

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



"SEROPOSITIVIDAD DE INFLUENZA AVIAR EN
GALLINAS PONEDORAS, EN ALLENDE, NUEVO LEÓN,
DE ENERO DE 1995 A DICIEMBRE DE 1996"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ALEJANDRO DAVID LEAL CARDENAS

MONTERREY, N. L.

MARZO DE 1998

TL
SF995
.6
.16
L4
c.1

ALFJANDRO DAVID
LEAL OMERIAS

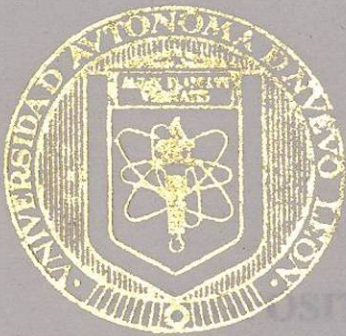
1988



1080098303

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



SEROPOSITIVIDAD DE INFLUENZA AVIAR EN
GALLINAS PONEDORAS, EN ALLENDE, NUEVO LEÓN, DE
ENERO DE 1995 A DICIEMBRE DE 1996

"SEROPOSITIVIDAD DE INFLUENZA AVIAR EN
GALLINAS PONEDORAS, EN ALLENDE, NUEVO LEÓN,
DE ENERO DE 1995 A DICIEMBRE DE 1996"

PRESENTADA POR ALEJANDRO DAVID LEAL CARDENAS
DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNISTA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ALEJANDRO DAVID LEAL CARDENAS



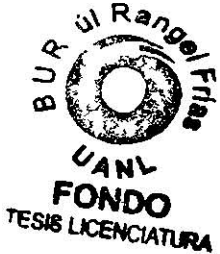
MONTERREY, N. L.

MONTERREY, N. L.

MARZO, 1998

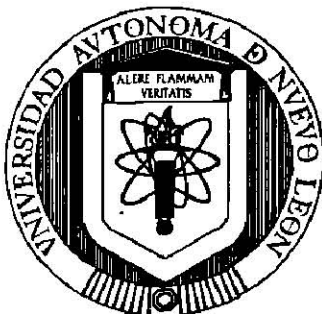
MARZO DE 1998

T
SF 995
.6
I 6
L 4



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**“ SEROPOSITIVIDAD DE INFLUENZA AVIAR EN
GALLINAS PONEDORAS, EN ALLENDE, NUEVO LEON, DE
ENERO DE 1995 A DICIEMBRE DE 1996 ”**

TESIS.

PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO
DE MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PRESENTA:

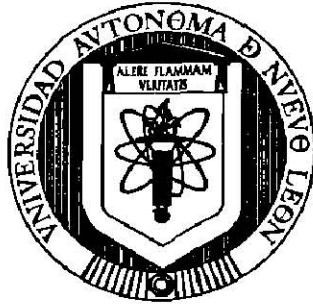
ALEJANDRO DAVID LEAL CARDENAS

MONTERREY, N.L.

MARZO, 1998

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**“ SEROPOSITIVIDAD DE INFLUENZA AVIAR EN
GALLINAS PONEDORAS, EN ALLENDE, NUEVO LEON, DE
ENERO DE 1995 A DICIEMBRE DE 1996 ”**

REVISADA POR:

Dr. VICTOR MANUEL RIOJAS VALDES
ASESOR PRINCIPAL

MVZ. MSP. ALBERTO SANTOYO
CO - ASESOR

MVZ. MC. RAMIRO AVALOS R.
CO - ASESOR

MONTERREY, N.L.

MARZO, 1998

DEDICATORIAS

A DIOS

Por haberme permitido culminar mis estudios profesionales, y por prestarme el don de la vida y la salud, y así poderlas compartir con toda la gente que me rodea, espero seguir contando con ese don por mucho tiempo más.

A MI PADRE

M.V.Z. Oscar Leal Perales E.A. Por ser mi guía los primeros años de mi vida e involucrarme en esta profesión.

A MI MADRE

Sra. María Guadalupe Cárdenas de Leal. Por haberme dado la vida, dedicarme tanto tiempo y así poder seguir su ejemplo de paciencia y rectitud.

A MIS HERMANOS

Lic. Oscar Eduardo Leal Cárdenas. El, ejemplo de hermano mayor quien siempre ha sabido manejar cualquier situación, siempre apoyándome y brindándome una gran amistad y sus valiosos consejos, espero que sigamos juntos por mucho tiempo más.

Arq. Gabriel Leal Cárdenas. Por formar parte de esta familia y por ser como eres.

Erika Guadalupe Leal Cárdenas. Por ser algo especial en esta casa, y compartir algunas de nuestras cosas, contigo y con Oscar la vida es lo mejor que nos pudo haber pasado.

A MIS TIOS

Gracias a todos los hermanos de mi papá y de mi mamá ya que de cada uno de ellos, de su forma de ser y pensar he podido aprender muchas cosas valiosas para esta difícil vida.

A MIS ABUELITOS

Sr. Porfirio Cárdenas Rodríguez y Sra. María de Jesús Rodríguez de Cárdenas. Por todo el cariño que a través de los años me han demostrado.

A la memoria de mi primo *Armando Marroquín Leal.* Quien me enseñó a vivir, querer y disfrutar la vida, ahora desde arriba está viendo lo que depositó en mí.

AGRADECIMIENTOS

A MIS ASESORES

Dr. Víctor M. Riojas Valdés. Por depositar sus valiosos conocimientos, por el tiempo que le dedicó a esta tesis, y por demostrar su gran amistad que es algo aún más importante.

MVZ. MC. Ramiro Avalos. Gracias por su asesoría y los valiosos cambios que le realizó a esta tesis.

MVZ. MSP. Alberto Santoyo de Estéfano. Por su invaluable amistad que siempre me ha demostrado aún antes de entrar a la facultad, el tiempo y sus consejos que me proporcionó desinteresadamente en el transcurso de mi carrera, es algo de mucha importancia.

A todos mis maestros y médicos con el respeto que se merecen.

A todos los Avicultores de Allende, N.L.

MIS AMIGOS:

- *Sr. Efraín Flores Leal*

- *Sr. Federico Díaz de León*

- *Sr. Omar David Flores Saldaña*

Junto con todos mis amigos de la facultad: Ana Flor (Any), Lucila (Lucy), Thelma (Güera), Leobardo García, Rubén Valverde, y toda la generación 92-97. Todos ellos, junto con otros amigos de Allende y de otras partes, con quienes siempre he pasado grandes momentos de felicidad y mutuas muestras de amistad.

A la Sra. Juanita Escamilla de Leal y a toda su familia por su gran cariño que han tenido para conmigo.

Al Sr. Efraín Flores Rodríguez y su familia por siempre demostrarme su amistad y confianza.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de esta tesis

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. JUSTIFICACIÓN.....	4
2.2. OBJETIVOS.....	4
2.3. HIPÓTESIS.....	4
3. ANTECEDENTES.....	5
3.1. HISTORIA.....	5
3.2. INCIDENCIA Y DISTRIBUCIÓN.....	6
3.3. ETIOLOGÍA.....	8
3.3.1. MORFOLOGÍA.....	8
3.3.2. REPLICACIÓN VIRAL.....	9
3.3.3. PROPIEDADES BIOLÓGICAS.....	9
3.3.4. RESISTENCIA.....	10
3.3.5. CLASIFICACIÓN DE LA CEPA.....	10
3.4. HOSPEDEROS DE LABORATORIO.....	11
3.4.1. EMBRIONES DE POLLO.....	11
3.4.2. ANIMALES DE LABORATORIO.....	11
3.5. PATOGENIA Y EPIZOOTIOLOGÍA.....	11
3.5.1. HUÉSPED NATURAL Y EXPERIMENTAL.....	11
3.5.2. TRANSMISIÓN Y PORTADORES.....	12
3.5.3. PERÍODO DE INCUBACIÓN.....	13
3.5.4. PATOGENICIDAD.....	13
3.5.5. SIGNOS.....	13
3.5.6. MORBILIDAD Y MORTALIDAD.....	15
3.5.7. LESIONES.....	15
3.5.8. HISTOPATOLOGÍA.....	16
3.6. DIAGNÓSTICO.....	17
3.6.1. AISLAMIENTO.....	17
3.6.2. IDENTIFICACIÓN.....	18
3.6.3. PCR.....	18
3.6.4. SEROLOGÍA.....	19
3.6.4.1. INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN.....	19
3.6.5. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	20
3.7. PREVENCIÓN Y CONTROL.....	20
3.7.1. PREVENCIÓN.....	20
3.7.2. CONTROL.....	21
3.7.3. TRATAMIENTO.....	21
3.7.4. VACUNAS.....	21
3.7.5. SALUD PÚBLICA.....	22
3.8. INFLUENZA AVIAR EN MÉXICO.....	22
3.8.1. NUEVO LEÓN.....	24
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
4.1. TOMA DE MUESTRAS.....	27
4.2. MÉTODO DE LABORATORIO.....	29

4.3. MATERIAL DE CAMPO	29
4.4. MATERIAL DE LABORATORIO.....	30
4.5. REACTIVOS.....	30
4.6. TITULACIÓN DE ANTÍGENO.....	32
4.7. CONTROL DEL ANTÍGENO.....	33
4.8. PASOS PARA EFECTUAR LA PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (IH).	34
4.9. INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA.....	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1. RELACIÓN ENTRE LA SEROPOSITIVIDAD CONTRA I.A. Y LA CANTIDAD DE GRANJAS POR GRUPO GEOGRÁFICO.....	36
5.2. ANÁLISIS DE LOS CINCO GRUPOS.....	37
5.3. RELACIÓN DE LOS SUEROS POSITIVOS.....	45
5.4. FECHAS DE GRANJAS POSITIVAS.....	45
6. DISCUSIÓN.....	50
7. CONCLUSIONES.....	52
8. BIBLIOGRAFÍA.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Fórmula para calcular los límites de confianza	28
Tabla 2. Relación de la seropositividad contra IA en gallinas del grupo 1	38
Tabla 3. Relación de la seropositividad contra IA en gallinas del grupo 2	39
Tabla 4. Relación de la seropositividad contra IA en gallinas del grupo 3	40
Tabla 5. Relación de la seropositividad contra IA en gallinas del grupo 4	41
Tabla 6. Relación de la seropositividad contra IA en gallinas del grupo 5	42
Tabla 7. Relación del total de seropositividad contra IA en los cinco grupos	42
Tabla 8. Análisis de los límites de confianza	43
Tabla 9. Relación de las muestras positivas	47
Tabla 10. Porcentaje de seropositividad de cada dilución en cada grupo	47
Tabla 11. Relación de las granjas positivas y la fecha de aparición	49

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.- Ubicación geográfica de los cinco grupos	28
Figura 2.- Ej. de una titulación del antígeno.....	32
Figura 3.- Ej. donde se representan las 4 unidades hemoaglutinantes.....	33
Figura 4.- 4 pruebas de IH, 2 negativas (A yB) y 2 positivas en dilución 1:160 (C y D).....	35
Figura 5.- Granjas positivas por grupo.....	44
Figura 6.- Total de los sueros por dilución.....	48

1. RESUMEN

A fines de 1993 y principios de 1994 avicultores y médicos veterinarios especialistas observaron en varias áreas avícolas del país problemas respiratorios atribuidos a: enfermedad de Newcastle, coriza infecciosa, síndrome de la cabeza hinchada, bronquitis infecciosa y otros, sin embargo no se llegó a un diagnóstico conclusivo.

Fue el 23 de mayo de 1994 que se notificó oficialmente la presencia de Influenza Aviar (IA) en México, con el aislamiento de 3 cepas de virus procedentes de granjas avícolas de los estados de Querétaro, Hidalgo y México que fueron tipificados en el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (NVSL), en Ames, Iowa, E.U.A., como H5N2 tipo A; posteriormente las pruebas de patogenicidad demostraron que se trataba de un virus de baja virulencia.

El hallazgo de IA en nuestro país obligó a las autoridades sanitarias en materia veterinaria a efectuar un monitoreo serológico y virológico en todos los estados, para detectar la presencia de este virus; entre junio y diciembre de 1994 se confirmó la presencia de IA de baja patogenicidad, en 11 estados de la República Mexicana.

El 13 de enero de 1995 se identificó un virus de IA pero ahora mutó a un virus de alta patogenicidad en tres granjas de postura comercial de Tehuacán, Puebla; posteriormente se confirma el 20 de enero de 1995 otro aislamiento viral de alta patogenicidad en el municipio de Villa del Marqués, Querétaro.

El presente trabajo se realizó en el municipio de Allende, Nuevo León, y consistió en tomar muestras de sangre al azar a las aves, de 80 granjas de postura comercial, iniciando en enero de 1995 y terminando en diciembre de 1996; durante este lapso se tomaron aproximadamente 3,207 muestras trimestralmente a las 80 granjas. Se tomó una muestra por cada 1,000 aves, y el municipio se dividió en 5 zonas geográficas que contienen cada una, granjas muy próximas entre sí, pero separadas entre las distintas áreas,

posteriormente se enviaron a un laboratorio oficial o aprobado para ser procesadas bajo la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH).

Después de esto el resultado obtenido fué de 31 granjas positivas (38.75 %) y 197 muestras (6.14 %) positivas en distintas diluciones, que abarca de la menor 1:10 hasta 1:640, las aves con serología positiva no mostraron algún signo o lesión de esta enfermedad, por lo cual no fué posible el aislamiento viral.

En la granja que resultó con serología positiva se permitió la vacunación por única ocasión, con el fin de evitar la dispersión del virus para posteriormente despoblarla.

En las granjas vacunadas se dejaron aves centinelas, (50 por caseta) previamente identificadas, a fin de realizarles remuestreos periódicos; una vez despoblada la granja, la Comisión México – Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas en los animales (CPA) constató las medidas de bioseguridad, para así proceder al levantamiento de la cuarentena para su posterior repoblación.

