

979

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

DETERMINACION DE ANTICUERPOS CIRCULANTES CONTRA LA
ENFERMEDAD DE INFLUENZA AVIAR MEDIANTE LAS PRUEBAS DE
PRECIPITACION EN AGAR GEL (PAG), INHIBICION DE LA
HEMOAGLUTINACION (HI), E INMUNOABSORCION DE ENZIMAS ASOCIADAS
(ELISA) REALIZADAS EN EL LABORATORIO CENTRAL DE DIGESEPE EN EL
PERIODO COMPRENDIDO DE MARZO A AGOSTO DE 1997.



TESIS

PRÉSENTADA A LA JUNTA DIRECTIVA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

POR

LILIAN LUCRECIA ARENS ALVARADO

AL CONFERIRSELE EL TITULO ACADEMICO DE

MEDICO VETERINARIO

GUATEMALA, ABRIL DE 1998

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

| | |
|-----------------|----------------------|
| DECANO : | Lic. RODOLFO CHANG. |
| SECRETARIO : | Dr. MIGUEL AZAÑON. |
| VOCAL PRIMERO : | Lic. ROMULO GRAMAJO. |
| VOCAL SEGUNDO : | Dr. OTTO LIMA. |
| VOCAL TERCERO : | Dr. MARIO MOTTA. |
| VOCAL CUARTO : | Br. JOSE MORENO. |
| VOCAL QUINTO : | Br. EDUARDO RODAS. |

ASESORES.

Dra. ELIZABETH PADILLA DE MOTTA.
Dra. LUCRECIA MOTTA RODRIGUEZ.
Dra. BEATRIZ SANTIZO CIFUENTES.
Dr. JAIME MENDEZ.

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

EN CUMPLIMIENTO CON LO ESTABLECIDO POR LOS ESTATUTOS DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA PRESENTO A
CONSIDERACION DE USTEDES EL TRABAJO DE TESIS TITULADO :

DETERMINACION DE ANTICUERPOS CIRCULANTES CONTRA LA
ENFERMEDAD DE INFLUENZA AVIAR MEDIANTE LAS PRUEBAS DE
PRECIPITACION EN AGAR GEL (PAG), INHIBICION DE LA
HEMOAGLUTINACION (HI), E INMUNOABSORCION DE ENZIMAS ASOCIADAS
(ELISA) REALIZADAS EN EL LABORATORIO CENTRAL DE DIGESEPE EN EL
PERIODO COMPRENDIDO DE MARZO A AGOSTO DE 1997.

QUE ME FUERA APROBADO POR LA
JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA PREVIO A OPTAR AL TITULO PROFESIONAL DE :

MEDICO VETERINARIO

TESIS QUE DEDICO

A DIOS :

POR HABERME PERMITIDO
CULMINAR MI CARRERA.

A LA VIRGEN MARIA :

QUIEN SIEMPRE HA ESTADO A MI
LADO.

A MIS PADRES :

ANA MARIA ALVARADO DE ARENS
como un pequeño reconocimiento a su
amor, apoyo y sacrificio para con sus
hijos.
ANGEL ROBERTO ARENS
por haberme dado mi mejor regalo mis
estudios.

A MI HIJA :

DIANA MARISOL FIGUEROA ARENS
lo más importante en mi vida, con todo
mi amor.

A MI ESPOSO :

SERGIO RAUL FIGUEROA BARRIOS
gracias por su apoyo y con amor sincero

A MIS HERMANOS :

DOUGLAS ROBERTO ARENS A
ANA ELIZABETH ARENS A
con cariño.

A MIS SOBRINOS :

CHRISTIAN A. ARENS ALVARADO
ANDREA CELESTE A. ARENS
ASTRID EMILIA ARENS E.
con todo mi cariño.

A MI MADRINA :

JULIA HORTENCIA ALVARADO C.
por brindarme su apoyo y cariño.

A MIS ABUELITOS :

MAMA ROSA CUMES
con especial cariño y respeto.

A MI FAMILIA EN GENERAL :

con aprecio.

A MIS AMIGAS :

EVA SUSANA HUERTAS (Q.P.D.)
por estar conmigo en cada momento de
mi vida.

MAYRA L. MOTTA PADILLA
por su paciencia y valiosa ayuda
prestada en esta investigación y que
comparto con Ella.

JESSICA M. PACAS MARTINEZ
por su apoyo y cariño.

