberá presionar la vena braquial con la superficie ventral de la región del ala.
- Con una lanceta estéril se hace una punción en la vena braquial.
- Se toma la tira de papel filtro por el extremo donde se encuentra la identificación un 1 cm aproximadamente y se coloca sobre la gota de sangre moviéndose o recorriéndose para que la tira de papel filtro quede impregnada en ambos lados, tanto en lo ancho como a lo largo cubriendo los 4 cm de la tira.
- No importa que la sangre se difunda hasta el número de identificación, ya que esta fue identificada con lápiz, no se borra y la muestra se trabaja de la línea a la punta contraria, donde fue colocada el número de identificación. Se deberá marcar con número progresivo a cada una de las aves del predio que se le tome la muestra. La anterior, permite identificar individualmente a cada ave, el número deberá coincidir con el papel filtro de la muestra.
- Secar la tira de papel filtro al aire libre, agitándolo suavemente, hasta que no manche al contacto con la mano o los dedos.
- Colocar las tiras de papel filtro sobre una hoja de papel e ir doblando en pliegues cada vez que se haya formado una nueva hilera de muestras. De tal forma, que la hoja queda doblada conteniendo las muestras en cada pliegue que puede ser de tres a cuatro por cada hoja.

3.7 Forma de envío

- Las tiras de papel filtro ya impregnadas e identificadas, se ponen en un sobre pequeño para cada predio, el cual a su vez, se

introduce en otro sobre bolsa tamaño carta de papel mas grueso para ser enviados.

- Las muestras deben estar perfectamente secas, o bien, las muestras colocadas en las hojas dobladas podrán ser introducidas en los sobres para su envío.
- El sobre o los sobres introducidos en otros sobre para su envío al: LABORATORIO DE LA C.P.A EN LA CIUDAD DE MÉXICO.

Para el análisis de las pruebas se debe realizar una prueba de inhibición de la hemoaglutinación en los laboratorios de la C.P.A, CENASA o los laboratorios aprobados por SAGARPA.

La prueba de laboratorio se describe a continuación:

La inhibición de la hemaglutinación, es la interacción de anticuerpos específicos con la hemaglutinina homologa del virus de la Influenza Aviar evitando la aglutinación de los eritrocitos del pollo. La detección de anticuerpos contra el virus de la IA en las aves, es un indicador confiable de que las aves han sido expuestas a antígenos propios del virus, ya sea mediante de infección natural o promedios artificiales a través de la vacunación. La técnica de inhibición de la hemaglutinación permite detectar la presencia de anticuerpos contra el virus de IA en el suero de aves expuestas y se deben realizar con 4 unidades hemaglutinantes (UHA) del antígeno viral, utilizando exclusivamente las técnicas y los reactivos de diagnósticos autorizados por la SAGARPA.

3.8 Equipo, instrumentos, reactivos y condiciones ambientales requeridas para el diagnóstico

3.8.1 Equipo e instrumentos

Agitador para microplacas, Lector para microplacas, potenciómetro, contenedores para reactivos, jeringas de 5 y 10 ml, Microplacas con fondo de "V", puntas para micropipeta, Micropipeta multicanal con volumen ajustable de 25 a 50 microlitros, centrifuga clínica, Tubos de centrifuga.

3.8.2 Reactivos

1. Preparación de la solución salina fosfatada (PBS) pH 7.2 a 7.4

Solución madre: KH_2PO_4 anhidro 0.15 M 3.25 g, NaH_2PO_4 anhidro 0.15 M 10.8 g, NaCl 170 g, Agua destilada (c.b.p) 1000ml.

Solución de trabajo: preparar una disolución 1:20 de la siguiente manera: 50 ml de solución madre mas 950 ml de agua, destilada y ajustar a un pH de 7.2 a 7.4 con NaOH al 2% en agua destilada.