2. INTRODUCCIÓN

Desde hace un par de años a la fecha se ha hablado mucho sobre Influenza Aviar (IA) debido al problema que se está experimentando actualmente en México. La IA produce en pollos y gallinas una gama de síndromes, de una enfermedad respiratoria leve en su forma menos patógena, a una altamente agresiva y mortal (2).

Aunque la enfermedad grave se restringe a las aves de corral, muchas de tipo silvestres pueden estar infectadas. Estas se consideran una importante fuente viral (9) y no muestran signos de la enfermedad, pero si se infectan puede transmitirla al medio ambiente por grandes distancias, como resultado de la migración (31). De hecho se han aislado millares de virus, pertenecientes a múltiples subtipos antigénicos basados en antígenos de superficie de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), de especies aviares tanto domésticas como silvestres de todo el mundo (7).

En la mayor parte de los casos no se pueden predecir las pérdidas cuando se presentan brotes ya que hay muchos procesos que influyen en los resultados de la infección. Estos factores abarcan la variación en las características biológicas del virus, infecciones intercurrentes, estrés, edad y sexo, entre otras. Lo que resulta en que los índices de morbilidad y mortalidad varían de insignificantes hasta cerca del 100%. El impacto económico no se limita a pollos, durante varios años los productores de pavo han sufrido pérdidas en varios países del mundo (7).

Para demostrar la presencia de anticuerpos existen pruebas serológicas que pueden detectarlos de los 7 a 10 días post- infección. Se emplean varias técnicas para la vigilancia y diagnóstico, la más comúnmente utilizada en México es la de inhibición de la hemoaglutinación (IH). Otras incluyen la neutralización del virus, precipitación agar gel (AGP), fijación de complemento, más recientemente se ha desarrollado la prueba de ELISA (del inglés Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (35).

Para el diagnóstico serológico es importante que se obtenga suero de la fase aguda o convaleciente de la enfermedad (31).

2.1. JUSTIFICACIÓN

La industria avícola genera 115,000 empleos directos y 575,000 indirectos, siendo el consumo per cápita anual nacional de: 16.7 Kgs. de huevo, 15.8 Kgs. de pollo y 111grs. de pavo; por otra parte esta industria es una actividad cuya rentabilidad depende mucho de la salud de las aves, y la influenza aviar es una enfermedad de gran importancia para la población aviar, ya que puede ser severamente mortal y lesionar seriamente la población avícola.

2.2. OBJETIVOS

1. Determinar la presencia de anticuerpos, contra IA en granjas de postura comercial en la zona de Allende, N.L., y definir la proporción de granjas positivas, títulos virales a partir de Enero de 1995, a Diciembre de 1996.

2. Comparar la incidencia de anticuerpos de influenza aviar observada en Allende, N.L. con la que se ha presentado en otros estados y/o municipios, en los cuales existe o padecieron la enfermedad.

2.3. HIPÓTESIS

En el mes de mayo de 1994 se notificó oficialmente la presencia de IA, con el aislamiento de 3 cepas de baja virulencia en los estados de Querétaro, Hidalgo y México. En enero de 1995 se confirma IA de alta virulencia en 3 granjas de postura comercial en Tehuacán, Puebla (2,3).

En esta investigación se plantea la posibilidad de que las aves, de dicha zona pudieran presentar esta enfermedad, ya que existen vínculos comerciales y de intercambio de utensilios avícolas.

3. ANTECEDENTES

3.1. HISTORIA

La peste aviar, que en la actualidad se sabe que la originaron cepas altamente patógenas de virus influenza, la describió Perroncito como una enfermedad grave de pollos en Italia en 1878; en 1901 Centanni y Savonuzzi demostraron que era ocasionada por un agente "filtrable" (virus). No obstante fue hasta 1955 cuando se demostró que los virus de la peste aviar era en realidad virus de influenza tipo A. Durante este siglo se reportaron cepas altamente patógenas que pertenecen al subtipo H5 en pollos de Escocia (H5N1); se han notificado 5 grandes brotes de IA en el mundo: en Australia (1975 y 1985), Inglaterra (1979), E.U.A. (1929), Irlanda (1983 y 1984) y nuevamente en E.U.A. (1983 y 1984) (8).

Anteriormente se designaba la forma más virulenta de IA como "peste aviar"; en el Simposium Internacional sobre IA celebrado en E.U.A. en 1981, el término de peste aviar fue cambiado por el de Influenza Aviar altamente virulenta. La propuesta más reciente sugiere que los virus aislados sean designados como IA o Influenza Aviar Altamente Patógeno (IAAP) según sea el resultado de la tipificación agresiva y otras pruebas (39).

En E.U.A. los únicos brotes graves se comunicaron en 1929 y en los años de 1983 y 1984; este último ocurrió en Pensilvania en Abril de 1983, y su posterior esparcimiento a Maryland y Virginia; algunos pollos presentaban enfermedad respiratoria aguda con una mortalidad de 0 a 15% y disminución en la producción de huevo, posteriormente se identificó que era un virus de IA identificado como H5N2 de baja patogenicidad. Este problema continuó por seis parvadas siguientes, hasta Octubre de 1983 cuando la mortalidad aumentó de 50 a 89% con manifestaciones en las aves de depresión intensa, temblores y un cese completo en la producción de huevo; los virus aislados fueron también H5N2, pero esta vez se designaron como altamente patógenos con base en la inoculación

a pollos (17,20). Este cambio aparente en la enfermedad condujo a que el *U.S. Department of Agriculture* de E.U.A. declarara una “emergencia extraordinaria” con el objeto de erradicarla, en el cual se incluyeron varios puntos como: una estricta cuarentena, vigilancia total de la población avícola con destrucción de toda evidencia clínica, serológica o virológica de influenza H5N2; limpieza ambiental continuada por descontaminación y educación intensiva de bioseguridad, todo ésto con un costo superior a los 60 millones de dólares y la eliminación de 17 millones de aves (7,8).

Durante los últimos 10 años, virus aislados típicamente de especies aviares se han encontrado en brotes de enfermedades en mamíferos, como focas, mink y ballenas; estos hallazgos sugieren que el vínculo entre aves y mamíferos en la situación natural puede provocar transmisión de virus aviares, ocasionando problemas patológicos significativos (7).

3.2. INCIDENCIA Y DISTRIBUCIÓN

Los virus de IA están distribuidos por todo el mundo en múltiples aves domésticas, incluyendo pavos, pollos, gallina de Guinea, perdiz de la India, codorniz, faisanes, gansos y patos, en especies silvestres que abarcan patos, gansos, gallinetas, garzas, alcas, aves frías y gaviotas. Las aves acuáticas migratorias, en particular los patos, han producido con frecuencia más virus que cualquier otro grupo, mientras que los pavos y pollos domésticos han presentado los problemas de enfermedad más sustanciales (33). También se han aislado en aves de jaula, incluyendo estornino asiático, periquitos, loros, cacatuas, tejedores, pinzones y halcones. Estas aves permanecieron en cuarentena, y el significado de la infección aún no está claro. Las aves paserinos como el gorrión, la golondrina y alondra entre otras, han producido relativamente pocos virus influenza. Aunque unos estudios sugieren que hay transmisión de virus altamente patógenos entre aves domésticas y paserinas (24).

La distribución e incidencia precisas del virus influenza aviar (VIA) son difíciles de determinar debido a las anomalías en el muestreo. La Organización Mundial de la Salud ha

estimulado y dado apoyo a programas de vigilancia para incrementar y poder disponer de estos datos. En los datos de distribución influyen claramente la distribución de las especies tanto domésticas como silvestres y aves de corral, las vías migratorias y los sistemas de reporte de enfermedades. En la frecuencia también influyen algunos de los mismos factores, pero los índices precisos son difíciles de determinar debido a la variedad de los sistemas de vigilancia y procedimientos empleados. Para cualquier episodio de IA la incidencia y distribución no son predecibles. Por ejemplo, en pavos en Minnesota, la incidencia ha sido muy elevada algunos años y casi inexistentes en otro, la ausencia no se debe a inmunidad residual sino más bien a una inexplicable ausencia del virus (5).

Se ha visto a las aves acuáticas como una fuente de virus para pavos en pastoreo, así los investigadores han aislados múltiples VIA de patos silvestres y centinelas durante la migración del otoño y han establecido que los brotes de pavo coinciden con la presencia de los patos migratorios. Aun así es difícil predecir cuales virus se presentarán y ocasionarán problemas en los pavos en cualquier momento (15).

La vigilancia de las aves acuáticas migratorias en América del Norte ha indicado que hasta el 60% de las aves jóvenes pueden estar infectadas al congregarse en áreas de reunión previa a la migración, y se ha visto que los patos excretan cantidades altas de virus en las heces durante un período tan prolongado como de 30 días, produciendo una contaminación intensa en el agua de lagos y estanques. Estudios recientes revelan que las aves que habitan en la playa (como gallinetas, gallinetas pequeñas y gaviotas) constituyen un reservorio significativo del virus (17).

Al considerar la incidencia y distribución en especies aviares, está claro que muchos virus circulan en aves de todo el mundo, en vista de esto, es enigmático por qué los virus de influenza aviar en ocasiones son causantes de problemas más extensos de enfermedades en aves de corral (11).

3.3. ETIOLOGÍA

El virus de la IA pertenece al género *Influenza virus*, de la familia Orthomyxoviridae. Los virus de esta familia poseen genoma de RNA, además son muy pleomorfos de 100 nm. de diámetro. La nucleocápside presenta simetría hélice y en su envoltura proyecciones de glucoproteína que tienen actividad hemaglutinante (HA) y de neuroaminidasa (NA), existen tres tipos antigénicamente diferentes: A, B y C. Los tipos B y C se encuentran típicamente sólo en humanos. El tipo A se encuentran en seres humanos, cerdos, caballos y ocasionalmente en otros mamíferos como el mink, focas y ballenas; y muchas especies aviarias (10).

Los virus tipo A se dividen en subtipos de acuerdo a la naturaleza antigénica de la HA y la NA, actualmente se conocen 14 HA y 9 NA diferentes. En 1971 se propuso un sistema de nomenclatura para los virus influenza, e incluye el tipo (A, B ó C), el huésped de origen, el origen geográfico, el número de la cepa, (si existe) y el año de aislamiento, seguido por la descripción antigénica de HA (H) y NA (N) presentes en la envoltura, en paréntesis. Por ejemplo: A / Chicken / México / 8622-608 / 94 / (H5N2) “Virus de influenza tipo A aislado de gallina en México en 1994, con número de serie 8622-608, Hemoaglutina 5 y Neuroaminidasa 2” (5,8).

Específicamente, los virus de IA se han clasificado como de baja, mediana y alta patogenicidad, para que un virus sea considerado de alta patogenicidad debe producir mortalidad mayor al 75% en pollos de 4 - 8 semanas a los 10 días después de una inoculación intravenosa con 0.2 ml. de una dilución de 1:10 de un líquido alantoideo infeccioso (cultivo en embrión de pollo) libre de bacterias (7).

3.3.1. MORFOLOGÍA

Los viriones son aproximadamente esféricos 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 espigas espaciadas de manera estrecha de 10 a 12 nm. de longitud. Un nucleocápside helical está incluido dentro de la envoltura viral. Las

espigas superficiales con dos formas distintas son la HA, que es un trímero en forma de bastón, y la NA que es un tetrámero en forma de hongo (11).

La HA es causante de la fijación del virión a los receptores de la superficie, y de su actividad hemoaglutinante, los anticuerpos contra la HA son muy importantes en la neutralización del virus y protección contra la infección (25). La enzima NA origina la liberación de nuevos viriones, los anticuerpos contra la HA también son significativos en la protección, ya que restringe su propagación; estos virus cuentan con la siguiente composición química: 70 a 75% de proteína, 20 a 24% de lípidos, y 5 a 8% de carbohidratos (11).

3.3.2. REPLICACIÓN VIRAL

El virus se adhiere a los receptores de glucoproteína, que contiene en la superficie celular, penetra a la célula por endocitosis, así la nucleocápside penetra al citoplasma. Después de la producción y ensamble de proteínas virales y RNA, el virus sale de la célula por gemación de la membrana plasmática (26). En la etapa de replicación viral, puede ocurrir lo que se llama “derivación antigénica” que se debe a mutaciones en los genes que codifican las proteínas de HA y/o NA y es reflejo de selección de variantes en una población inmune (7). Es decir una mutación en un solo punto puede alterar la estructura de la proteína de superficie (HA ó NA), y por lo tanto sus propiedades antigénicas o inmunitarias, o de ambos tipos, originando una variante antigénica (29,30).

3.3.3. PROPIEDADES BIOLÓGICAS

La propiedad biológica de patogenicidad de los virus de IA es en extremo variable y no se puede predecir en base al huésped de origen o subtipo antigénico del virus, en tiempos pasados estos virus aviares de subtipo H5 y H7 se han vinculado con enfermedad grave en pollos, pavos y patos. Sin embargo, hay múltiples ejemplos de aislamiento de virus H5 y H7 que no son patógenos, por lo cual, la configuración antigénica por sí sola no determina la patogenicidad (7).

La virulencia es una propiedad de la interacción entre el huésped y el virus, un virus de influenza que es patógeno para una especie aviaria no necesariamente será patógeno para otra (4). Es muy posible que el tropismo tisular esté implicado en su patogenicidad, pero la base para esto aún no se define, y como aún no hay un receptor celular identificado para los virus influenza, no está clara la función desempeñada por las interacciones entre virus y receptor en la enfermedad (5).

3.3.4. RESISTENCIA

El virus de influenza aviar tipo A posee una envoltura, y por lo tanto son relativamente sensible a la inactivación por solventes de lípidos, tales como detergentes. La pérdida de infección se logra con productos elaborados a base de: formalina, beta-propiolactona, agentes oxidantes, ácidos diluidos, éter, desoxicolato de sodio, hidroxilamina, dodecilsulfato de sodio, e iones de amonio. Otras formas de inactivación se logra con calor extremo, extremos de pH, condiciones no isotónicas y desecación (25).