ACTO QUE DEDICO

A MI PATRIA GUATEMALA.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

A MIS ASESORES :

Dra. ELIZABETH PADILLA DE MOTTA
Dra. LUCRECIA MOTTA RODRIGUEZ
Dra. BEATRIZ SANTIZO CIFUENTES
Dr. JAIME MENDEZ

A MI HIJA :

DIANA MARISOL FIGUEROA ARENS.

A MIS PADRINOS :

Dr. FRANCISCO ESTRADA
Dr. ROLANDO MATAMOROS
Dr. MIGUEL ANGEL RUIZ
por ser un ejemplo en mi vida y
brindarme los más sabios consejos.

A MIS CATEDRATICOS :

Por brindarme su amistad y sus
conocimientos.

A MIS AMIGAS :

SUSANA HUERTAS (Q.P.D.),
MAYRA MOTTA y JESSICA PACAS.

A MIS COMPAÑEROS :

de promoción y nuevos colegas por
los momentos que compartimos.
en especial a: José Estuardo Barrios

A USTED :

que me acompaña en este día.

AGRADECIMIENTOS

- A :** MIS ASESORES por el tiempo y conocimientos dedicados para la realización de la presente investigación.
- AL :** Laboratorio de la Empresa Avícola Villalobos, en especial a la Dra. ELIZABETH PADILLA DE MOTTA y al Sr. HUGO BLANCO, sin cuya colaboración no se hubiera podido llevar a cabo esta investigación.
- AL :** Laboratorio Central de DIGESEPE en especial a la Dra. LUCKY MOTTA, así como al personal técnico y administrativo que labora en este lugar.
- A :** La familia MOTTA PADILLA, por su valiosa y desinteresada colaboración.
- AL :** Dr. YERI VELIZ.
- A :** Todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de esta investigación.

INDICE

| | |
|---------------------------------------|----|
| I. INTRODUCCION..... | 1 |
| II. OBJETIVOS..... | 3 |
| GENERALES..... | 3 |
| ESPECIFICOS..... | 3 |
| III. REVISION DE LITERATURA..... | 4 |
| INFLUENZA AVIAR..... | 4 |
| <i>Definición :</i> | 4 |
| <i>Sinónimos</i> | 4 |
| <i>Historia</i> | 4 |
| <i>Etiología</i> | 6 |
| <i>Suceptibilidad</i> | 9 |
| <i>Transmisión</i> | 9 |
| <i>Persistencia del Virus</i> | 11 |
| <i>Periodo de Incubación</i> | 12 |
| <i>Morbilidad y Mortalidad</i> | 12 |
| <i>Signos Clínicos</i> | 12 |
| <i>Lesiones Macroscópicas :</i> | 14 |
| <i>Lesiones Microscópicas :</i> | 15 |
| <i>Diagnóstico :</i> | 16 |
| <i>Tratamiento</i> | 20 |
| <i>Prevención y Control</i> | 21 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 25 |
| <i>Recursos Humanos</i> | 25 |

| | |
|--|-----------|
| <i>Material Biológico</i> | 25 |
| <i>Materiales de Laboratorio</i> | 26 |
| <i>Materiales de Campo</i> | 26 |
| <i>Metodología</i> | 27 |
| <i>Análisis de Datos</i> | 31 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSION | 32 |
| VI. CONCLUSIONES | 34 |
| VII. RECOMENDACIONES | 35 |
| VIII. RESUMEN | 36 |
| IX. SUMMARY | 37 |
| X. BIBLIOGRAFIA | 38 |
| XI. ANEXOS | 42 |

INDICE DE FICHAS

FICHA 1.

TEMPLE PARA LA PERFORACIÓN DE ROSETAS EN EL MEDIO DE AGAROSA PRUEBA DE
PAG. LABORATORIO CENTRAL DE DIGESEPE. GUATEMALA, ENERO 1998.43

FICHA 2.

PLANTILLA PARA LA ANOTACIÓN DE LA LECTURA DELA ABSORBANCIA DE LOS
SUEROS PROBLEMA, SUERO CONTROL POSITIVO, Y SUERO CONTROL NEGATIVO.
PRUEBA DE ELISA. LABORATORIO AVÍCOLA VILLALOBOS.

GUATEMALA, ENERO 1998.....44

FICHA 3.

