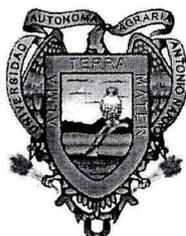


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**MUESTREO DE AVES DE TRASPATIO PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA
INFLUENZA AVIAR EN LA REGIÓN LAGUNERA DE
COAHUILA-DURANGO**

POR

JUAN FRANCISCO NUÑEZ ESTRADA

TESIS

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

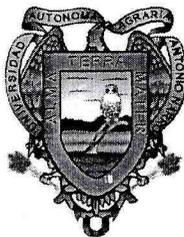
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México.

Octubre de 2005.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA



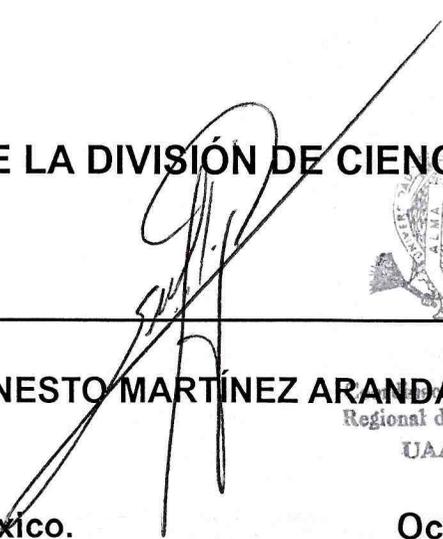
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**MUESTREO DE AVES DE TRASPATIO PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA
INFLUENZA AVIAR EN LA REGIÓN LAGUNERA DE
COAHUILA-DURANGO**

POR

JUAN FRANCISCO NUÑEZ ESTRADA

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

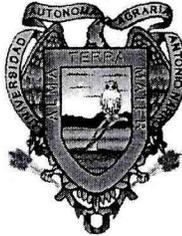

M. C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA de la División
Regional de Ciencia Animal
UAAAN - UL

Torreón, Coahuila, México.

Octubre de 2005.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA



DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**MUESTREO DE AVES DE TRASPATIO PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA
INFLUENZA AVIAR EN LA REGIÓN LAGUNERA DE
COAHUILA-DURANGO**

POR:

JUAN FRANCISCO NUÑEZ ESTRADA

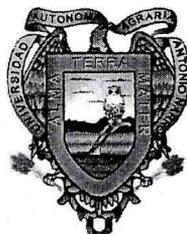
ASESOR PRINCIPAL

M. C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



PRESIDENTE DE JURADO

M. C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

VOCAL

M. V. Z. JOSÉ LUIS GUERMES JIMÉNEZ

VOCAL

M. C. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS

VOCAL SUPLENTE

M. C. SERGIO IGNACIO BARRAZA ARAIZA

Torreón, Coahuila, México.

Octubre de 2005.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por darme la vida a través de mis padres y la oportunidad de salir adelante en mis metas ya que sin ÉL no hubiese podido lograr mis propósitos.

A MI ALMA MATER

Por darme la oportunidad de haber permanecido en sus instalaciones durante este tiempo y donde obtuve los conocimientos necesarios para realizarme como persona y principalmente como 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 Luis Güemes Jiménez, por su gran apoyo brindado para la elaboración de esta tesis, sobre todo por su gran amistad y grandes consejos.

M. C. José Luis Francisco Sandoval Elías, por brindarme la oportunidad para desarrollarme en su grupo, además por su enseñanza y amistad.

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

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Roger Nuñez Ramírez
Rita Estrada Madariaga

Por los consejos y por su incondicional apoyo que siempre me han brindado, por darme los conocimientos básicos de la vida que me han llevado hasta esta instancia.

A MIS HERMANOS

Luis Daniel Nuñez Estrada
Roger Nuñez Estrada
Lesvia María Nuñez Estrada

A MIS CUÑADOS

Josefa Ruiz Pinacho
María Douglas Saldaña Montejo
Martín Alfaro Cruz

Por su gran apoyo moral que siempre me dio aminos para seguir adelante con mis estudios.

A MIS SOBRINAS

Jessica Samantha Nuñez Ruiz
Kristel Yanet Nuñez Ruiz
Karen Paola Alfaro Nuñez
Ana Cristina Nuñez Saldaña

Que con su inocencia siempre supieron darme la alegría y fuerzas para continuar adelante.