En la situación de campo, los virus son liberados en secreciones nasales y heces de aves infectadas, por lo cual presentan una mayor resistencia a la inactivación por la presencia del material orgánico, de esta manera representa un problema especial para su control, por lo tanto se debe eliminar enterrándose, apilarse para su descomposición cubierto con un material plástico, o con tierra, ya que el virus puede sobrevivir durante periodos prolongados en el ambiente, en particular en condiciones frescas y húmedas (39).

3.3.5. CLASIFICACIÓN DE LA CEPA

Esta se basa en el subtipo de HA y NA, en la actualidad se conocen 14 hemoaglutininas y 9 neuraminidasas, todas las cuales se han identificado en varias combinaciones en aislamientos aviares. Para identificar la HA y NA de un virus, el aislamiento se sujeta a pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (IH) e inhibición de neuraminidasa (IN), con el uso de un panel de antisueros específicos para los distintos subtipos (8,36). La comparación del virus que pertenece al mismo subtipo se logra a menudo con el empleo de anticuerpos monoclonales, que ha permitido comparaciones más

detalladas de virus relacionados que se presentan en la misma especie, o en especies distintas (7).

3.4. HOSPEDEROS DE LABORATORIO

3.4.1. EMBRIONES DE POLLO

Todas las cepas de VIA proliferan con rapidez en embriones de pollo, ya que son muy estables en el líquido alantoideo porque la presencia de proteína protege a los virus, los embriones de pollo son de 9 a 11 días de edad, se inoculan vía cavidad alantoidea con 0.2 ml. de muestra, haciendo que este método sea el más empleado universalmente (10). La inactivación de estos virus en situaciones de laboratorio puede lograrse con múltiples detergentes y desinfectantes comunes (31). El cultivo de este virus en huevos embrionados también se usa para la producción de vacunas en grandes cantidades, y para estudios de laboratorio (23).

3.4.2. ANIMALES DE LABORATORIO

Los pollos, pavos y patos han sido las especies usadas más comúnmente para estudios de laboratorio puesto que han sido las especies infectadas con más frecuencia bajo condiciones naturales. Aunque los virus aviares también se replican en varios mamíferos inoculados de manera experimental, como hurones, gatos, ratones, monos, minks y cerdos (27).

3.5. PATOGENIA Y EPIZOOTIOLOGÍA

3.5.1. HUÉSPED NATURAL Y EXPERIMENTAL

Muchas especies aviares, domésticas o silvestres, pueden infectarse y pueden o no ser fuente de enfermedad (34). Otras especies de las cuales se han aislado virus incluyen gallina de guinea, gansos domésticos, codorniz, faisanes, perdices, estorninos asiáticos,

pasorinos, periquillos de Australia, gaviotas, aves de playas y marinas. Los pavos han sido los más frecuentemente implicados en brotes de la enfermedad, mientras que los pollos lo han sido, pero con menos frecuencia (5).

Se han reportado dos brotes de enfermedades en focas (*Phoca vitulina*) en E.U.A. Estos animales padecieron neumonía y se provocó una morbilidad y mortalidad significativa (15). Se han producido dos comunicaciones de aislamiento de virus en ballenas muy vinculados con virus aviáres, aún no se sabe si estos virus están implicados en un proceso patológico en estos animales (7).

Los virus H1N1 que se alojan típicamente en cerdos también se han detectado en pavos en E.U.A. durante el último decenio, ésto nos indica que los virus de pavo están muy relacionados con los que circulan de manera continua en cerdos, y por lo tanto son de origen porcino. Pueden infectarse de manera experimental cerdos, hurones, gatos, minks, monos y seres humanos, con virus originados de especies aviáres (7). Aunque como se mencionó en la sección de propiedades biológicas (3C), en la naturaleza existe especificidad entre huésped y virus.

3.5.2. TRANSMISIÓN Y PORTADORES

Las aves infectadas excretan virus de las vías respiratorias, conjuntiva y heces; así las formas probables de transmisión incluyen tanto contacto directo como el indirecto, abarcando aerosol o exposición por fomites. Las aves pueden excretar grandes concentraciones de virus en las heces, así la propagación con facilidad mediante cualquier contaminante de material fecal. Por lo tanto los virus se transportan con facilidad a otras zonas a través de personas y equipo compartido por servicios de apoyo y comercialización, las investigaciones indican que una vez que el virus se ha introducido en una parvada, se extiende a otras a través del movimiento de aves infectadas, equipo, cajas, empaques para huevo o vehículos (31).

Hay una amplia evidencia de transmisión horizontal, pero poca evidencia de que se puedan transmitir verticalmente. No obstante se debe señalar que pueden estar presentes dentro o en la superficie de huevos cuando la gallina está infectada. Las vías

experimentales de exposición en las cuales se tiene éxito incluyen: aerosol, intranasal, intrasínusal, intratraqueal, oral, conjuntival, intramuscular, intraperitoneal, intracaudal en el saco aéreo, endovenosa, cloacal y administración intracraneal (8).

Por otra parte no es muy probable que los embriones infectados puedan sobrevivir e incubarse, esto no quiere decir que los huevos contaminados no puedan ser fuente de infección a los pollitos después de nacer en la misma incubadora, por lo que los huevos para incubación, procedentes de aves infectadas representan un riesgo de consideración (12).

3.5.3. PERÍODO DE INCUBACIÓN

Los períodos de incubación, para las distintas enfermedades ocasionadas por estos virus, varían de tan breves como de unas cuantas horas hasta 3 a 7 días (5). El período de incubación depende de la dosis, la vía de exposición, la especie expuesta, el tipo de virus, la edad del ave y su inmunidad (39).

3.5.4. PATOGENICIDAD

Hay una gama amplia de patogenicidad entre los virus IA. Las infecciones pueden no ser aparentes u ocasionar como resultado enfermedades que varían de grado leve, síndromes transitorios y hasta 100% de morbilidad y/o mortalidad (3). Los signos de la enfermedad pueden ser evidentes como: respiratorios, entéricos, nerviosos y reproductivos, y pueden variar con el virus, la especie y estado inmune del huésped (39).

Hay múltiples situaciones en las cuales los virus influenza ocasionan una morbilidad y mortalidad de grado muy manifiesto en condiciones de campo, y sin embargo parecen no provocar enfermedad en aves inoculadas de manera experimental (6).

3.5.5. SIGNOS

Los signos de la enfermedad son en extremo variables y dependen de la especie afectada, edad, sexo, infecciones concomitantes, tipo de virus, factores ambientales, etc. Las infecciones producidas por un virus de baja patogenicidad generalmente se presentan

en forma asintomática o con alguna sintomatología de tipo respiratorio, lo cual se manifiesta en diversos grados de morbilidad y mortalidad, pero siempre asociados a infecciones secundarias. Los síntomas producidos por un virus Altamente Patógeno pueden reflejar anormalidades respiratorias, entéricas, reproductivas o del sistema nervioso. Los signos más comunes abarcan una marcada depresión, plumas erizadas, inapetencia, sed excesiva, baja en la producción de huevo y diarrea acuosa. Las aves frecuentemente presentan inflamación de crestas y barbillas, además de edema de cara. A menudo hay cianosis en la punta de las crestas y puede haber vesículas de plasma o sangre en su superficie con zonas oscuras de hemorragias equimóticas y focos de necrosis. La diarrea es acuosa de color verde brillante, modificándose a casi totalmente blanca. La conjuntiva está inflamada, congestionada y ocasionalmente con hemorragias. Puede haber hemorragias difusas en zonas amplias entre la pata y el tarso. En ocasiones algunas gallinas afectadas lograrán recuperarse. (16).

En aves de engorda, los signos son menos obvios, presentándose severa depresión, inapetencia y un marcado aumento de la mortalidad, algunos signos neurológicos son tortícolis y ataxia, así como edema de la cabeza y cuello (39).

En algunos casos, la enfermedad es rápidamente fulminante y se encuentran las aves muertas sin signos previos. Cabe señalar que la especie aviar implicada es muy significativa en casi todos los casos, en el caso de aves silvestres han sido inaparentes sin mostrar signos obvios de la enfermedad (4).

En el brote de Pensilvania, hubo al principio una enfermedad respiratoria aguda con aumento en la mortalidad y declinación en la producción de huevo. Después el virus se volvió altamente patógeno y hubo otros problemas, incluyendo una mortalidad alta (50 a 89%), declinaciones significativas en el consumo de alimento y agua, y producción de huevo. Los trastornos respiratorios fueron menos prominentes, pero las aves estaban intensamente deprimidas y algunas tenían temblores y posiciones poco comunes de la cabeza (2). Es importante señalar que la sintomatología se presenta de manera diferente en cada brote, de acuerdo con la virulencia y la patogenicidad de la cepa presente, y la aparición secundaria de otros patógenos oportunistas (5).

3.5.6. MORBILIDAD Y MORTALIDAD

Los índices de mortalidad y morbilidad son tan variables como los signos, y dependen de la especie y el virus, así como de la edad, ambiente e infecciones intercurrentes. Los índices de morbilidad en general están mal definidos, en parte debido al tamaño muy grande de parvadas afectadas y la signología mal definida de la enfermedad en muchos de los brotes. Por lo tanto la morbilidad puede llegar al 100% y la mortalidad del 75 al 100%, en brotes de alta patogenicidad, sin embargo algunos virus solo causan mortalidad del 10 al 20% ó ausencia de ésta (7).

3.5.7. LESIONES

Las lesiones macroscópicas que se han observado en diferentes especies aviares han sido en extremo variadas en lo referente a su localización e intensidad, por lo regular se describen en pollos y pavos como una infección, ya sea natural o artificial (22).

En muchos casos hay pocas lesiones notables debido a que la enfermedad es leve, y se pueden observar en los senos, caracterizados como inflamación catarral, fibrinosa, serofibrinosa, mucoporulenta o caseosa (27). Puede haber edema de la cara y traqueitis con un exudado que varía de seroso a caseoso, los sacos aéreos pueden estar engrosados y tener un exudado que varía de seroso a caseoso, hay una peritonitis catarral a fibrinosa que se puede manifestar en el ciego, intestino, o ambos sitios, se puede encontrar exudado en el oviducto de aves ponedoras (7).

En el caso de virus altamente patógenos puede no haber lesiones ya que las aves mueren rápidamente, antes de aparecer alguna lesión (8). Sin embargo se han descrito algunos signos como: edema subcutáneo de la cabeza y cuello con inflamación de senos, barbillas, crestas cianóticas congestionadas y hemorrágicas. También se puede observar congestión y hemorragia en piernas, al progresar la enfermedad, las lesiones internas varían de manera considerable, a veces se observan focos necróticos en el hígado, bazo, riñones y pulmones en pollos. También hay pequeñas petequias en grasa abdominal, en superficies serosas y peritoneo, que parecen estar rociadas por un atomizador. Los riñones

están seriamente congestionados y en algunas ocasiones los túbulos están obstruidos por depósitos blancos de uratos (39).

En ponedoras, el ovario puede estar hemorrágico con zonas de necrosis, con frecuencia en el peritoneo se encuentran óvulos rotos lo que ocasiona una aerosaculitis y peritonitis, en las aves que sobreviven de 7 a 10 días. Puede haber hemorragias en la superficie mucosa del proventrículo, principalmente en su unión con la molleja, la cutícula de la molleja se desprende fácilmente. Es factible encontrar zonas hemorrágicas en la mucosa intestinal principalmente en los focos linfoides (39).

En un estudio realizado en la Universidad de Japón, se inocularon unos pollitos de 2 días de edad libres de patógenos específicos, se inocularon con el virus influenza tipo A (A/whistling swan/Shimane/499/83 (H5N3); los pollitos demostraron de poca a severa diarrea con inflamación y atrofia del páncreas, timo y bolsa de Fabricio; el antígeno viral se detectó en el páncreas, riñón, hígado, pulmón, sacos aéreos y en la lámina cecal; posteriormente el virus fué recuperado a lo largo del páncreas (32).

Las lesiones observadas en el brote de Pensilvania, se caracterizaron por una inflamación intensa de crestas y barbillas, con edema periorbitario, las lesiones en las crestas variaron de vesículas e inflamación con cianosis intensa, equimosis y necrosis franca. En ocasiones había edema en las patas con decoloración equimótica, las lesiones viscerales incluyeron hemorragias petequiales en diversas superficies serosas y mucosas, en particular en la superficie del proventrículo cerca de la unión con el ventrículo. El páncreas tenía áreas de manchas de color amarillo y rojo obscuro, en algunas aves las lesiones se limitaron a la deshidratación (8).

Al examinar las aves, es importante considerar que la infección viral puede estar acompañada con afección bacteriana por lo cual las lesiones pueden reflejar efectos tanto del virus como de bacterias oportunistas (3).

3.5.8. HISTOPATOLOGÍA

La peste aviar clásica, como se describió en 1926, estaba caracterizado por edema, hiperemia, hemorragias y focos linfoides perivasculares, principalmente en miocardio,

bazo, pulmones, encéfalo, barbillas y en menor grado, hígado y riñón. Hay focos necróticos en el bazo, hígado, pulmones, riñón, intestinos, y páncreas en orden decreciente de frecuencia (2).

En el examen histopatológico de pollos infectados en el brote de Pensilvania se encontraron una encefalitis no supurativa difusa de grado leve a intenso, pancreatitis necrotizante, difusa de grado muy leve a intenso, y miocitis necrotizante subaguda, afección en múltiples músculos esqueléticos y más intenso a los músculos oculares externos. Las lesiones microscópicas fueron más intensas en pollos de engorda que en gallinas ponedoras, las explicaciones posibles incluyen la edad, la estirpe, la patogenicidad del virus o la etapa de la enfermedad (7).

3.6. DIAGNÓSTICO

Un diagnóstico definitivo de virus A de influenza depende del aislamiento e identificación. Como los síntomas clínicos pueden variar de manera dramática, el diagnóstico clínico se considera solamente presuntivo (4).