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA LA ENFERMEDAD DE
INFLUENZA AVIAR. LABORATORIO CENTRAL DE DIGESEPE. GUATEMALA, ENERO
1998.45

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1.

**PROCEDENCIA DE SUEROS FALSO - POSITIVOS PARA LA PRUEBA DE ELISA, EN LOS
DIFERENTES DEPARTAMENTOS PARA LA ENFERMEDAD DE INFLUENZA AVIAR.
GUATEMALA ABRIL DE 1998.....46**

INDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1

COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS FALSO - POSITIVO Y NEGATIVOS DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS DE PAG, HI Y ELISA PARA LA ENFERMEDAD DE INFLUENZA AVIAR47

GRÁFICA 2

PORCENTAJE DE LA PROCEDENCIA DE SUEROS FALSO - POSITIVOS A LA PRUEBA DE ELISA48

I. INTRODUCCION

En Guatemala la avicultura ha evolucionado en los últimos años a grandes pasos, debido a que la crianza de aves tanto tecnificadas como de tipo domiciliar se ha convertido en una fuente de alimentación primordial para la población, ya que los productos que de ella se obtienen como el huevo y la carne son fuente de proteína de alta calidad, indispensables en la nutrición de la población de nuestro país, además llegan a ser fuente de ingresos para las familias de escasos recursos, donde las aves son atendidas por las mujeres y niños. Las explotaciones tanto de tipo tecnificada como domiciliar se ven afectadas por un sin número de enfermedades siendo la Influenza Aviar una de las más temidas.

La Influenza Aviar es una enfermedad viral que causa una variedad de afecciones tanto en las aves de corral como en las aves silvestres. Las aves acuáticas migratorias pueden transportar y diseminar el virus de Influenza Aviar sin padecer o presentar signos de enfermedad. El agente etiológico puede ser infectivo para pollos y pavos, variando en patogenicidad; pudiendo causar grandes consecuencias para la industria avícola como lo ocurrido en el brote de México, representando un riesgo para Guatemala y para los demás países de Centro América en donde actualmente es exótica, pero puede introducirse si no se tiene control sobre el contrabando de aves y subproductos.

De tal manera que a la par de la avanzada tecnología ha crecido la investigación científica en lo que respecta al diagnóstico y control de las diversas

entidades patológicas que afectan a la industria avícola; con el propósito de evitar la introducción accidental de la Influenza Aviar o de cualquier enfermedad exótica que represente una emergencia en las operaciones de la avicultura nacional ; así como de encontrar soluciones y alternativas que permitan proteger y manejar en forma rápida y efectiva los casos iniciales de un brote, ya que esta enfermedad amenaza en convertirse en un problema Centroamericano si no se implementan estrictas medidas de bioseguridad que aseguren la NO introducción del virus de influenza aviar, pues al principio la enfermedad será benigna pero más tarde resultara en un brote de alta patogenicidad y las secuelas en producción serán muy importantes económicamente, ya que muchos hogares guatemaltecos se quedarán sin el sustento diario, por pérdida de sus aves quienes les proporcionan alimento por medio de huevos y carne así como dinero por venta de sus excedentes.

El presente estudio tiene como objetivo llevar a cabo la investigación científica para determinar la presencia de anticuerpos contra la enfermedad de Influenza Aviar por medio de los métodos serológicos de Precipitación en Agar gel (PAG), Inhibición de la Hemoaglutinación (HI) e inmunoabsorción de enzimas asociadas (ELISA).

II. OBJETIVOS

GENERALES.

Determinar la presencia de anticuerpos circulantes contra la enfermedad de influenza aviar mediante el método de Precipitación en Agar Gel (PAG), Inhibición de la Hemoaglutinación (HI), e Inmunoabsorción con enzimas asociadas (ELISA), en suero de aves de traspatio enviadas al laboratorio central de DIGESEPE durante los meses de marzo a agosto de 1997.

ESPECIFICOS.

1. Determinar el estatus de anticuerpos circulantes contra la enfermedad de Influenza Aviar en nuestra población avícola.
2. Determinar la congruencia del método de inmunoabsorción con enzimas asociadas (ELISA) con respecto a los métodos de presipitación en agar gel (PAG) e inhibición de la hemoaglutinación (HI) para el diagnóstico de la enfermedad de influenza aviar.

III. REVISION DE LITERATURA

INFLUENZA AVIAR.