RESUMEN

Se realizó un monitoreo en aves de traspatio para verificar si estas eran portadoras del virus de la Influenza Aviar y ser posible fuente de infección para las aves en granja. El estudio se realizó en las comunidades ejidales de los municipios de Torreón, Coahuila, Gómez Palacio y Cd. Lerdo, Durango que forman parte de la Región Lagunera, las muestras fueron obtenidas a través de la punción de la vena braquial en el ala y recolectadas en papel filtro para su posterior análisis de laboratorio por medio de la prueba de Inhibición de la Hemaglutinina (IH), se tomaron un total de 2,810 muestras divididas en dos partes, la primera constó de 1450 muestras realizadas entre los meses de agosto-noviembre de 2004 y la segunda se realizó durante los de meses febrero-mayo de 2005 con un total de 1,360 muestras. Las muestras fueron tomadas en los tres municipios con un resultado total de 600 muestras provenientes de Torreón, Coahuila, 1,310 y 900 muestras tomadas en Gómez Palacio y Cd. Lerdo, Durango respectivamente. Los datos obtenidos en este estudio por medio de la prueba de Inhibición de la Hemaglutinacion fueron negativos en todas las muestras, lo que indica en este estudio que las aves de traspatio en la región de estudio no son consideradas como posible fuente de infección de Influenza Aviar para las granjas avícolas.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
RESUMEN	iii
I/ INTRODUCCIÓN	1
II/ REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Antecedentes de la enfermedad	3
2.2 Descripción del virus	5
2.3 Clasificación de la cepa	6
2.3.1 Clasificación del virus de acuerdo a su base hemaglutinina y neurominidasa	6
2.3.2 Clasificación del virus de acuerdo con su patogenicidad	7
2.4 Transmisión del virus	8
2.5 Signos clínicos de la enfermedad	9
2.6 Patogenia	11
2.7 Importancia a nivel mundial	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1 Ubicación geográfica	13
3.2 Norma para la toma de muestras	13
3.3 Procedimiento para la toma de muestras de aves con papel filtro	13
3.3.1 Consideraciones generales para el sangrado de aves	13
3.4 Técnicas para la punción de la vena braquial	14
3.5 Selección de las aves a muestrear	14
3.6 Extracción de las muestras	15

3.7 Forma de envío	16
3.8 Equipo, instrumentos, reactivos y condiciones ambientales requeridos para el diagnóstico	17
3.8.1 Equipo e instrumentos	17
3.8.2 Reactivos	17
3.9 Titulación del antígeno	19
3.10 Procedimiento de la prueba de inhibición de la hemaglutinación	20
3.11 Interpretación de los resultados	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
V. ✓ CONCLUSIONE Y RECOMENDACIONES	25
VI. ✓ LITERATURA CITADA	26

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Brotes documentados causados por virus altamente patógeno de IA, reportados desde la identificación del agente causal de Influenza Aviar de 1995-2004	4
--	---

I. INTRODUCCIÓN

La Influenza Aviar es una enfermedad que se presenta en las aves silvestres y domésticas, 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 de la lista A de la OIE (OIE, 2004)

Es causada por un virus de la familia *Orthomyxoviridae*, su forma de presentación es de dos formas: una de baja patogenicidad y la altamente patógena; la primera se presenta con algunos signos respiratorios leves y poca mortandad, y la segunda se presenta con signos digestivos y nerviosos graves, pudiendo llevar al 100% de mortalidad. La patogenicidad del virus se establece en base a los antígenos de superficie de hemaglutinina (HA) y neuroamidasa (NA). De estas 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. La Influenza Aviar ha sido reportada en varias partes del mundo, el primer caso descrito de esta enfermedad fue realizada por el científico italiano Edoardo Perroncito en 1878, en Turín, Italia. Se han tenido reportes de brotes en Alemania, Irlanda, África del Sur, Hungría, Corea, China, Hong Kong, Irán, Pakistán, Estados Unidos, Australia y países del medio oriente y 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 serológicamente negativos las parvadas del sur y norte del país (Gurria, 2000)

Esta enfermedad ha adquirido gran importancia en México por el gran impacto que ha representado en la industria avícola, en el modo en que se han incrementado el desplazamiento las aves, ya que la forma anterior de infección de aves silvestres a las domesticas ha cambiado en esta época, como por ejemplo por huevos contaminados, personas, aviones, equipos, biológicos, etc. (Cedo, 2001)

En la región lagunera la explotación avícola es de suma importancia ya que se cuenta con grandes granjas tecnificadas y por ello la importancia de mantener libre de Influenza Aviar a esta zona, por ello la importancia de mantener libres a las aves de traspatio porque pueden ser fuente de infección para las granjas. Se han realizado muestreos serológicos para la identificación de virus de la Influenza Aviar, y los resultados han sido negativos, por lo que se ha mantenido el estatus libre en la región lagunera.