3.6.1. AISLAMIENTO

Es muy común poder recuperar virus de la tráquea o la cloaca, o ambos sitios, de aves tanto vivas como muertas, ya que los virus se replican típicamente en las vías respiratorias e intestinal, o en ambas. Los tejidos, secreciones o excreciones de estas vías son apropiadas para su aislamiento. Puede emplearse hisopos de algodón para frotar la tráquea o la cloaca, o ambas estructuras. Los hisopos deben colocarse en un medio de transporte estéril que contenga concentraciones adecuadas de antibióticos para impedir el desarrollo bacteriano. Los órganos pueden obtenerse y colocarse en tubos o bolsas estériles, hay que obtener y almacenar órganos internos como los del tejido de las vías respiratorias e intestinales por separado, ya que si se aislara algún virus sería una indicación de propagación sistémica, que se vincula más a menudo con los virus altamente patógenos (8).

Es muy importante conservar muestras en frío (4°C) y húmedas, antes de su procesamiento si éste no exceda de 48 horas, pero si la muestra requiere un tiempo adicional, se recomienda el almacenamiento en congelación (31).

Los métodos para aislamiento e identificación viral se han explicado en detalle cuando se mencionaron los sistemas de huésped de laboratorio; al usar embriones de pollo y observar la mortalidad embrionaria, se debe obtener líquido alantoideo, la replicación se comprueba por actividad hemaglutinante, sobre eritrocitos de pollo en el fluido amniótico alantoideo (10,28).

3.6.2. IDENTIFICACIÓN

Es importante determinar si la actividad hemaglutinante detectada en el líquido alantoideo se debe al virus de influenza o a otros virus hemaglutinantes, tales como el paramixovirus. Por lo tanto el aislamiento se prueba en pruebas de HI contra antisero de enfermedad de Newcastle, si ésta es negativa el virus se prueba entonces para la posible presencia de NP tipo A para establecer que existe el virus de influenza A (26).

El siguiente procedimiento de identificación es determinar el subtipo antigénico de los antígenos de superficie HA y NA. La HA se reconoce en la prueba de HI con el uso de un panel de antiseros preparados contra las 14 HA distintas (7). La tipificación se facilita con el empleo de antiseros contra la HA aislada o contra virus redistribuidos con NA irrelevantes. El subtipo NA suele identificarse con la ayuda de un antisuero preparado contra las 9 NA conocidas (7).

La tipificación de este virus podrá realizarse en un laboratorio oficial o aprobado, las pruebas de patogenicidad solo se realizarán en el laboratorio de alta seguridad de la C.P.A. (39).

3.6.3. PCR

Se ha determinado que existe un marcador de secuencia de ADN para la virulencia del virus de influenza aviar, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, en su modalidad de transcripción reversa, es posible determinar rápidamente la presencia de esta

secuencia marcadora, la secuencia que se amplifica contiene un sitio de restricción en el gen de la HA, aún en especímenes que resultan negativos a este virus por las técnicas convencionales de inoculación a embrión de pollo. Por lo tanto esta técnica permite detectar la presencia de una cepa virulenta de influenza aviar de forma sensitiva y rápida (19).

3.6.4. SEROLOGÍA

Se usan pruebas serológicas para demostrar la presencia de anticuerpos que pueden ser detectados ya a los 7 a 10 días posteriores a la infección. Existen varias técnicas para la vigilancia y diagnóstico serológico. Las más comúnmente utilizada es la prueba de HI y ésta nos proporciona el grado de aglutinación que será utilizada en este estudio, y la inmunodifusión doble para detectar anticuerpos contra la NP. Otras pruebas serológicas incluyen la neutralización del virus, fijación del complemento, la inhibición de la neuraminidasa, la hemólisis radial simple, y más recientemente se ha desarrollado la prueba de ELISA y PCR (35).

3.6.4.1. INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN

En la prueba de IH se utilizan 4 unidades hemaglutinantes y serán positivos todos los sueros que produzcan inhibición de la hemoaglutinación franca de la dilución 1:10 y continuando las diluciones en logaritmo base dos 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, etc. Los títulos sospechosos se deberán remuestrear de 14 a 21 días posteriores al primer muestreo, en el caso de que las aves no se hayan sacrificado (39).

Para el diagnóstico serológico es importante que se obtenga suero de la fase aguda o convaleciente de la enfermedad, la muestra de sangre debe obtenerse de 14 a 28 días post-infección. El suero debe conservarse en refrigeración hasta la prueba, y puede agregarse azida de sodio (0.01%) como preservativo, solo en caso que no se procese pronto (y mantenerse a una temperatura de -20°C) (31).

3.6.5. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Debido al amplio espectro de signos y lesiones con infecciones por virus IA en distintas especies, el diagnóstico definitivo debe establecerse por medio de métodos virológicos y serológicos; mediante la prueba de IH se puede demostrar la respuesta a varias enfermedades. Otras infecciones que deben considerarse en el diagnóstico diferencial incluyen las ocasionadas por agentes como paramixovirus, clamidia, adenovirus, bronquitis infecciosa, coriza infecciosa, micoplasma, y otras bacterias (36). Se ha observado comúnmente infecciones concurrentes con micoplasma entre otras bacterias (7).

3.7. PREVENCIÓN Y CONTROL

Un aspecto fundamental para lograr estos objetivos es la educación en la industria avícola, con sistemas adecuados de bioseguridad para así evitar su propagación (7).

3.7.1. PREVENCIÓN

Las fuentes más probables de transmisión son el contacto con otras aves infectadas, por lo que los medios básicos para la prevención es la separación de áreas contaminadas así como de sus secreciones y excreciones. La "bioseguridad" debe ser la primera línea de defensa, puede haber transmisión cuando están en contacto cercano, o por material infeccioso (31), cuando se introduce en el ambiente. Estas introducciones se efectúan por medio de contaminación de equipo, zapatos y ropa, vehículos, alimentos, agua, etc. La presencia del virus en el material fecal es un medio para trasladar el virus por medio de equipo y personal (3).

El reservorio son las aves silvestres, que actúan como fuente potencial de infección para aves domésticas, en particular las áreas abiertas (17). Los cerdos pueden actuar como una fuente de virus para pavos con transmisión mecánica o por medio de personas o cerdos infectados (39).

3.7.2. CONTROL

En el caso de un brote de influenza de baja a moderada patogenicidad, los esfuerzos se centran en contener el problema. En presencia de un virus altamente patógeno, se emplean procedimiento de erradicación, (cuarentena, sacrificio, despoblación y limpieza) (3). La decisión de erradicar se basa en la naturaleza, dimensión del problema y en las propiedades biológicas del virus (2). En el brote de Pensilvania, las áreas de cuarentena fueron esenciales para prevenir la propagación y lograr la erradicación, la vigilancia epidemiológica fue crítica para detectar nuevos brotes y contenerlos (2).

3.7.3. TRATAMIENTO

En la actualidad no hay un tratamiento específico práctico, se ha usado clorhidrato de amantina y el clorhidrato de rimantadina que son eficaces en la profilaxia de las infecciones por influenza humana (11). En un estudio reciente, se administró a unos pollos amantandina y rimantadina en el agua de beber, y redujo la mortalidad, no obstante las aves permanecieron infectadas y dispersando virus, posteriormente el virus se hizo resistente y produjo la muerte a las gallinas tratadas. Actualmente este fármaco no está aprobado para usarse en aves para consumo (6,37).

3.7.4. VACUNAS

Se ha demostrado que las vacunas de virus inactivados monovalentes o polivalentes con adyuvantes, tienen la capacidad de inducir anticuerpos (35) y conferir protección evitando en parte morbilidad, mortalidad y baja en la producción de huevo (37). En el caso de vacunación, si las gallinas están infectadas excretan virus aunque muestren o no signos de la enfermedad, estas vacunas pueden reducir en potencia la intensidad de la enfermedad y la propagación del virus en campo, pero el virus no será eliminado de la población (13,21).

La vacuna disponible de influenza aviar H5N2, establecido con viruela aviar H5 recombinante previene la eliminación del virus por las heces y así evitar la transmisión con otras aves (38).

En México se usan vacunas cuya adquisición está condicionada a la autorización que la Dirección General de Salud Animal otorgue (3); la vacunación se autorizará a granjas que justifique su aplicación, considerando los siguientes criterios:

- 1.- Aislamiento de un virus de baja, mediana o alta patogenicidad o en aquellas zonas que se considere de riesgo.
- 2.- Vecindad con una granja positiva, considerando un radio máximo de 10 Kms. modificable según las disposiciones de la Dirección General de Salud Animal.

3.7.5. SALUD PÚBLICA

Los virus IA. son tipo A, por lo que existe la posibilidad de que se compliquen en su desarrollo con una recombinación de nuevas cepas, que afecten a los mamíferos. No existe evidencia que justifique preocupación de que los virus aviares sean una amenaza para los humanos, ésto no representa una zoonosis aunque existe un reporte, de una persona infectada con un virus de IA pero no hay evidencia que indique, que los humanos que estuvieron en contacto con grandes cantidades de virus, durante la despoblación en el brote de influenza aviar altamente virulento (I.A.A.V.) en Pensylvania, se hubiesen infectado con el virus (3,7).

3.8. INFLUENZA AVIAR EN MÉXICO

En los años 1980 -1981 el Dr. Lorenzo Tlacomulco, trabajando en el laboratorio de Patología Aviar en la U.N.A.M. utilizó la prueba de precipitación en agar contra IA en un número considerable de sueros sanguíneos de pollos de engorda, gallinas ponedoras, reproductoras y progenitoras, de toda la República Mexicana. En este trabajo no se encontró un solo animal positivo (39).

En otoño - invierno de 1993 se comenzaron a observar en diferentes áreas avícolas del país, como: Jalisco, Morelos, Querétaro y México, entre otros, problemas respiratorios, baja en la producción de huevo e incremento en la mortalidad, que por su

sintomatología se confundieron con: Newcastle, Bronquitis Infecciosa, Síndrome de la Cabeza Hinchada y Coriza Infecciosa (18, 39).

Fue el 23 de mayo de 1994 que se notificó oficialmente la presencia de IA a la Dirección General de Salud Animal, con el aislamiento de 3 cepas de virus procedentes de granjas avícolas de los estados de Querétaro, Hidalgo y México que fueron tipificados como H5N2 tipo A de baja virulencia (tipificado en Ames, Iowa); posteriormente se les comunicó a la Unión Nacional de Avicultores (UNA), la presencia de IA en México (3).

En los meses de junio a diciembre de 1994, la SAGAR realizó cursos y exámenes de aprobación y acreditación de IA. en diferentes partes del país, luego se desarrollaron actividades de monitoreo, apareciendo virus de baja patogenicidad en los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Morelos, Puebla, Querétaro, Veracruz y Distrito Federal (3).

En diciembre de 1994, se detectó la presencia de un virus IA. de mediana virulencia en una granja de Tehuacán, Puebla, habiéndose despoblado la granja, se reforzaron las medidas de bioseguridad y de vigilancia.

El 13 de enero de 1995 fué confirmado por el laboratorio de la comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas en los animales (CPA), el diagnóstico de IA, virus H5N2 de alta virulencia en 3 granjas de postura comercial en Tehuacán, Puebla (2,3).

El 17 de enero de 1995, en el área de Tepatitlán, Jalisco se confirmó el diagnóstico de virus de mediana virulencia en una granja de ponedoras, posteriormente se realizan monitoreos serológicos y aislamiento viral, así como el control de la movilización de aves y sus productos (8).

El 20 de enero de 1995, se reportó, en un núcleo de reproductoras de los municipios de Villa del Marqués y Atongo en el estado de Querétaro, un cuadro clínico sugestivo de I.A.A.P. que fué confirmado por el laboratorio de la CPA; en ese lugar se procedió al sacrificio de 15,000 aves, aplicándose una cuarentena estricta en la zona.

El 23 de Enero de 1995, la CPA estableció un operativo de emergencia que se publicó en el diario oficial de la federación, la activación del dispositivo nacional de emergencia de sanidad animal (DINESA), al mismo tiempo se estableció la coordinación de acciones de control y erradicación con el gobierno del estado y la delegación de la Secretaría, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR).

El 14 de Agosto de 1996, se publica en el diario oficial de la federación la norma, a fin de establecer la campaña nacional para la prevención, control y erradicación de la IA uniformando los procedimientos, actividades, criterios, estrategias y técnicas diagnósticas de esta enfermedad en la avicultura nacional (3).

3.8.1. NUEVO LEÓN

La avicultura comercial se inició en la década de los años 60's, con la explotación de aves de postura, actividad que continúa y tiene un destacado lugar nacional como productor de huevo para plato; se cuenta en la entidad con un total de 393 granjas avícolas de las cuales 201 son de postura comercial, 14 de crianza, 150 de pollo de engorda, 11 de reproductoras y 17 de avestruces, con una población estimada de 20'732,791 aves comerciales.

En el mes de marzo de 1995, se detectó serología positiva a influenza aviar, dando origen el Dispositivo de Emergencia en Influenza Aviar, realizando un remuestreo general a las granjas de pollo de engorda y postura comercial, se detectaron 49 granjas con serología positiva, se realizó despoblación de las casetas afectadas, posteriormente se realizaron los trabajos de limpieza, desinfección y centinelización, en diciembre del mismo año solo 5 granjas de postura comercial eran seropositivas.

En el mes de abril de 1996 se llevó a cabo un monitoreo, en el que se encontró que el número de granjas afectadas había aumentado, ya que 67 granjas (5.3% en esta zona) de postura comercial eran serológicamente positivas.

El número estimado de aves sacrificadas (pollo de engorda y postura comercial) desde el primer diagnóstico de IA hasta la última despoblación realizada en marzo de 1997, alcanza la cifra de 3.5 millones de aves.