DEFINICIÓN :

La Influenza Aviar es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa de las aves domesticas, puede ser asintomática hasta sistémica fatal, ocasionada por un virus tipo A (H_5N_2) en distintas especies de aves; causando afecciones a nivel del aparato respiratorio, sistema digestivo y nervioso ; además porque puede llegar a causar una mortalidad de hasta el 100 % (6,13,18,27,28,29,34).

SINÓNIMOS.

También es conocida como Peste Aviar, Influenza Aviar Altamente Patógena (IAAP), Influenza Letal, plaga aviar. Y la más reciente Gripe del Pollo. (5,6,15,18,20,26,28).

HISTORIA.

La Influenza Aviar fue descrita desde 1878 por Perroncito, investigador italiano quien la diferenció de aquellas causadas por bacterias. Los italianos Centani y Savunozzi en 1901, fueron los que reportaron que el agente causal era un agente filtrable (virus). (6,26,27)

La Influenza fue primeramente diagnosticada en pollos de América del Norte en el año 1924 cuando el virus salió de un laboratorio de investigación de Estados Unidos hacia el mercado avícola de Nueva York, diseminandose en

varios estados hasta llegar a Missouri. Esta volvió a aparecer en el condado de Morris en New Jearsy en el año 1929, ambos brotes fueron erradicados. (27)

Fue hasta 1955 cuando se demostró que la Peste Aviar era causada por un virus de Influenza tipo A. Para 1981 esta enfermedad ya era considerada como problema mundial. En el año de 1983 se detectó en Estados Unidos un virus de Influenza Aviar Tipo A (H₅N₂) de baja patogenicidad que luego se tornó altamente patógeno debido a una mutación o serie de mutaciones en el gene de la hemoaglutinina ; este brote se presentó en los estados de Pennsylvania y Virginia lográndose erradicar con éxito. (27)

Ha finales de 1993 en el centro de México se presentó una serie de problemas respiratorios atípicos en parvadas de pollos de engorde, aves de postura comercial y reproductores, siendo durante los últimos meses de 1994 y principios de 1995 se reporta oficialmente la enfermedad de influenza aviar altamente patógena. México actualmente está en el proceso de control de la enfermedad. (12,24,26)

Desde el descubrimiento del virus de Influenza Aviar y de que se puede aislar de múltiples especies aviares domésticas y silvestres, se han encontrado brotes de la enfermedad que sugieren que existe un vínculo entre aves y mamíferos para la transmisión natural de virus de Influenza Aviar lo que ocasiona problemas patológicos de importancia (6).

ETIOLOGIA.

El virus de Influenza Aviar es parte de la familia *Orthomyxoviridae*, tiene un tamaño mediano, pleomórfico y contiene RNA con una simetría helicoidal. La partícula viral tiene además una envoltura con proyecciones de glicoproteína conocidas como hemoaglutininas y neuroaminidasas. Estos dos antígenos de superficie, la hemoaglutinina (H) y la neuroaminidasa (N) son la base de la descripción e identificación serológica de virus de Influenza Aviar. (6,7,18,29,30,34)

El virus de Influenza se clasifica serológicamente en 3 tipos : A, B, C ; los virus del grupo A son los más difundidos y de mayor importancia en las aves, los tipos B y C sólo se ha aislado en el humano. Sin embargo a finales del año 1997 en Hong Kong aparece un virus de Influenza tipo A (H_5N_1), que era conocido por infectar a las aves y se cree es el presunto responsable de causar la enfermedad en humanos. (6,7,9,14,15,19,20,28,34)

Actualmente entre los virus de Influenza tipo A, se han descrito 14 antígenos de hemoaglutininas y 9 de neuroaminidasas, estas hemoaglutininas y neuroaminidasas se combinan entre sí y dan diferentes subtipos ; resultando 126 combinaciones antigénicas diferentes de virus de Influenza. (2,9,27)

La hemoaglutinina en sí, es quien determina la patogenicidad viral con las que el virus se adhiere a las células huésped y actúa como mediadora de la fusión con la membrana. La neuroaminidasa actúa como enzima que rompe el ácido neuroamínico, dando así el fenómeno de elución. Hay más proyecciones H que N sobre la superficie del virus siendo algunas veces la proyección H la más

importante porque esta se pega a la superficie de la célula y determina si ésta causa o no la infección. (21,27,32)