2. Diluyente para el antígeno: se emplee la solución de trabajo adicionada con 0.02% de albúmina serica bovina.

3. Anticoagulante de Alseaver para la muestra de sangre de pollo de donde se obtendrán los eritrocitos utilizados en la prueba: dextrosa

20.5 g, citrato de sodio 8.8 g, Acido cítrico 0.55 g, Cloruro de sodio 4.2g.

Agua destilada 1000 ml. Esterilizar en autoclave 100°C, 15 minutos y posteriormente almacenar en refrigeración a 4°C a hasta su uso.

4. Eritrocitos de pollo lavados a una concentración final de 1% en PBS, los cuales se deben procesar de la siguiente manera.

a) Se colecta una muestra de pollo sano con el anticoagulante de Alseaver (v/v).

b) Se lava los eritrocitos en un tubo para centrifuga colocando un volumen de sangre con Alseaver llenando el tubo con PBS.

c) Invertir el tubo varias veces para suspender perfectamente los eritrocitos.

d) Centrifugar la sangre a 500 g durante 5 minutos.

e) Eliminar el sobre nadante y la capa de leucocitos (capa blanca).

f) Llenar nuevamente el tubo con PBS.

g) Repetir el ciclo de lavado y centrifugar 2 veces mas, posteriormente, diluir los eritrocitos a una concentración final de 1% (v/v) en PBS.

5. El suero testigo positivo contra el subtipo H5N2 del virus de IA será proporcionado por la CPA.

6. Antígeno viral (H5N2) inactivado, será proporcionado por la CPA.

7. dentro de las condiciones ambientales del laboratorio debe existir una temperatura de 18 a 20 grados centígrados para su operación.

3.9 Titulación del antígeno

- Colocar 25 microlitros de diluyente para el virus en cada uno de los 12 pozos en 2 filas de una microplaca de poliestireno de fondo en “V”.

- Agregar 25 microlitros de antígeno en el primer pozo de cada fila.

- Utilizando micropipeta de 25 microlitros, hacer diluciones logarítmicas base 2 seriadas de 1:2 a 1:1024 del antígeno, dejando los dos últimos pozos de cada fila sin antígeno para que sirva como control de eritrocitos.

- Agregar otros 25 microlitros de PBS en cada pozo.

- Agregar 25 microlitros de la suspensión de eritrocitos de pollo al 1% en PBS a cada pozo y agitar la microplaca para mezclar los reactivos.

- Cubrir la microplaca e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Realizar la lectura hasta que se forme un botón bien delimitado en el fondo de los pozos para control de eritrocitos.
- Interpretación de la titulación del antígeno: El punto final de la titulación de antígeno es la dilución más alta del antígeno en la que se observe el 100% de hemaglutinación. Se considera que en esta dilución existe una unidad hemaglutinante (UHA). La dilución conteniendo las HUA deseadas del antígeno, se determina dividiendo el punto final de la hemaglutinación entre 4 para obtener 4 UHA en 25 microlitros de suspensión del antígeno.

3.10 Procedimiento de la prueba de inhibición de la hemaglutinación

a) Preparación y acondicionamiento de la muestra:

- Identificar con exactitud las muestras de suero y/o papel filtro a analizar.
- En el caso de las muestras de sangre embebida en papel filtro se debe colocar una tira de papel filtro Whatman 41 o su equivalente y adicionar 40 microlitros de PBS y7 mantener en agitación durante una hora.

b) Procedimiento de la prueba. En esta prueba las muestras serán analizadas en diluciones de 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16, par identificar las muestras positivas.

- Colocar en una microplaca en forma de "V", 25 microlitros de PBS en cada uno de los 96 pozos.

- Con una micropipeta, transferir 25 microlitros de cada una de las muestras de suero o de las muestras de papel filtro previamente resuspendido, a la primera línea de pozos de la microplaca, en el orden en las que las muestras han sido identificadas.

- Mezclar las muestras de suero y PBS y hacer 4 diluciones dobles seriadas de 1:2 hasta 1:16 con un volumen de 25 microlitros, descartando los últimos 25 microlitros de la dilución 1:16.