En enero de 1995 Nuevo León se ubica en la zona 2 es decir serología positiva y/o aislamiento de baja patogenicidad; en diciembre de 1995 había pasado a zona indemne; en el mes de abril de 1996 presentó serología positiva; actualmente se encuentra en proceso de erradicación con vacunación, con posibilidades de que sea reconocida como estado libre en 1998 (12).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

La siguiente investigación se realizó en el municipio de Allende, N.L., el cual está situado en el sureste de este estado, y se localiza a $25^{\circ}17'$ de latitud norte y $100^{\circ}01'$ de longitud oeste a una altitud de 474 metros sobre el nivel del mar. El clima que predomina es semicálido subhúmedo con lluvias monzónicas de verano, la temperatura media es de 21°C con una máxima promedio de 40.1°C y una mínima promedio de -2.4°C . La precipitación media anual es de 1,064.6 mm. (1). Este municipio se dividió en 5 zonas geográficas que contienen cada una granjas muy próximas entre sí, pero separado entre las distintas zonas.

En el grupo 1 se encuentran las granjas que están más cerca de Allende, el grupo 2 se encuentra a una distancia aproximada de 10 kms. rumbo al sur siguiendo la carretera nacional [85], el grupo 3 está situado a una distancia aproximada de 4 kms. con dirección noreste siguiendo por la carretera Allende – Cadereyta; el grupo 4 se encuentra en dirección a el grupo 3 pero más hacia el noreste a una distancia de Allende a 15 kms. aproximados, el grupo 5 es el más alejado de Allende se encuentra a una distancia de 30 kms. siguiendo hacia el sur por la carretera nacional (fig. 1).

Durante el período de Enero de 1995 hasta Diciembre de 1996, se procedió a tomar muestras de todas las 80 granjas de postura comercial en dicha área, a cada granja se le tomaron estas muestras trimestralmente, siempre y cuando no sea diagnosticado la presencia del virus de IA. En cada caseta de cada granja se tomaron aleatoriamente 1 muestra por cada 1,000 aves, en este grupo de muestras las aves fueron de la misma edad; de esta forma se tomaron 3,189 muestras de las aproximadamente $3'188,501$ aves de esta región, cada tres meses. Posteriormente se les realizó la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación en un laboratorio acreditado por SAGAR, a fin de detectar anticuerpos contra IA. Luego con los datos obtenidos se realizó un análisis de distribución normal mediante pruebas de Xi cuadrada para comparar las frecuencias esperadas y observadas de

aves que presenten títulos de anticuerpos contra IA así como pruebas de comparación de medias para estimar las diferencias entre granjas mediante una prueba de análisis de confianza (cuadro 1). Se asumió que el municipio de Allende está libre de IA, por lo que el número esperado de aves infectadas se considera de cero. Por razones obvias e inherentes a la investigación no se mencionan los nombres de granjas, sino que se manejan mediante la asignación de un número.

4.1. TOMA DE MUESTRAS

La obtención del suero sanguíneo se realizó de las siguientes dos formas:

En una forma se tomó aleatoriamente una gallina, se procedió a introducir una jeringa desechable en la vena yugular o bien por punción del corazón, se tomó una cantidad aproximada de 3ml. de sangre, posteriormente se guardó la muestra para introducirlo en una estufa bacteriológica, esto solo en caso necesario, durante 2hr. a 37°C; con el fin de separar el suero del coágulo, el tiempo varía según lo requiera la muestra.

Cuando se separó el suero se obtuvo de 0.7 a 1.0 ml; esta cantidad se pasó a un tubo de ensaye, luego se puso a refrigerar a fin de evitar su descomposición y se procedió posteriormente a enviarlo al laboratorio con una previa identificación (nombre del propietario, dirección y nombre de la granja, número de casetas, población y edad de las aves y su número de parvada).

En otra forma fué la obtención de sangre por la técnica de punción a la vena humeroradiocubital, con el fin de que salga un poco de sangre, para posteriormente impregnar perfectamente de sangre un papel filtro, solo hasta la mitad, éste se clasificó y se guardó para su posterior análisis en el laboratorio.

Cualquiera de estas formas son correctas y confiables ya que no se ha visto diferencias significativas entre estas técnicas.

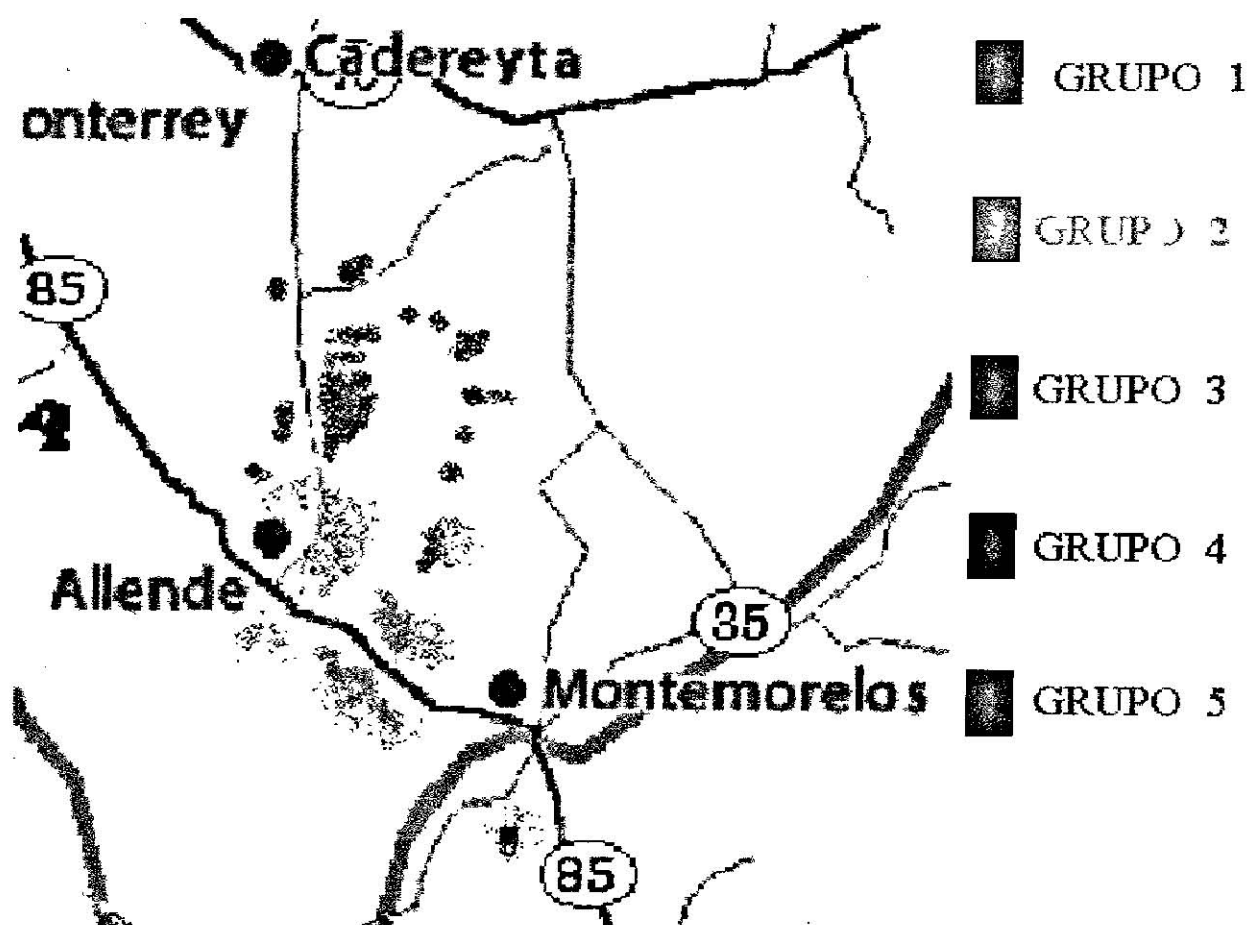


FIG. 1.- Ubicación Geografica de los Cinco Grupos.

CUADRO No.1

FÓRMULA PARA CALCULAR LOS LÍMITES DE CONFIANZA

$$\text{Límite Inferior} = \hat{P} - (1.96) \left(\sqrt{\hat{P} [1 - \hat{P}] / n} \right) \left(\sqrt{N - n / N - 1} \right)$$

$$\text{Límite Superior} = \hat{P} + (1.96) \left(\sqrt{\hat{P} [1 - \hat{P}] / n} \right) \left(\sqrt{N - n / N - 1} \right)$$

DONDE:

\hat{P} = Proporción

$\sqrt{\quad}$ = Raíz Cuadrada

n = Tamaño de la Muestra

N = Tamaño de la Población

4.2. MÉTODO DE LABORATORIO

En el laboratorio las muestras fueron procesadas por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (IH) ya que éste se considera un método adecuado para determinar la presencia de anticuerpos específicos en suero de los animales convalecientes, y posteriormente se utiliza la dilución del suero, para determinar la cantidad relativa de anticuerpos. Cuando se ponen en contacto algunos virus con eritrocitos de pollos, se produce aglutinación de estos últimos, a este fenómeno se le conoce como hemoaglutinación (HA) y el fenómeno puede impedirse añadiendo antisuero homólogo, como en la reacción IH. Esta reacción forma parte de muchas pruebas diagnósticas para las infecciones virales, tanto de animales como de humanos (25).

Para confirmar la identidad del subtipo de este virus, se emplea la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, utilizando antisueros específicos de referencia. La IH se emplea también para detectar y cuantificar anticuerpos específicos presentes en sueros de aves, después de una infección o vacunación con virus de Influenza Aviar.

4.3. MATERIAL DE CAMPO

El material que se utilizó para la obtención del suero es:

- Jeringas desechables de 3ml. 21G x 32 mm.
- Gallinas
- Tubo de ensaye
- Estufa bacteriológica
- Refrigerador
- Cinta adhesiva (identificar)
- Tiras de papel filtro de 5 x 1 cms. Wattman #12
- Lancetas para punción

4.4. MATERIAL DE LABORATORIO

Una vez obtenido la muestra deseada fué llevada a un laboratorio aprobado por la SAGAR; en el cual se utiliza el siguiente material:

1. Microplacas de 96 pozos con fondo en U y tapas para las microplacas.
2. Micropipetas o microdiluidores de 25, 50 y 100 microlitros (0.025, 0.050 y 0.100 ml)

4.5. REACTIVOS

1.- Solución salina fosfatada (PBS) pH 7.3

Solución A

Na ₂ HPO ₄ anhidro 0.15 M	21.30 g.
NaCl	8.50 g.
Agua destilada c.b.p.	1,000 ml.

Solución B

Na ₂ HPO ₄ anhidro 0.15 M	19.0 g.
NaCl	8.50 g.
Agua destilada c.b.p.	1,000 ml.

Solución de trabajo

Sol. A	80.00 ml.
Sol. B	20.00 ml

La mezcla de las soluciones A y B se ajusta a un pH 7.3, a esta solución se agrega 0.02 g de albúmina sérica bovina (cuando se diluya el virus).

2.- Anticoagulante de Alseaver:

Dextrosa	20.5 g.
Citrato de sodio	8.0 g.
Acido cítrico	0.55 g.
Cloruro de sodio	4.2 g.
Agua destilada	1,000 ml.

Esterilizar en autoclave 121°C, 15 minutos a 15 lbs. de presión.

3.- Sangre de pollo colectada en solución de Alseaver.

- Lavar los eritrocitos colocando en un tubo de centrifuga un volumen de sangre con Alseaver y llenar el tubo con PBS.
- Invertir el tubo varias veces para suspender los eritrocitos.
- Centrifugar la sangre a 800 gravedades durante 10 minutos.
- Quitar el PBS y la capa de células blancas.
- Llenar nuevamente el tubo con PBS.
- Repetir el ciclo de lavado y centrifugación 2 veces más.
- Diluir los eritrocitos a una concentración final de 0.5% en PBS, sin albúmina.

4.- Antisuero positivo y negativo para el serotipo de virus que se emplea.

5.- Antígeno viral inactivado (H5N2).

4.6 TITULACIÓN DE ANTÍGENO.

1. Poner 0.5 ml. de PBS con albúmina a dos filas de 12 pozos en una microplaca.
2. Agregar 0.05 ml de antígeno en el primer pozo de cada fila.
3. Utilizando micropipetas o microdiluidores de 0.05 ml, se efectúan diluciones dobles seriadas (1:2 a 1:1024) del antígeno, dejando los dos últimos pozos de cada fila sin antígeno para que sirvan como control de células.
4. Agregar 0.05 ml. de suspensión al 0.5% de eritrocitos a cada pozo y agitar la microplaca para mezclar los reactivos.
5. Cubrir la microplaca e incubar a temperatura ambiente hasta que se forme un botón bien delimitado en el fondo de los pozos para control de células.

Ejp: en la fig. 2 se observa que la titulación del antígeno es de 256, ya que el botón rojo se presenta en la fila No. 8 y secuentemente; En la parte inferior se observan los eritrocitos y su buen estado para relizar la prueba.

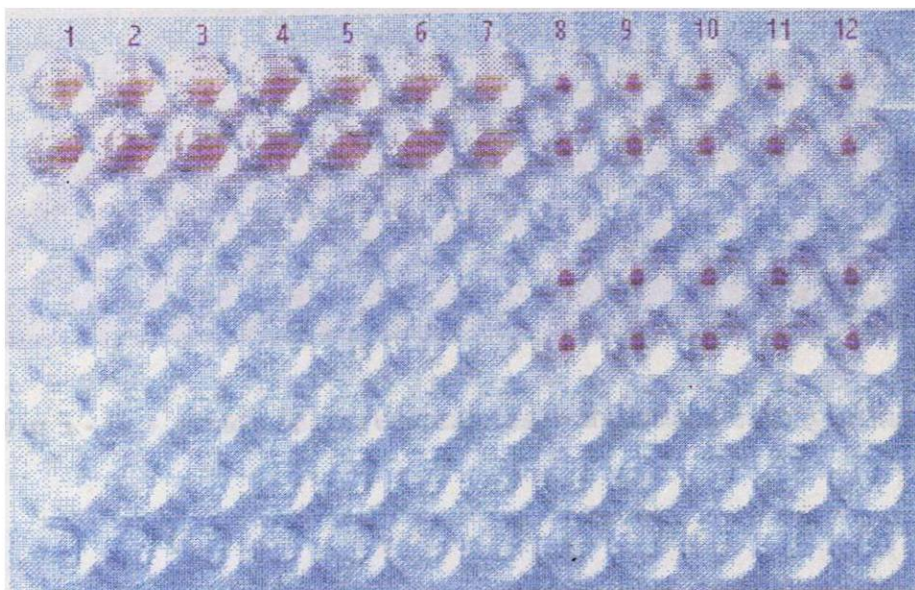


Fig. 2.- Ejp. de una titulación del antígeno.