La hemaglutinina constituye aproximadamente el 25% de la proteína viral total. Dos proteínas estructurales mayores: la matriz (M_1) la núcleo proteína (NP) sostienen en su lugar a la doble capa de lípidos y a los ocho segmentos de RNA. Las proteínas menores como la polimerasa son las que replican al RNA del genoma y producen ácidos ribonucleicos mensajeros (mRNAs); y la proteína M_2 transmembranaria. (5,6,7,19,21,28,30,32)

La replicación del virus de Influenza se inicia una vez que este entra a la célula huésped por endocitosis, después de la fusión de la membrana viral y huésped (proceso mediante el cambio estructural sobre la hemoaglutinina); las partículas de ribonucleoproteínas virales son liberadas dentro del citoplasma y migran al núcleo de la célula, tomando lugar esa Transcripción y Replicación viral. El virus sale de la célula por gemación de la membrana plasmática. (6,30)

La patogenicidad es una prioridad de la interacción entre el huésped y el virus. Los diversos serotipos virales varían grandemente no solo entre un serotipo y otro, sino también en un mismo serotipo, ya que pueden existir formas de alta, mediana o baja patogenicidad (6,9,34).

La patogenicidad puede ser determinada por la secuencia de aminoácidos en el punto de unión de la hemoaglutinina. La infectividad del virus depende del rompimiento de este punto de unión, el cual se lleva a cabo mediante las proteasas del huésped; la susceptibilidad de la hemoaglutinina a estas proteasas depende del número de aminoácidos básicos y son sensibles a la acción de las

enzimas similares a la tripsina, limitandose así al tracto respiratorio y digestivo. Los virus que tienen múltiples aminoácidos básicos con el punto de unión de la hemoaglutinina pueden replicarse ante la presencia de otras proteasas que se encuentran en el organismo y por ende invaden una gran variedad de órganos y tejidos, resultando una enfermedad generalizada y muerte. Es importante considerar que este virus es altamente mutagénico debido a errores que llegan a suceder en la multiplicación o en sus químicos, y que la información genética está en su RNA de 8 piezas separadas en cada virus y que pueden combinarse entre sí o con piezas de otros virus de Influenza Aviar tipo "A"; pueden crearse nuevos genotipos a través de la MUTACION y de la RECOMBINACION genética, los cuales pueden tener diferentes potenciales patogénicos. En otras palabras si se deja un virus de baja virulencia y no es erradicado este formará un reservorio del cual el virus altamente patógeno podría reemerger tiempo más tarde. (6,12,21,27,32)

Incidencia y Distribución

El virus de Influenza Aviar tiene una distribución mundial. En la distribución de la enfermedad influye: Distribución de las especies tanto domésticas como silvestres, la localidad y la producción de aves de corral, las vías migratorias, la estación y los sistemas de reporte de la enfermedad; así mismo la incidencia es difícil de determinar debido a la variedad de los sistemas de vigilancia. (6,18,28)

SUCEPTIBILIDAD:

En forma natural el virus de la Influenza infecta a mamíferos como: Equinos, porcinos, bovinos; carnívoros: Felinos, caninos, plantigrados, hurones, nutrias; Mamíferos acuáticos: como las ballenas, focas, morsas; primates del viejo y nuevo mundo así como a reptiles, peces y desde luego al hombre. (6,9,14,16,29,33)

El virus de Influenza aviar se encuentran en diversas aves domésticas entre ellas: pavos, pollos, gallinas de Guinea, palomas, perdiz, codorniz, faisán, gansos y patos. En las aves el virus se ha aislado de: patos, gansos, gallinetas, garzas, pingüinos y gaviotas. También se ha aislado el virus en aves de jaulas incluyendo: Estornino asiático, periquitos, loros, caca túas, tejedores, pinzones y halcones. (3,5,6,13)

TRANSMISIÓN:

Directa: El virus de Influenza se trasmite por la movilización de aves infectadas entre parvadas. Además existen evidencias que apoyan la hipótesis de que las aves acuáticas migratorias son generalmente las responsables de introducir el virus en explotaciones de pollos y pavos por reunir las siguientes características:

- a. Son portadoras del virus sin padecer la enfermedad.
- b. Son de naturaleza gregaria, es decir se reúnen en grandes bandadas que favorecen el contacto de individuos susceptibles con los que en un momento dado portan el virus.

- c. Tienen la capacidad de trasladarse a grandes distancias y tener la posibilidad de entrar en contacto con zonas avícolas.