- En cada prueba se coloca control de eritrocitos con 25 microlitros de eritrocitos al 1% y 50 microlitros de PBS.

- En cada prueba se debe colocar un suero testigo positivo a la presencia de anticuerpos contra el virus de IA con un título previamente determinado, así como un suero testigo negativo que no posea anticuerpos contra ningún virus IA, ambos diluidos de manera similar a los sueros a analizar en la prueba.

- Una vez ejecutadas las diluciones, agregar 25 microlitros del antígeno de IA previamente ajustado a 4 UHA en 25 microlitros.

- Cubrir la placa, agitarla gentilmente e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

- Agregar 25 microlitros de la suspensión de eritrocitos al 1% a cada uno de los pozos.
- Cubrir la placa, agitarla gentilmente e incubar a temperatura ambiente hasta que los eritrocitos testigos se sedimenten para formar un botón bien delimitado (30 a 45 minutos).
- Leer y registrar los resultados como hemaglutinación o inhibición de la hemaglutinación en cada uno de los pozos. Los pozos que se observen con aspecto similar al control de eritrocitos (que contiene 25 microlitros de eritrocitos y 50 microlitros de PBS), deben ser considerados como una reacción de inhibición de la hemaglutinación.
- Para la validación de la prueba, los resultados del suero testigo negativo no deben tener un título mayor a 1:4 ($>2^2$ o \log_2) de IH, mientras que el suero testigo positivo debe tener un título similar previamente establecido o tener un título con una diferencia no mayor a una dilución (lóg. base 2) de título previamente establecido.

3.11 Interpretación de los resultados

Se consideran positivos los sueros que produzcan inhibición de la hemaglutinación franca de una dilución 1:10. Se deberá efectuar la titulación de las muestras que resulten positivas en la prueba para determinar el punto final de la reacción de inhibición de la hemaglutinación, realizando la prueba nuevamente con un número mayor de diluciones dobles seriadas (lóg. base 2).

Se considera sospechosos los sueros que produzcan inhibición de la hemaglutinación franca en la dilución 1:10 (23 o lóg. 23).

Se considera negativos los sueros que no produzcan inhibición de la hemaglutinación o que la produzcan en diluciones iguales o menores a 1:4 (>22 o lóg. 2). La sensibilidad de la prueba de IH es de 80%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se realizó un monitoreo en aves de granjas de reproductoras pesadas, postura comercial, pollo de engorda y crianza en la Región Lagunera de Coahuila y Durango para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Influenza Aviar por medio de la técnica de la hemaglutinación.

Durante el proceso del trabajo de campo se realizaron muestreos en las granjas que corresponden a los municipios de Torreón Coahuila, Gómez Palacio y Cd. Lerdo, Durango. Se recolectaron en el mes de abril del 2007, un total de 13,475 muestras de sueros y un total de 2,750 de hisopos traqueales y cloacales.

Todas las muestras fueron analizadas en laboratorio a través de la prueba de inhibición de la hemaglutinación.

Todas las muestras fueron consideradas como negativas al virus de la Influenza Aviar.

Con el resultado obtenido de este trabajo, se confirma que las aves que se encuentran en las granjas tecnificadas de Torreón Coahuila; Gómez Palacio y Cd. Lerdo, Durango se encuentran libres del virus de la Influenza Aviar.

VI. LITERATURA CITADA

Báez J. 1994. Patología de las aves. Editorial Trillas. Pp.9–14

Calnek B. W., H. J. Barnes, C. W. Beard, L.R. Mcdougald, M. Saif. 2000. Enfermedades de las aves. Segunda edición. Editorial Manual Moderno. pp. 597–614.

Calnek B. W., H. J. Barnes, C. W. Beard, W.M. Reid , H. W. Yoder Jr. 1995. Diseases of poultry. Novena Edición. Iowa state university press. Ames, Iowa, USA. pp 532–551.