4.7. CONTROL DEL ANTÍGENO.

La dilución conteniendo las unidades deseadas del antígeno, se determinarán dividiendo el punto final de la HA entre el número de unidades.

Ejp: título del antígeno 256, unidades deseadas 4 ($256/4 = 64$) existirán 4 unidades hemoaglutinantes por cada 0.025 ml. (Fig. 3). Después de agregada la dilución del antígeno se comprobó del número de unidades en la prueba.

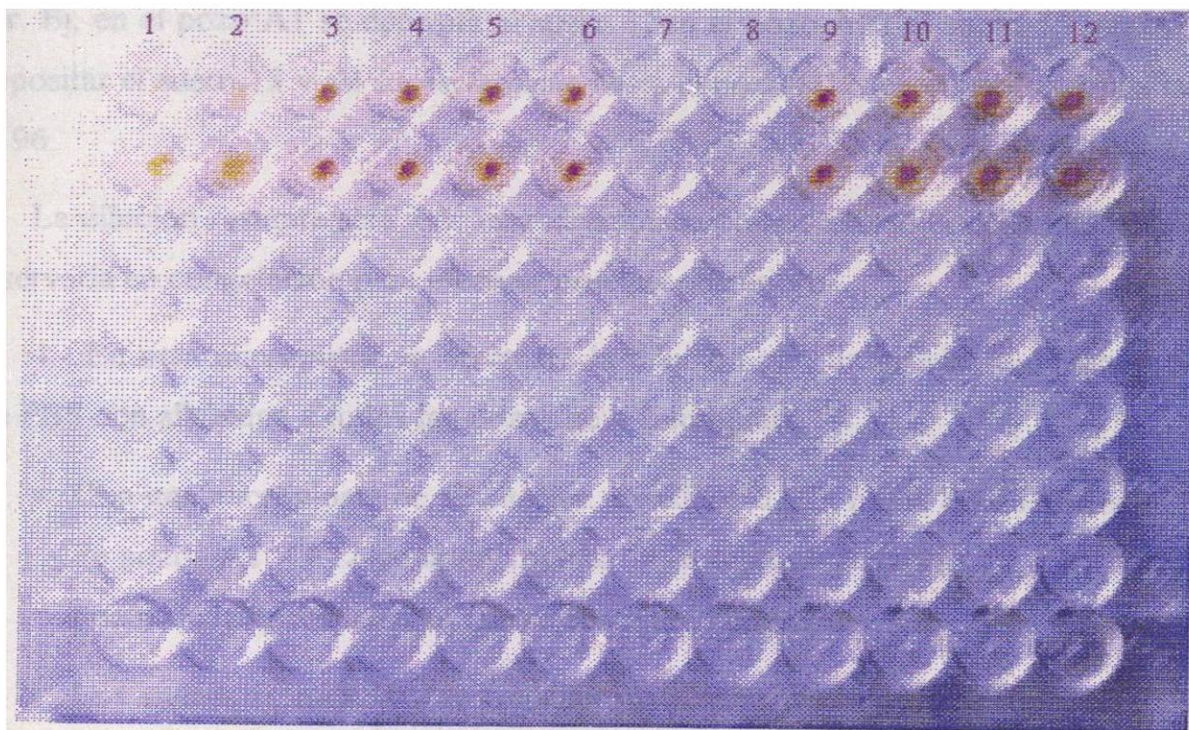


Fig.3.- Ejp. donde se representan las 4 unidades hemoaglutinantes.

4.8. PASOS PARA EFECTUAR LA PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (IH).

Detección de anticuerpos en sueros. (Prueba tamiz)

1.- Identificar y hacer una relación exacta de los sueros que se sometieron a la prueba.

2.- En una microplaca identificada como placa de la dilución inicial, se deposita en todos los pozos 0.100 ml de PBS con albúmina.

3.- Siguiendo un orden secuencial, depositar 0.25 ml de los sueros que se van a probar. Ej. en el pozo A1 se deposita el suero 1, en el pozo A12 el suero 12, en el pozo B1 depositar el suero 13 y así sucesivamente hasta el pozo H12, en el que se depositará el suero 96.

La dilución restante será 1:5, esta microplaca con la dilución inicial puede sellarse y conservarla en congelación para efectuar pruebas posteriores.

4.- En otra microplaca, se efectuará la dilución para la prueba, agregando 0.025 ml. de PBS con albúmina a todos los pozos de la microplaca.

- Con una micropipeta de 12 canales, transferir 0.025 ml de los sueros en la línea de pozos A1 - A12 de la microplaca de la dilución inicial (1:5), a la línea A de pozos de la microplaca en que se efectuará la prueba.
- Los sueros se mezcla y se transfiere 0.025 ml. de los pozos de la línea B, se mezcla y se descartan 0.025 ml.
- En la línea A la dilución será 1:10 y en la línea B la dilución es 1:20.

Esta operación se repite con los demás sueros empleando 2 pozos por cada suero, en cada microplaca se debe poner un suero positivo, negativo y un control de eritrocitos.

5.- Una vez efectuadas las diluciones agregar 0.025 ml del antígeno de Influenza Aviar conteniendo 4 unidades hemoaglutinantes, cubrir y agitar la microplaca incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

6.- Agregar 0.05 ml de suspensión de eritrocitos al 0.5% a cada pozo, cubrir y agitar la placa, incubar a temperatura ambiente hasta que los eritrocitos en el control de células se sedimenten. (30 - 45 minutos).

4.9. INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA.

La lectura de la prueba se realiza cuando los eritrocitos del control de células se sedimenten, formando un botón circular con bordes bien delimitados en el fondo del pozo. La inhibición de la hemoaglutinación producida por los sueros positivos tiene un patrón semejante al control de células, un botón circular con bordes definidos que se desliza tomando la forma de una lágrima en el fondo del pozo, si la placa se inclina en un ángulo de 45 grados. Los sueros negativos no alcanzan a inhibir la hemoaglutinación, todos los sueros que produzcan inhibición de la hemoaglutinación franca de la dilución 1:10 se consideran positivos.

Ejp: en la fig. 3 se observan 4 pruebas de IH, la línea A y B resultaron negativas mientras que las líneas C y D resultaron positivas ambas en la dilución 1:160, ya que en los pozos 6C y 6D no hubo hemoaglutinación, en la parte inferior están los eritrocitos.

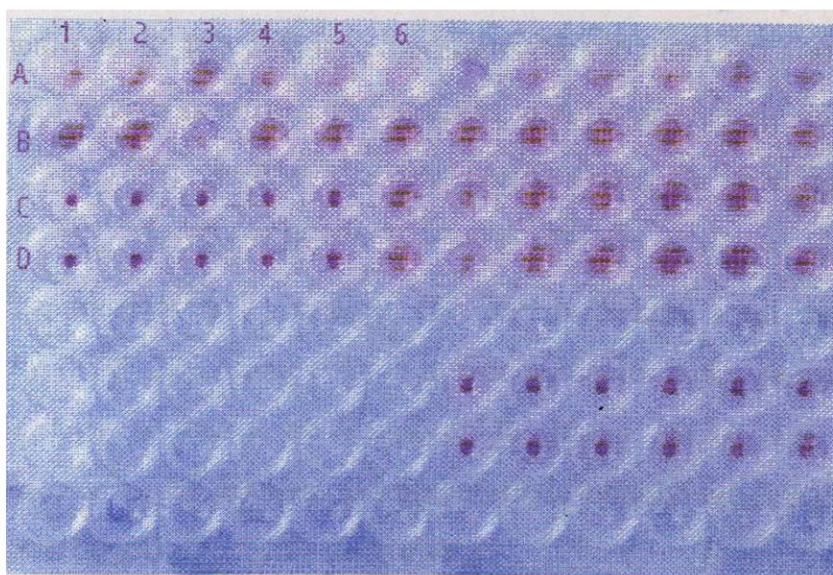


Fig.4.- 4 pruebas de IH, 2 negativas (A y B) y 2 positivas en dilución 1:160 (C y D).

5. RESULTADOS

5.1. RELACIÓN ENTRE LA SEROPOSITIVIDAD CONTRA I.A. Y LA CANTIDAD DE GRANJAS POR GRUPO GEOGRÁFICO.

En total se analizaron 80 granjas, divididos en 5 grupos o zonas geográficas; a continuación se muestra un análisis por grupo del número de granjas, población aviar, número de aves muestreadas, de muestras positivas y porcentaje de positividad.

De las granjas analizadas del grupo 1 se observaron 23 granjas con un promedio de 28,590 gallinas en cada granja, (cuadro 2) en ellas se observaron rangos variables, el mayor de 115,000 aves en la granja y el menor de 9,793. En este grupo existieron 56 sueros positivos en 11 granjas, presentándose con un mayor porcentaje en la granja No. 36, y el menor porcentaje en la granja No.15 entre las granjas positivas. El porcentaje de positividad total fué de 8.4% y el promedio de muestras positivas para este grupo fué 2.43.

De las granjas que se analizaron en el grupo 2, existieron 22 granjas, (cuadro 3) presentándose un promedio de 42,183 gallinas con rangos de 196,484 a 10,500 por granja. En total se presentaron 33 sueros positivos en 6 granjas, con un porcentaje de positividad de 3.52% en la granja No. 67 se observó el mayor porcentaje y en la granja No.52 el menor, con un promedio de 1.5 muestras positivas en este grupo.

En el grupo 3 se analizaron 31 granjas con una población total de 1'504,831 gallinas, con un promedio de 48,220 (cuadro 4); la mayor población aviar se presentó en la granja No.4 con 210,751, y la menor de 7,267 en la granja No.10. En este grupo existieron 99 sueros positivos en 12 granjas, el porcentaje de positividad fué de 6.73 % y un promedio de 3.29 muestras positivas en este grupo.

En el grupo 4 existieron solo 3 granjas (cuadro 5) con una población total de 74,530 y un promedio de 24,843 aves. En este grupo existieron 2 granjas positivas y un

total de 6 sueros positivos, el porcentaje de positividad fué de 8.0 %, con un promedio de 2 sueros positivos por granja para este grupo.

En el grupo 5 (cuadro 6) solo existió 1 granja con una población de 23,540 y debido a diferentes factores y a la exigente bioseguridad que se manejó, en todos los análisis que se le practicaron dieron resultados negativos.

5.2. ANÁLISIS DE LOS CINCO GRUPOS.

Con estos datos recolectados se observó que; el grupo 3 presentó la mayor cantidad de granjas con 31, y el grupo 5 presentó el menor número con solo 1 granja (cuadro 7, fig. 2). Así mismo el grupo 3 presentó la mayor cantidad de granjas afectadas, siguiéndole el grupo 1, y el grupo 5 no presentó serología positiva; en conjunto los 5 grupos representaron un total de 80 granjas con una población de 3'188,501 aves. El porcentaje de granjas afectadas fue mayor para el grupo 4, y menor para el grupo 5 ya que no existió serología positiva. En el presente estudio se obtuvo un total de 38.75 % de granjas positivas. Una vez obtenidos los resultados de las muestras positivas se observó que el grupo 3 obtuvo la mayor cantidad con una y del grupo 5 no se obtuvieron granjas positivas por lo tanto los datos no pudieron ser procesados. El número de muestras positivas fué analizado mediante la prueba de X^2 encontrándose diferencias altamente significativas en los grupos 1,2 y 3. Lo anterior nos indica que en esos grupos el número de muestras positivas es muy alto para ser producido al azar o por errores de método.

Siguiendo con el análisis estadístico, se realizó una prueba de límites de confianza de las muestras positivas con una confiabilidad del 95%. representando en forma total en este estudio el límite inferior fué de 0.053 y 0.069 para el límite superior (cuadro 8). Esto nos indica los porcentajes de muestras positivas mínimo y máximo por grupo, siendo el total de 5.3%.

CUADRO 2.- Relación de la seropositividad contra IA en gallinas del grupo 1.

<i>GRUPO No. 1</i>				
CLAVE DE GRANJA	AVES POR GRANJA	AVES MUESTREADAS	POSITIVAS	PORCENTAJE DE POSITIVIDAD
8	32,773	33	0	0 %
11	13,291	14	0	0 %
12	9,793	10	0	0 %
13	18,261	19	0	0 %
14	21,923	22	0	0 %
15	24,500	25	1	4.0 %
16	20,500	21	7	33.3 %
19	21,200	22	1	4.5 %
20	20,000	20	1	5.0 %
22	14,000	14	0	0 %
23	115,000	116	16	13.7 %
25	18,000	18	5	27.7 %
26	62,442	63	7	11.1 %
27	15,335	16	0	0 %
34	29,400	30	6	20 %
36	16,000	16	6	37.5 %
38	30,000	30	3	10 %
39	30,655	31	0	0 %
40	15,400	16	3	18.7 %
43	40,000	40	0	0 %
71	33,878	34	0	0 %
72	25,733	26	0	0 %
77	29,487	30	0	0 %
TOTAL	657,571	666	56	8.4 %
PROMEDIO	28,590	29	2.43	

CUADRO 3.- Relación de la seropositividad contra IA gallinas del grupo 2.