El pato y otras aves acuáticas pueden ser consideradas como reservorio natural del virus de Influenza Aviar, sin embargo nunca se ha podido comprobar satisfactoriamente de que este tipo de aves sean responsables de introducir o diseminar el virus hacia las aves domésticas. (3,5,6,13,27,29)

Por lo anteriormente expuesto el número de aves silvestres que en forma natural albergan el virus de Influenza aviar se reduce y la posibilidad de ser vectores es menor.(6,7,9,27,28,31)

Indirecta: Por medios mecánicos como : Equipo, personal, cartones para huevos, vehículos, o alimento contaminado.(7,26,27,28,29)

El virus se puede aislar en grandes cantidades en las heces y secreciones respiratorias de las aves infectadas. Es lógico suponer que si el virus está presente en las secreciones corporales, la transmisión de la enfermedad puede ocurrir a través del agua contaminada de bebederos comunes o por vía aérea. (3,6,7,26,27)

Las aves pueden ser fácilmente infectadas por la penetración o inoculación del virus en el saco conjuntival, fosas nasales, traquea; las evidencias preliminares de campo y laboratorio indican que el virus puede ser aislado de la yema o albúmina de huevos puestos durante la fase aguda de la enfermedad, por lo que la posibilidad de la transmisión vertical no está descartada, ya que es posible que los embriones infectados puedan sobrevivir representando así un riesgo a considerar. (5,6,7,13,21,28)

Recientemente en el caso de Hong Kong se cree que la enfermedad causada por la nueva cepa del virus tipo A (H₅N₁) pudo ser transmitida al hombre por dos posibles vías: La primera que pudo ser de ave a cerdo y luego al humano; y la segunda que fue directamente de ave a humanos. Siendo esta última aún no confirmada. (14,15,16,20,35)

PERSISTENCIA DEL VIRUS:

Las condiciones del medio tienen un efecto marcado en la supervivencia del virus durante periodos prolongados, en particular en condiciones frescas y húmedas. La infectividad del virus en materia fecal dura un tiempo de 30 a 35 días debido a que el virus está protegido por la presencia de material orgánico, se dice que un gramo de este material fecal contiene alrededor de 10 millones de partículas formadoras de placa capaces de infectar a gran cantidad de aves. Se ha recuperado virus de Influenza de agua de lagos y estanques en donde la concentración de aves acuáticas es grande. El virus puede persistir en subproductos de aves a temperatura ambiente y en refrigeración hasta 23 días. (2,6,13,21)

Debido a que el virus de Influenza Aviar tiene envoltura, son relativamente sensibles a la inactivación por medios de: formalina, detergentes, beta-propiolactona, yodo, agentes oxidantes, éter, iones de amonio, hipoclorito de sodio. Además se pueden inactivar por cambios bruscos de pH (alcalinos y ácidos), rayos solares, ebullición y desecación. (6,21,26)

PERIODO DE INCUBACIÓN:

Puede ser desde horas hasta 2 o 3 días, pero esto va a depender de la cepa viral, dosis del inóculo, especie y edad de las aves. (3,6,7,27)

MORBILIDAD Y MORTALIDAD:

La morbilidad y mortalidad son sumamente variables, ya que estos se ven determinados por : la especie de ave afectada, cepa del virus, medio ambiente e infecciones secundarias. En la mayoría de los casos la morbilidad alcanza el 100%, mientras que la mortalidad fluctua entre el 90% y 100%. (3,5,6,26,28,34)

SIGNOS CLÍNICOS.

Cabe mencionar que no existen signos clínicos característicos para todas las infecciones producidas por este virus y pueden depender de :

- a. Edad de las aves
- b. Condiciones del entorno (ambiente)
- c. Patogenicidad de la cepa del virus
- d. Especie aviar afectada.