Para esto se realizará un monitoreo en aves de traspatio en las comunidades ejidales de los municipios de Torreón, Coahuila, Gómez Palacio y Cd Lerdo, Durango, con el fin de descartar que estas aves sean una posible fuente de infección de la Influenza Aviar para las aves que se encuentran en las granjas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

La Influenza Aviar es un modelo de enfermedad de 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 de 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 lo describe como una septicemia en pollos que no era causada por bacterias y la denomina "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 ultrafiltrados obtenidos de aves muertas. No fue si no 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 sé diagnóstico 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 ha tenido que lidiar con este virus, en especial en los lugares donde se tienen grandes cantidades de aves para producción pero se han reportado casos de aislamientos de virus de la Influenza Aviar (IA), altamente patógenos desde 1959, algunos países donde se han reportado casos son: Escocia, Inglaterra, 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 identificó como IA con antígenos de superficie H5N2, en ese momento se clasificó como de baja patogenicidad y se determinó que se encontraban parvadas de 11 Estados del centro del país, los Estados del sur y del norte resultaron serológicamente negativos (Jordan y Pattison, 1998)

Cuadro 1. Brotes documentados causados por virus altamente patógenos de IA, reportados desde la identificación del agente causal de Influenza Aviar de 1955-2004 (OIE, 2004)

Virus de la Influenza Aviar	Subtipo	País
Pollos/Escocia/55	H5N1	Escocia
Golondrina de mar/África del sur/61	H5N3	África del sur
Pavos/Ontario/66	H7N3	Canadá
Pollos/Victoria/76	H7N7	Australia
Pollos/Alemania/79	H7N7	Alemania
Pavos/Inglaterra/79	H7N7	Inglaterra
Pollos/Pennsylvania/83	H5N2	EE UU
Pavos/Irlanda/83	H5N8	Irlanda
Pollos/Victoria/85	H7N7	Australia
Pollos/Inglaterra/91	H5N1	Inglaterra
Pollos/Victoria/92	H7N3	Australia
Pollos/Puebla/94	H5N2	México
Pollos/Queretaro/95	H5N2	México
Pollos/Queensland/95	H7N3	Australia
Pollos/Pakistan/95	H7N3	Pakistan
Pollos/Hong Kong/97	H5N1	China
Pollos/New South Wales	H7N4	Australia
Pollos/Italia/97	H5N2	Italia

Pavos/Italia/99	H7N1	Italia
Pollos/Chile/2000	H7N3	Chile
Pollos/Netherlands/2003	H7N7	Países bajos
Pollos/Korea/2003	H5N1	Corea
Pollos/Vietnam/2004	H5N1	Vietnam
Pollos/Japón/2004	H5N2	Japón
Pollos/Tailandia/2004	H5N1	Tailandia
Pollos/Indonesia/2004	H5N1	Indonesia
Pollos/China/2004	H5N1	China
Pollos/Laos/2004	H5N1	Laos
Pollos/Texas/2004	H5N2	EE UU
Pollos/Canadá/2004	H7N3	Canadá
Pollos/Pakistán/2004	H7N9	Pakistán

2.2 Descripción del virus

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

El virus de IA son virus con ARN, pleomórficos 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 está incluida la nucleocapside helicoidal; contiene proyecciones de glucoproteínas de la envoltura que tienen 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 virión puede romperse con detergentes, liberando las espigas que retienen sus actividades respectivas. La HA es causante de la fijación del virión a los receptores de la superficie celular y de la actividad hemoaglutinante de los virus. Los anticuerpos contra la HA son muy importantes en la neutralización del 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 infectadas (Cisterna y Barajas, 2002)