<i>GRUPO No. 2</i>				
CLAVE DE GRANJA	AVES POR GRANJA	AVES MUESTREADAS	POSITIVAS	PORCENTAJE DE POSITIVIDAD
2	14,000	14	0	0 %
3	54,000	54	0	0 %
5	38,468	39	0	0 %
28	196,484	197	0	0 %
30	38,285	39	6	15.3 %
31	20,000	20	0	0 %
32	21,370	22	0	0 %
33	32,800	33	6	18.1 %
42	11,600	12	3	25 %
45	60,000	60	0	0 %
50	19,000	19	0	0 %
51	40,287	41	0	0 %
52	72,830	73	3	4.1 %
53	17,380	18	0	0 %
63	18,000	18	0	0 %
64	36,000	36	0	0 %
65	10,500	11	0	0 %
66	74,800	75	5	6.6 %
67	12,618	13	10	76.9 %
69	40,746	41	0	0 %
75	16,490	17	0	0 %
78	82,371	83	0	0 %
TOTAL	928,029	935	33	3.52 %
PROMEDIO	42,183	43	1.5	

CUADRO 4.- Relación de la seropositividad contra IA en gallinas del grupo 3.

GRUPO No 3

CLAVE DE GRANJA	AVES POR GRANJA	AVES MUESTREADAS	POSITIVAS	PORCENTAJE DE POSITIVIDAD
4	210,751	211	7	3.3 %
6	12,422	13	0	0 %
9	35,700	36	0	0 %
10	7,267	8	0	0 %
17	21,000	21	3	14.2 %
18	15,092	16	0	0 %
21	21,000	21	0	0 %
24	13,000	13	0	0 %
29	77,450	78	9	11.5 %
35	10,000	10	4	40.0 %
37	17,300	18	16	88.8 %
41	7,700	8	0	0 %
44	20,000	20	0	0 %
46	51,895	52	0	0 %
47	99,000	99	10	10.1 %
48	130,160	131	7	5.3 %
49	27,800	28	13	46.4 %
54	19,000	19	0	0 %
55	37,728	38	0	0 %
56	17,780	18	0	0 %
57	64,700	65	6	9.2 %
59	68,600	69	0	0 %
60	8,250	9	0	0 %

CUADRO 4 CONTINUACIÓN

CLAVE DE GRANJA	AVES POR GRANJA	AVES MUESTREADAS	POSITIVAS	PORCENTAJE DE POSITIVIDAD
61	120,300	121	11	9.0 %
62	46,954	47	1	2.1 %
70	22,000	22	0	0 %
73	14,400	15	0	0 %
74	109,792	110	12	10.9 %
76	44,679	45	0	0 %
79	138,111	139	0	0 %
80	15,000	15	0	0 %
TOTAL	1'504,831	1515	102	6.73 %
PROMEDIO	48,220	49	3.29	

CUADRO 5.- Relación de la seropositividad contra IA en gallinas del grupo 4

GRUPO No. 4				
CLAVE DE GRANJA	AVES POR GRANJA	AVES MUESTREADAS	POSITIVAS	PORCENTAJE DE POSITIVIDAD
7	16,530	17	2	11.7 %
58	31,000	31	4	12.9 %
68	27,000	27	0	0 %
TOTAL	74,530	75	6	8.0 %
PROMEDIO	24,843	25	2	

CUADRO 6.- Relación de la seropositividad contra IA en gallinas del grupo 5

GRUPO No. 5				
CLAVE DE GRANJA	AVES POR GRANJA	AVES MUESTREADAS	POSITIVAS	PORCENTAJE DE POSITIVIDAD
1	23,540	24	0	0 %

CUADRO 7.- Relación del total de seropositividad contra IA en los cinco grupos.

GRUPO	1	2	3	4	5	TOTAL
No. DE GRANJAS	23	22	31	3	1	80
No. DE GRANJAS POSITIVAS	11	6	12	2	0	31
PORCENTAJE DE GRANJAS AFECTADAS	47.82 %	27.27 %	38.7 %	66.6 %	0 %	38.75 %
AVES TOTALES	657,571	928,029	1'504,831	74,530	23,540	3'188,501
AVES MUESTREADAS	658	935	1,515	75	24	3,207
MUESTRAS POSITIVAS	56 ¹	33 ²	102 ³	6 ⁴	0 ⁵	197

1.- $X^2 = 40.29$ $P < 0.01$

2.- $X^2 = 38.93$ $P < 0.01$

3.- $X^2 = 50.89$ $P < 0.01$

4.- $X^2 = 9.21$ No significativo

5.- $X^2 =$ No computable

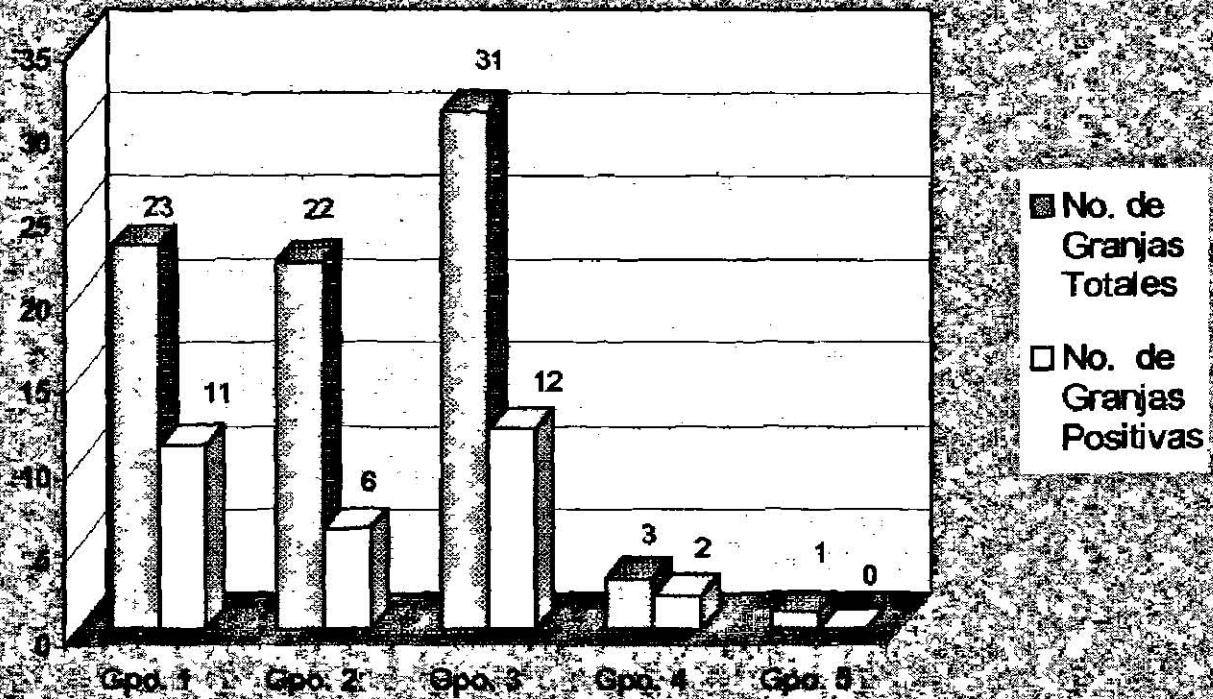
CUADRO 8.- Análisis de los límites de confianza*

GRUPO	MUESTRAS POSITIVAS	AVES MUESTREADAS	PORCENTAJE DE POSITIVIDAD
1	56	666	8.4 %
2	33	935	3.52 %
3	102	1,515	6.73 %
4	6	75	8.0 %
5	0	24	0 %
GLOBAL	197	3,215	6.12 %

GRUPO	LÍMITE INFERIOR	PORCENTAJE	LÍMITE SUPERIOR	PORCENTAJE
1	0.063	6.3 %	0.105	10.5 %
2	0.023	2.3 %	0.047	4.7 %
3	0.054	5.4 %	0.079	7.9 %
4	0.018	1.8 %	0.141	14.1 %
5	—	—	—	—
GLOBAL	0.053	5.3 %	0.069	6.9 %

* Límite superior e inferior con una confiabilidad del 95 %

FIG.5 GRANJAS POSITIVAS POR GRUPO



5.3. RELACIÓN DE LOS SUEROS POSITIVOS

Después de realizar la prueba de laboratorio, y al resultar positivo la muestra se procede a conocer su dilución y posteriormente juntarlas por grupo y hacer el análisis estadístico.

En el Gpo.1 se obtuvieron 56 sueros, de los cuales 32 resultaron en la dilución 1:10, en este grupo se presentó 1 suero positivo en la dilución 1:640 (cuadro 9).

En el Gpo. 2 se recolectaron 33 sueros y siguió prevaleciendo la dilución 1:10 con 21 sueros; la dilución más alta fué de 1:320 con 1 suero (cuadro 9).

En el Gpo. 3 existieron 102 sueros positivos, alcanzando títulos altos en 1:320, pero siguió predominando la dilución más baja de 1:10, ya que se recolectaron 48 sueros, este grupo alcanzó el porcentaje de seropositividad en cada dilución por grupo más alto en casi todas las diluciones (cuadro 9 y 10).

En el Gpo. 4 solo existieron 6 sueros positivos con diluciones de 1:10 a 1:40, predominando la dilución de 1:20 (cuadro 9).

En este trabajo se recolectaron 197 sueros presentándose en varias diluciones, la dilución más alta fué la de 1:640, pero se presentó solo en una ocasión, la dilución que predominó fué la de 1:10 con un total de 103 sueros, lo que nos indica que predominó una baja seropositividad en esta zona (cuadro 9).

5.4. FECHAS DE GRANJAS POSITIVAS

De las 80 granjas estudiadas 31 salieron con títulos positivos en distintas diluciones, éstas fueron apareciendo en diferentes fechas, las primeras aparecieron en febrero de 1996, y las últimas en febrero de 1997, presentándose más granjas positivas en el mes de agosto. En el cuadro 11 se observa a detalle el número de granjas positivas por mes, así como también de que grupo salieron positivas. Se puede observar que la primera granja positiva que apareció fue perteneciente al grupo número 3, seguida por el grupo 2.

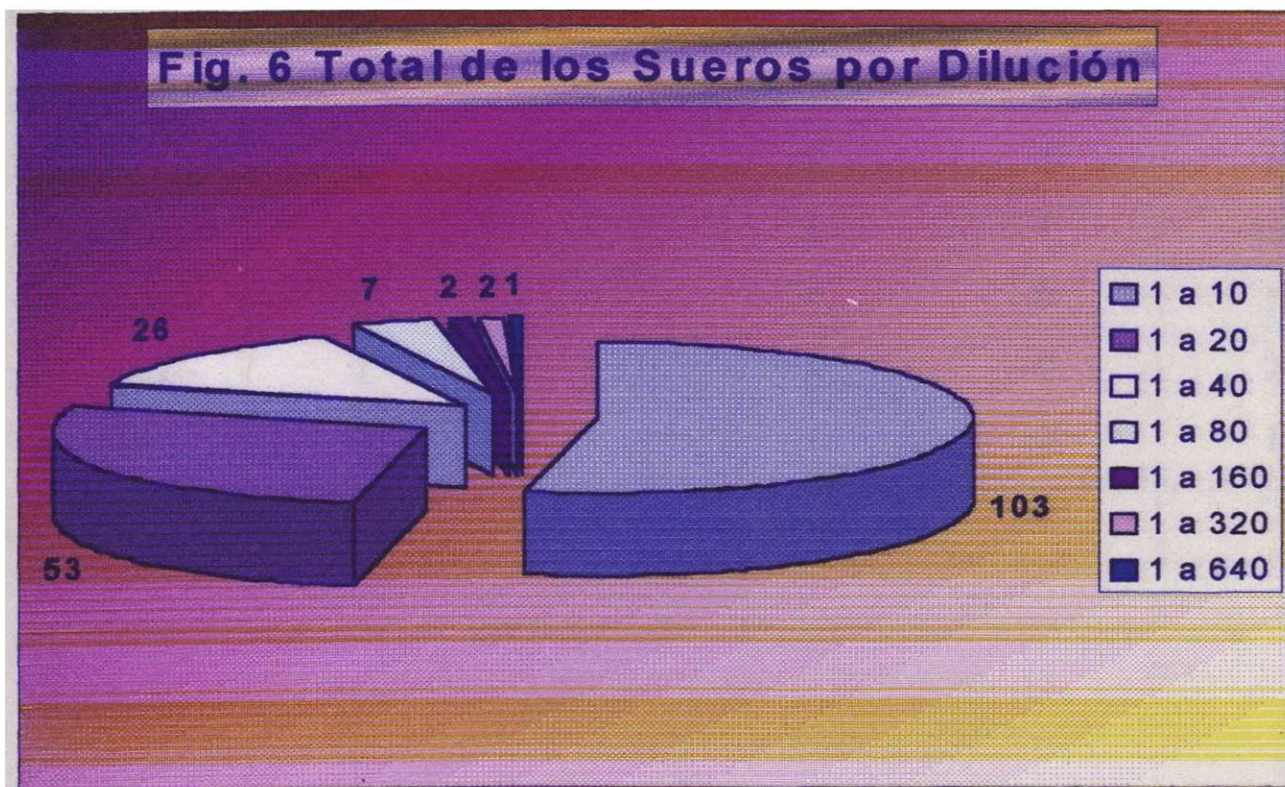
Para mayo de 1996 todos los grupos a excepción del 5 había mostrado positividad. Sin embargo para esta fecha ya no existían granjas positivas en el gpo. 2, y no es hasta agosto del mismo año en que se detectaron muestras positivas en los grupos 1,2,3 y 4; después de lo cual, los grupos 3 y 4 se mantuvieron negativos. En general se observó mayor incidencia de IA en los grupos 1 y 3, los cuales están muy próximos entre sí, mientras que el grupo más alejado (grupo 5) no se encontró IA. Lo anterior podrá indicar que la proximidad geográfica es un factor para la dispersión de IA.