La Influenza Aviar afecta los aparatos respiratorio, digestivo y sistema nervioso. Los signos que se presentan comúnmente son: depresión, aumento en la mortalidad diaria, plumaje erizado, inapetencia, cese de la producción de huevos, inflamación de senos infraorbitales, boqueo, conjuntivitis espumosa. En la mayoría de los brotes los signos predominantes son respiratorios : con tos,

estornudos, estertores, lagrimeo, flujo nasal con sangre y sinusitis. Puede haber diarrea que al inicio es acuosa verde brillante y se va tornando a blanca. Desordenes nerviosos como : excitación, ataxia, parálisis y movimientos convulsivos previo a la muerte. Cualquiera de estos signos se pueden producir solo o en combinaciones.(5,6,13,18,27,28,34)

Las aves adultas frecuentemente presentan inflamación de crestas y barbillas, edema alrededor de los ojos; a menudo hay cianosis en las puntas de las crestas y puede haber vesículas de plasma o sangre en su superficie con zonas oscuras de hemorragias equimóticas y focos de necrosis. (3,5,10,18)

Puede haber hemorragias difusas en zonas amplias de piel como las patas y el tarso. En ponedoras en jaula, no es raro que la enfermedad se inicie en un área localizada del gallinero, afectando duramente a las aves de unas cuantas jaulas antes de que se extienda a las demás. Los últimos huevos puestos después de iniciado el brote son con frecuencia con cascarón delgado y poroso o sin cascarón. (4,10,18)

La muerte puede presentarse a las 24 horas después de presentarse los primeros signos de la enfermedad, generalmente a las 48 horas, aunque puede prolongarse hasta una semana. (2,3,18)

En aves de engorde y reproductoras pesadas los signos de la Influenza Aviar a menudo son : severa depresión, inapetencia, marcado aumento de la mortalidad, fuerte estertor tractobronquial, blefaroconjuntivitis y excesiva cantidad de moco en el pico ; también se logra observar signos neurológicos como torticolis, ataxia así como edema de la cabeza y cuello. La enfermedad en pavos

es similar a la de las aves de postura con un curso entre 2 y 3 días más ocasionalmente con senos inflamados. (3,18,24,34)

En los patos y gansos domésticos , los signos de depresión, inapetencia y diarrea son similares a los observados en las aves de postura; las aves más jóvenes pueden presentar signos neurológicos. (18)

Un dato curioso sobre esta enfermedad que se ha reportado en todo el mundo es una incidencia más alta en pavos que en pollos, probablemente debido al tipo de manejo ; los pavos se explotan en campo abierto (pastoreo). (27)

En el caso de la Gripe de Pollo, los síntomas observados en humanos incluyen : fiebre, problemas respiratorios, tos, rinitis, dolor de garganta, mareos ; los cuales son progresivos y se complican con neumonía. (14,15,16,20,33,35)

LESIONES MACROSCÓPICAS :

En las aves que mueren con la forma sobre aguda de la enfermedad, las lesiones no son muy significativas; únicamente presentan deshidratación y severa congestión de la musculatura, en las aves adultas y formas menos agudas se observa edema subcutáneo de cabeza y cuello con exudado sanguinolento el cual se evidencia al incidir piel. El líquido puede salir por las fosas nasales y cavidad oral, la conjuntiva severamente congestionada con petequias. La tráquea puede estar normal a excepción de que el lumen contiene gran cantidad de exudado mucoso o fibrinoso, o puede estar muy lesionada con traqueitis hemorrágica, neumonía con exudado purulento, y sacos aéreos engrosados. Hay hemorragias petequiales en la parte interna de la quilla, pequeñas petequias en

grasa abdominal, superficies serosas y peritoneo y que parecen estar rociadas por un atomizador. Los riñones están muy congestionados y en ocasiones los túbulos están obstruidos con depósitos blancos de uratos. (3,6,7,26,27,28,31)

En aves ponedoras el ovario esta hemorrágico con zonas de necrosis oscuras, la cavidad peritoneal con frecuencia puede contener yema de óvulos rotos causando una severa aerosaculitis y peritonitis en aves que han sobrevivido de 7 a 10 días. (5,6,7,10,34)

Puede haber hemorragias en la superficie de la mucosa del proventriculo en su unión con la molleja; la mucosa de la molleja se desprende fácilmente y se observan hemorragias y ulceraciones debajo de la misma. La mucosa intestinal puede tener áreas hemorrágicas a nivel de centros linfáticos como tonsilas cecales y placas de Peyer. Las lesiones observadas en patos y pavos domésticos son similares a las de los pollos pero menos marcadas. (3,6,7,26,27)

En reproductoras pesadas otras lesiones que se presentan son: neumonía aguda, infiltración de exudado caseoso en los pulmones, hemorragias petequiales en los espacios intercostales. (24)

LESIONES MICROSCÓPICAS :