2.3 Clasificación de la cepa

2.3.1 Clasificación del virus de acuerdo a su base hemaglutinina y neurominidasa

Esta clasificación se basa en el subtipo de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). En la actualidad existen 15 HA y 9 NA, las cuales se han identificado en varias combinaciones en aislamientos aviáres. 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 la neuraminidasa (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 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 mortalidad que se presente en un brote de IA, esta se divide en Influenza Aviar de alta patogenicidad e 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 la secuencia 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 el que el rompimiento de la HA1, se sustituye por otro sin esa capacidad. El otro cambio que ocurre en la estructura molecular del sitio del rompimiento con cambio en que los aminoácidos de esta región se sustituye por aminoácidos básicos, el rompimiento de las cadenas se debe a la acción de las enzimas proteolíticas del tipo de la tripsina que se encuentran 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 neuramínico, 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 del huésped, la susceptibilidad de la hemaglutinina a estas proteasas, depende directamente del número de aminoácidos básicos 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 fomites 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 material fecal, por ejemplo, aves y mamíferos, alimentos, agua, equipo, jaulas, ropas, vehículos de entrega, insectos, etc. 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 tiene éxito incluyen el aerosol, intranasal, intratraqueal, oral, conjuntival, intramuscular, intraperitoneal, intracaudal del saco aéreo, intravenosa, cloacal e intracraneal (Hernández *et al.*, 2000)

Parte de la evidencia implica a las aves silvestres como fuente circunstancial, y esta causa es suficiente para ver a estas aves como fuente real. Se ha considerado importante también a las aves silvestres de los problemas de influenza en las focas, ya que éstas y dichas aves 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 la superficie 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 postinfección, contenían el virus (Eckroade y Davison, 1990)

El período de incubación transcurre desde la infección hasta la presentación de signos clínicos, ésta 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 dependen 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, pluma erizada, edema de cabeza y cara, cianosis e la piel sin plumas trastornos nerviosos y diarrea; todos estos signos pueden presentarse solo o combinadas (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 de hemorragia, congestión y necrosis. Las más importantes son, ausencia 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 de 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 las superficie serosas d la cavidad corporal, peritonitis fibrinosa o producida por la ruptura de óvulos, inflamación de senos orbitarios, exudación mucosa excesiva en el lumen de la tráquea o traqueitis hemorrágica grave, traqueitis congestiva, edema con exudado seroso o caseoso en la mucosa de la tráquea, 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 al de las gallinas pero pueden ser menos marcadas. Los patos infectados por IAAP y que excretan el virus pueden no presentar síntoma clínico ni lesión (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 células bronquiales y lo que provoca diferentes efectos tales como: efecto destructor sobre el epitelio ciliado, infección de leucocitos mono y polimorfonucleares o la sensibilización a las endotoxinas bacterianas. La infección del epitelio respiratorio y digestivo en que se puede observar edema de la traquea, en infecciones secuenciales con otros microorganismos, se observan 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 le 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 ésta por lo que hay que realizar pruebas para la diferenciación contra 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, poniendo de esta manera, que 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. El cual puede traer como consecuencia si se llegara a presentar la IA debido a todo esto, grandes pérdidas económicas para el país o región afectada por las limitaciones que esto ocasionaría para la movilización de sus productos avícolas a nivel nacional como internacional (Shane, 1997)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación geográfica

El estudio se realizó dentro de los límites que comprende la Región lagunera, localizada latitud 26° 23' N y longitud 104° 47' O, 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 determinada. Las muestras fueron tomadas en las aves de traspatio, en los ejidos que están dentro de las demarcaciones de los municipios antes mencionados. Con el fin de determinar si las aves presentaban anticuerpos contra la Influenza Aviar.

3.2 Norma para la toma de muestras

La Influenza Aviar es una enfermedad de reporte obligatoria, y se encuentra regido 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 en aves de traspatio, y las muestras debe ser recolectadas para su envío y análisis en el laboratorio de tres formas, para pruebas serológicas se pueden obtener sangre completa, por medio de tubos de ensaye o a través de papel filtro y para la realización de aislamiento viral se toman 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 ensaye, la cual se describe más adelante.

En muchas ocasiones, se requieren 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 .
- Volumen de sangre requerido.
- Destino posterior del ave, entre el 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

Esta técnica se emplea rutinariamente en parvadas de traspatio, para detectar reactoras positivas a Influenza Aviar. Se basa en una prueba de inhibición de la aglutinación 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 efectuará el muestreo serológico de acuerdo a la normatividad establecida por la Dirección General de Salud Animal, Dirección de Campañas Zoonositarias.

00600

3.6 Extracción de las 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 la hemoaglutinación en el laboratorio.
- Se debe escribir con lápiz el número de muestra correspondiente abarcando sólo 1 cm 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 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 ésta fue identificada con lápiz, no se borra y la muestra se trabaja de la línea a la punta contraria, donde fue colocado el número de identificación. Se deberá marcar con número progresivo a cada una de las aves del predio que se le tome la muestra. Lo anterior, permite identificar individualmente a cada ave, el número deberá coincidir con el del 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 dedos.
- Colocar las tiras de papel filtro sobre una hoja de papel e ir doblándola en pliegues cada vez que se haya formado una nueva hilera de muestras. De tal forma, que la hoja quede doblada conteniendo las muestras en cada pliegue que pueden 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 más 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 otro sobre de papel 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 CPA, CENASA o los laboratorios aprobados por la SAGARPA. La prueba de laboratorio se describe a continuación.