CUADRO 9.- Relación de las muestras positivas.

DILUCIÓN	GPO. 1	GPO. 2	GPO. 3	GPO. 4	TOTAL
1:10	32	21	48	2	103
1:20	17	7	29	3	56
1:40	4	4	17	1	26
1:80	2	0	5	0	7
1:160	0	0	2	0	2
1:320	0	1	1	0	2
1:640	1	0	0	0	1
TOTAL	56	33	102	6	197

CUADRO 10.- Porcentaje de seropositividad de cada dilución en cada grupo.

DILUCIÓN	GPO. 1	GPO. 2	GPO. 3	GPO. 4	TOTAL
1:10	31.067 %	20.388 %	46.601 %	1.941 %	99.99 %
1:20	30.357 %	12.5 %	51.785 %	5.357 %	99.99 %
1:40	15.38 %	15.38 %	65.38 %	3.84 %	99.98 %
1:80	28.57 %	0 %	71.42 %	0 %	99.98 %
1:160	0 %	0 %	100 %	0 %	99.99 %
1:320	0 %	50 %	50 %	0 %	100 %
1:640	100 %	0 %	0 %	0 %	100 %

Fig. 6 Total de los Sueros por Dilución

CUADRO 11.- Relación de las granjas positivas y la fecha de aparición.

	Gpo. 1	Gpo. 2	Gpo. 3	Gpo. 4	TOTAL
Feb. 1996	0	0	1	0	1
Abril	0	2	5	0	7
Mayo	1	0	1	1	3
Junio	1	0	2	0	3
Julio	1	0	0	0	1
Agosto	7	1	3	1	12
Septiembre	0	1	0	0	1
Noviembre	1	1	0	0	2
Feb. 1997	0	1	0	0	1
TOTAL	11	6	12	2	31

6. DISCUSIÓN

En México se ha encontrado IA, en 1994 se detectó en los estados de Querétaro, Hidalgo y México, la cepa encontrada fué la H5N2 tipo A, y en 1994 se encontró en Aguascalientes, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Morelos, Veracruz, Distrito Federal y Puebla (12).

En el presente estudio se detectó un brote de IA durante los meses de febrero de 1996 a febrero de 1997, varias granjas presentaron serología positiva, en la prueba de IH; García M., Crawford JM y otros reportaron 18 aislamientos en un período de 15 meses (octubre 93 a enero 95) de 6 estados del centro de la República (14).

Respecto a la virulencia, se reportó IA de baja a mediana patogenicidad en Diciembre de 1994, continuando así hasta el mes de enero de 1995 donde se reportó IA altamente patógeno en algunos estados de la República, en este estudio la enfermedad se presentó en la forma de baja patogenicidad, ya que se reportó serología positiva sin llegar a confirmarse la muerte a causa de IA (12).

Estudios recientes reportan brotes de IA altamente patógeno en estados del centro de la República Mexicana, se ha sugerido que estas cepas virulentas surgieron a partir de cepas no virulentas, en este estudio no se identificó la cepa de baja patogenicidad, sin embargo dada la posibilidad de mutación del virus se tomaron medidas de bioseguridad para el control y su posterior erradicación.

A principios de 1995 las autoridades sanitarias permitieron la producción y empleo de una vacuna inactivada emulsionada, en aves de aquellas zonas consideradas de riesgo, en este estudio se permitió la vacunación a las aves por única ocasión en las granjas que resultaron positivas, con el fin de evitar la dispersión del virus para posteriormente despoblar la granja.

En granjas con serología sospechosa, se efectuaron remuestreos periódicos a fin de obtener certeza de su condición.

En enero de 1995 fué confirmado el diagnóstico de IA, virus H5N2 de alta virulencia en 3 granjas de postura comercial en Tehuacán, se procedió a la despoblación; en este caso se otorgó un plazo razonable para la despoblación total de la granja, en aquellas que se autorizó la vacunación, ya que solo existió serología positiva (39).

Al sacar aves vacunadas, de las granjas se hizo una previa notificación a C.P.A. para que el vehículo fuera custodiado por personal autorizado por este órgano oficial, y así checar la documentación correspondiente y su movilización de la granja al rastro.

Una vez despoblada la granja, CPA constató las medidas de bioseguridad, para así poder levantar la cuarentena para su posterior repoblación.

En las granjas vacunadas se dejaron aves centinelas, (50 por caseta) previamente identificadas, a fin de realizarles remuestreos periódicos.

Se estableció un programa oficial de certificación de granjas libres de IA.

En el presente estudio se observó un 38.75 % de granjas afectadas, por falta de estudios en otros brotes no se pudo comparar este resultado.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permitieron conocer, la forma en que fué apareciendo la enfermedad llamada Influenza Aviar (IA), así como su proceso de infección y su posterior ausencia en muestras sanguíneas.

Este trabajo se sujetó a la prueba serológica Inhibición de la Hemoaglutinación (IH), ya que es un método adecuado para determinar la presencia de anticuerpos específicos en el suero, y si se diluye el suero se puede determinar la cantidad relativa de anticuerpos.

Toda granja que resultó con serología positiva en dilución 1:10 o mayor se procedió a utilizar la vacuna inactivada emulsionada, la cual protegió a estas aves de los efectos letales y lesiones que ocasiona este virus.

En general se encontraron 31 granjas positivas de un total de 80 (38.75 %) y 197 muestras positivas, de las cuales las pertenecientes al grupo 3 tuvieron títulos más altos y mayor porcentaje de seropositividad en distintas diluciones, además el grupo 3 fué el primero en mostrar seropositividad, por lo cual en esta zona se inició la epizootia y de ahí se dispersó a los grupos más cercanos, aunque con menor patogenicidad.

Después de despoblar la granja que resultó positiva, y al realizar las correspondientes medidas de bioseguridad, se procedió a dejar aves centinelas, el 100% de éstas, resultó con serología negativa por lo que se deduce que no existió contaminación viral.

No se detectó en ninguna granja signos o lesiones, de esta enfermedad por lo tanto no fué posible realizar ningún aislamiento virológico.

El único subtipo identificado en México, hasta la fecha de este trabajo fué H5N2.

El por que IA afectó solo a unas granjas y no desarrolló un problema mayor es aún tema de discusión.

De no presentarse una contingencia, la avicultura mexicana podría quedar libre de IA de baja patogenicidad durante 1999.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alanís, G.; García, T.; Salazar, S; Salazar, T. 1994. Allende, N.L. Inventario de un Pueblo. Ed. Grafo Print Editores. pág. 25 México D.F.
2. Anónimo a. 1996. Boletín informativo sobre influenza aviar. DINESA. 27: 15-30. México D.F.
3. Anónimo b. 1997. Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal, Influenza Aviar. SAGAR. 10: 3-35. México D.F.
4. Barr, D.A. and M.D. O'Rourke. 1995. Avian Influenza Pathology, Virology and Serology. J. Gen Virology. 10: 46-58. Australia.
5. Biester, H.E. y L.H. Schwarte. 1964. Enfermedades de las aves. Ed. Hispano Americana, 5a. edición. págs. 609 – 617. México D.F.
6. Brugh, M. 1996. Patogenicidad de tres virus IA para gallinas Leghorn jóvenes y viejas. Avian Disease. 40 (3): 725 - 728.
7. Calnek, B.W. 1995. Enfermedades de las aves. Ed. Manual Moderno. págs. 651 – 668.
8. Castro-Mendoza. 1995. Examen General de Calidad Profesional. CENEVAL. págs. 8-10.
9. Condobery, P.K. y R.D. Slemons. 1992. Características biológicas de los virus de influenza tipo A originados en aves acuáticas e inoculados en pollos. Avian Disease. 36 (1): 17-23.
10. Cunningham, C.H. 1971. Virología práctica. Ed. Acriba. págs: 317 – 345. España.
11. Fenner, F.J. y D.O. White. 1978. Virología Médica. Ed. La Prensa Médica Mexicana. págs: 262 – 285. México D.F.

12. Flores, H.; C. Villarreal; C. Flores; G. García; H. López; A. Medina; S. Solís y C. Rivera. 1997. *La Influenza Aviar en México Memoria*. Ed. Comunicación Gráfica. México, D.F.

13. Futumbi, O.; A. Newman; A. Halvorson. y V. Sivanandan. 1993. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de antígenos del virus IA bajo diferentes condiciones de aislamiento. *Avian Disease*. 37 (3): 639 - 646.

14. García, M.; J.M. Crawford; E. Rivera-Cruz and M.L. Perdue. 1996. Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *J. Gen. Virology*. 77 (Pt 7): 1493 - 1504.

15. Graves, I.L. 1992. Virus influenza aviar en aves de la ruta aérea migratoria del Atlántico. *Avian Disease*. 36 (1): 1 - 10.

16. Halvorson, A.; V. Sivanandan. y D. Laver. 1992. Influenza en reproductoras pesadas. *Avian Disease*. 36 (1): 177 - 179.

17. Hinshaw, V.S.; V.F. Nettles; L.F. Schorr; J.M. Wood y R.G. Webster. 1986. Vigilancia epidemiológica del virus influenza aviar en aves acuáticas en Pensilvania posterior al brote con el serotipo H5N2. *Avian Disease*. 30 (1): 207 - 212.

18. Horimoto, T.; E. Rivera; J. Pearson; D. Senne; S. Krauss; Y. Kawaoka. and R.G. Webster. 1995. Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. *J. Gen Virology*. 213 (1): 223 - 230.

19. Horimoto, T. and Y. Kawaoka. 1995. Direct reverse transcriptase PCR to determine virulence potential of influenza A viruses in birds. *J. Clin. Microbiology*. 33 (3): 748 - 751.

20. Kawaoka, Y. and R.G. Webster. 1985 Evolution of the A/Chicken/Pennsylvania/83 (H5N2) influenza virus. *J. Gen. Virology*. 146 (1): 130 - 137.

21. Kodihalli, S.; J.R. Haynes; H.L. Robinson. and R.G. Webster. 1997. Cross-protection lethal H5N2 influenza Viruses induced by DNA vaccine to the hemagglutinin. *J. Virology*. 71 (5): 3391 – 3396.
22. Kodihalli, S.; V. Sivanandan; K.V. Nagaraja; D. Shaw; y D.A. Halvorson. 1994. Efecto de la infección por el virus influenza aviar sobre la función fagocítica de los fagocitos sistémicos y los macrófagos pulmonares de pavos. *Avian Disease*. 38 (1): 93 - 107.
23. Laudert, E.; V. Sivanandan. y D. Halvorson. 1983. Efecto de la infección por el virus influenza aviar H5N1 sobre el sistema inmune de patos mallard. *Avian Disease*. 37 (3): 845 - 853.
24. Leal-Perales, Oscar. 1996. Manual de enfermedades bacterianas y virales de las aves, págs. 73 - 80. F.M.V.Z. UANL.
25. Merchant y R.A. Packer. 1958. *Bacteriología Veterinaria*. Ed. Acriba. España.
26. Merchant y R.A. Packer. 1958. *Virus filtrable*. Ed. Acriba. España.
27. Mohanty, S.B. y S.K. Dutta. 1983. *Virología Veterinaria*. Ed. Interamericana. México, D.F.
28. Panigraphy, B.; D.A. Senne. y J.E. Pearson. 1995. Presencia de los subtipos del virus influenza aviar H5N2 y H7N1 en emúes y ñadues: Aislamiento del virus y resultados serológicos. *Avian Disease*. 39 (1): 64-67.
29. Perdue, M.L.; M. Garcia; D. Senne; and M. Fraire. 1997. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res*. 49 (2): 173 – 186.
30. Perdue, M.L.; J.W. Latimer. and J.M. Crawford. 1995. A novel Carbohydrate addition site on the hemagglutinin protein of a highly pathogenic H7 subtype avian influenza virus. *J. Gen Virology*. 213 (1): 276 – 281.
31. Scleifer, J. 1995. Entendiendo la influenza aviar. *Industria Avícola*. 3: 8 - 10.

32. Silvano, F.D.; Y. Kanata; M. Takeuchi; A. Shimada; K. Otsuki, and T. Umemura. 1997. Avian influenza virus induced stunting syndrome-like disease in chicks. *J. Vet. Sci.* 59 (3): 205 – 207.
33. Slemons, R.D.; P.K. Condobery; y D.E. Swayne. 1991. Cálculo del potencial patógeno para pollos del virus influenza aviar tipo A originados en aves acuáticas. *Avian Disease*. 35 (4): 15 - 17.
34. Slemons, R.D.; M.C. Shieldcastle; L.D. Heyman; K.E. Bednarik; y D.E. Senne. 1991. Virus influenza aviar tipo A en aves acuáticas de Ohio y sus implicaciones para pavos domésticos. *Avian Disease*. 35 (1): 165 - 173.
35. Tizard, I. 1987. *Inmunología Veterinaria*. Ed. Interamericana, 3a. edición.
36. Van Deusen, R.A.; V.S. Hinshaw; D.A. Senne; and D. Pellacani 1983. Micro neuraminidase - inhibition assay for classification of influenza A virus neuraminidases. *Avian Disease* 27 (3): 745 - 750.
37. Wainright, P. O.; M.L. Perdue; M. Brugh; y C.W. Beard. 1991. Resistencia a la amantadina en cepas del virus influenza aviar con hemoaglutinina del subtipo 5. *Avian Disease*. 35 (1): 31 - 39.
38. Webster, R.G.; J. Taylor; J. Pearson; E. Rivera, and E. Paoletti. 1996. Immunity to Mexican H5N2 avian influenza viruses induced by a fowl pox-H5 recombinat. *Avian Disease*. 40 (2): 461 – 465.
39. Zeckua, A.; C. Espinoza; M. Fraire; and E. Rivera. 1994. *Manual Técnico y de Procedimientos Para la Aprobación de Médicos Veterinarios Influenza Aviar*. Ed. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. págs: 7 – 29.