Capua I., F. Mutinelli, M. A. Bozza, C. Terregino and G. Cattoli. 2000. Highly pathogenic avian influenza (H7N1) in ostriches (*Struthio camelus*). Avian Pathology. 29, 643–646.

Cedo R. 2001. Bioseguridad en granjas. Jornadas profesionales de producción de carne de pollo, Arenys de Mar. Selecciones avícolas: 100–102.

Cisterna R. y M. Barajas. 2002. Patogenia del virus gripal en el tracto respiratorio. Vacunas; 3 (supl 1) 5–8.

Cox N. J. y K. Subbarao. 2000. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu. Rev. Med.* 51: 407–421.

Eckroade R. J. y S.A. Davison. 1990. Influenza: epidemiología e impacto sobre la industria avícola mundial. *Memorias del VI seminario internacional de patología aviar.* Athens Georgia. pp. 261–274.

García G. J., A. P. Medina, M. D. Sarfati, P. E. Soto, D. B. Lozano. 2002. Impacto económico y riesgo sanitario de un país por Influenza Aviar. *Actualizaciones sobre Influenza Aviar.* pp. 89–95.

Godoy V. O. 1996. Bioseguridad aviar. Examen de calidad profesional en medicina veterinaria y zootecnia. *Material de estudios: Área aves.* pp. 187–192.

Gurria T. F. 2000. Situación de la Influenza Aviar en México. *XXV Convención anual ANECA.* pp. 91–95.

Hernández M. A., A. T. Casaubon, G. J. García. 2000. Patogenia del virus de Influenza Aviar (H5N2) altamente patógeno en aves susceptibles y en aves inmunizadas. *XX Convención anual ANECA.* pp. 102–113.

Jordan F. T. y M. Pattison. 1998. *Enfermedades de las aves.* Tercera edición. Editorial Manual Moderno. pp. 151–159.

Lleonart F., E. Roca, M. Callis, A. Gurrit, M. Pontes. 1991. *Higiene y patología aviares.* Real escuela de avicultura, España. pp. 149–154.

Meede S. L., R. M. Ceniceros, I. G. Tellez. 2001 Influenza Aviar en México: Estudio recapitulatorio. XXVI Convención anual ANECA. pp. 57–61.

Norma oficial mexicana de emergencia NOM-EM-016-ZOO-2002. Campaña nacional contra la Influenza Aviar. 1995.

Norma oficial mexicana NOM-044-ZOO-1995. Campaña nacional contra la influenza Aviar.

Norma oficial mexicana NOM-056-ZOO-1995. Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobadas en materia zoosanitaria-influenza Aviar.

Office Internacional des Epizzoties (OIE) 2004. Influenza Aviar, Informes sanitarias. 17 de diciembre de 2004. Vol. 17- N° 51.

(http://www.oie.int/esp/info//hebdo/EIS_14.HTM)

Pearson J. E. 1994. Criterio para la caracterización del virus de la Influenza Aviar para toma de acciones reguladoras. Curso de actualización sobre Influenza Aviar. ANECA. pp. 29–34.

Rivera C. E. 2001. La influenza en el hombre y en los animales. XXVI Convención anual ANECA. pp. 278–281.

Schwartz, L. D. 1990. Manual de sanidad animal. Editorial Unión Tipográfica hispano-Americano S.A. de C.V. pp. 37–38.

Shane S. 1997. Situación actual de la Influenza Aviar en el mundo. Memorias del séptimo curso de actualización sobre Influenza Aviar y hepatitis por cuerpos de inclusión. AVIMEX, ANECA. pp. 60–69.

Tamayo M., M. V. Pérez, M. Galván. 1997 Influenza Aviar. IV seminario internacional de patología y producción aviar. AMEVEA. Pp. 76–81.

Vui T. Q., J. E. Lohr, M. N. Kyule, K. H. Zessin and M.P. O. Baumann. 2002 Antibody Levels Against Newcastle Disease Virus, Infectious Bursal disease Virus and Avian Influenza Virus in Rural Chickens in Viet Nam. International Journal of Poultry Science 1 (5): 127–132.