La inhibición de la hemaglutinación, es la interacción de anticuerpos específicos con la hemaglutinina homóloga del virus de la Influenza Aviar evitando la aglutinación de los eritrocitos de 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 el proceso de infección natural o por medios 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 las aves expuestas y se debe realizar con 4 unidades hemaglutinantes (UHA) del antígeno viral, utilizando exclusivamente las técnicas y los reactivos de diagnóstico 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 en "V", Puntas para micropipeta, Micropipeta multicanal con volumen ajustable de 25 a 50 microlitros, Centrífuga 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.) 1000 ml.

Solución de trabajo: Preparar una dilución 1:20 de la siguiente manera: 50 ml de solución madre más 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 emplea la solución de trabajo adicionada con 0.02% de albúmina sérica 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 4.2 g.

Agua destilada 1000 ml. esterilizar en autoclave 100°C, 15 minutos y posteriormente almacenar en refrigeración a 4°C 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 lavan 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 sobrenadante y la capa de leucocitos (capa blanca).

f) Llenar nuevamente el tubo con PBS.

g) Repetir el ciclo de lavado y centrifugación dos veces más. 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 Influenza Aviar 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 sirvan 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 UHA 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 y mantener en agitación durante 1 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, para 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 el que las muestras han sido identificadas.
- Mezclar las muestras de suero y PBS y hacer cuatro 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 de IA, ambos diluidos de manera similar a los sueros a analizar en la prueba.

- Una vez efectuadas 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 un 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 al previamente establecido o tener un título con una diferencia no mayor a una dilución (log base 2) del título previamente establecido.

3.11 Interpretación de los resultados

Se consideran positivos los sueros que produzcan inhibición de la hemaglutinación franca de la 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 (logaritmo base 2).

Se consideran sospechosos los sueros que produzcan inhibición de la hemaglutinación franca en la dilución 1:10 (2^3 o $\log_2 3$).

Se consideran negativos los sueros que no produzcan inhibición de la hemaglutinación o que la produzcan en diluciones iguales o menores a 1:4 ($>2^2$ o $\log_2 2$). La sensibilidad de la prueba de IH es del 80%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó un muestreo en aves de traspatio para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Influenza Aviar en la región lagunera por medio de la técnica de inhibición de la hemaglutinación.

Durante el proceso de trabajo de campo se realizaron muestreos en comunidades ejidales correspondientes a los municipios de Torreón, Coahuila, Gómez Palacio y Cd. Lerdo, Durango; se recolectaron un total de 2,810 muestras, obtenidas en dos partes, la primera se realizó entre los meses de agosto a noviembre de 2004 con un total de 1450 muestras, de las cuales 320 fueron en Torreón, 740 en Gómez Palacio y 390 en Lerdo; el segundo muestreo se realizó durante los meses de febrero a mayo de 2005 con un total de 1,360 muestras, de ellas 280 se recolectaron en Torreón, 570 en Gómez Palacio y 510 en Lerdo.

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

Todas las muestras presentaron inhibición de la hemaglutinación en diluciones menores a 1:4 por lo que 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 de traspatio de las comunidades ejidales de los municipios de Torreón, Coahuila; Gómez Palacio y Cd. Lerdo, Durango se encuentran libres del virus de la Influenza Aviar por lo que se descarta la posibilidad de que estas sean una posible fuente de infección para las granjas avícolas que se localizan en esta región.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en años anteriores, ya que estos monitoreos se han realizado durante cuatro años consecutivos realizados por la asociación de avicultores de la región lagunera sin haberse presentado un caso positivo durante este lapso.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Las aves de traspatio de las comunidades ejidales de Torreón, Coahuila, Gómez Palacio y Cd. Lerdo, Durango se encuentran libres de Influenza Aviar.
- Las muestras solo se enfocaron a las aves de traspatio y no en aves en granja.
- Realizar muestreos para IA en aves silvestres.
- Repetir el muestreo conforme lo establecido a la norma, con respecto a aves de traspatio que se menciona un mínimo de dos veces por año.

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. Bajaras. 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. Materia de estudios: Area 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. Cenicerros, 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.

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 zoonosaria-Influenza Aviar.

Office International des Epizooties (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. Perez, 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.