Se observa depresión de centros linfoides, degeneración parenquimatosa y focos necróticos de color gris-amarillento en hígado, bazo, miocardio, riñón, pulmones; las lesiones encefálicas comprenden manguitos linfoides perivasculares, proliferación vascular y alteraciones neuronales. (2,6,7,28,34)

En el examen histopatológico de los pollos infectados naturalmente en el brote de Pennsylvania se observó una encefalitis no supurativa difusa, pancreatitis, miocitis necrotizante que afecta a múltiples músculos esqueléticos, principalmente en los oculares externos y de los miembros inferiores. Se pudo observar que estas lesiones eran más intensas en pollos de engorde que en las gallinas ponedoras, posiblemente debido a la edad, estirpe del ave, patogenicidad del virus o a la etapa de la enfermedad. En los pavos las lesiones son pancreatitis, alteraciones degenerativas y necroticas en hígado, encéfalo y meninges, miocardio y tejidos cutáneos, depresión necrotica de centros linfoides. (2,6)

En la actualidad no se dispone de información de la presencia de lesiones en aves acuáticas infectadas de manera natural, por lo cual se desconoce las alteraciones histopatológicas. (6)

DIAGNÓSTICO :

La historia clínica, signos y lesiones pueden encaminar el diagnóstico de la enfermedad, la confirmación dependerá del aislamiento e identificación del virus así como de la evidencia serológica positiva.(3,5,6,34)

Diagnóstico de campo:

Se sospecha de influenza aviar en cualquier parvada que presente muertes repentinas, depresión severa, inapetencia, caída drástica en la producción de huevos. La presencia de edema en cabeza, cresta y barbillas

cianóticas ; indica la posibilidad de que la enfermedad sea causada por un virus de alta patogenicidad. (7)

Diagnóstico de laboratorio :

Aislamiento e identificación del virus: Se puede aislar virus de traquea y cloaca de aves vivas o muertas, ya que el virus se replica típicamente en las vías respiratoria e intestinal. Los tejidos, secreciones y excreciones de estas vías son apropiados para el aislamiento de virus. (6,27,34)

Al enviar las muestras se debe adjuntar la historia clínica, hallazgos a la necropsia e información de nuevas adquisiciones en la parvada. En el caso de infecciones sistémicas provocadas por virus altamente patógeno prácticamente de todo órgano puede aislarse el virus debido a la viremia, por ejemplo, pueden enviarse hisopados de traquea y cloaca en tubos estériles conteniendo medio de transporte estéril (1 a 2 ml) ; los órganos como pulmón, bazo, tonsilas cecales, hígado, riñón, pueden transportarse en frascos o bolsas estériles. (4,6,7,27)

El método más usado para el aislamiento del virus es la inoculación a embriones de pollo de 9 a 11 días de incubación, vía cavidad alantoidea con 0.1 ml a 0.2 ml de muestra ya sea de los hisopados, o bien del macerado de órganos y se incuban a 37°C. Para aumentar la probabilidad de crecimiento del virus se puede emplear la vía amniótica en el mismo huevo.(6,18)

La mortalidad embrionaria a las 24 hrs. post-inoculación debe ser descartada, debido a que el virus de Influenza Aviar mata al embrión de 48-72 hrs. dependiendo de la virulencia del virus ; si no han muerto en 72 hrs. se retiran

los huevos de la incubadora y se pasan a la refrigeradora para que se enfrien y obtener así el líquido alantoideo libre de glóbulos rojos. La presencia del virus en el líquido alantoideo se comprueba por su actividad hemoaglutinante sobre eritrocitos de pollo. El almacenamiento de virus a largo plazo debe efectuarse a -70°C. La liofilización de los virus también es apropiada para el almacenamiento, pero deben probarse periódicamente para verificar su infectividad. (6,18)

En humanos los aislamientos se han hecho a partir de aspiraciones traqueales y en algunos con lavado bronco alveolar. (14,20,33,35)

Serología:

Se utilizan pruebas serológicas para demostrar la presencia de anticuerpos que pueden ser detectados a partir de los 7 a 10 días post-infección o por vacunación previa, es importante obtener suero si es posible de la fase aguda o convaleciente de la parvada, el cual puede conservarse congelado hasta el momento de realizar las pruebas. Las pruebas más utilizadas para la vigilancia epidemiológica y diagnóstico serológico son: (3,6,23,26,27)

- a) Precipitación en agar gel (PAG): Para esta prueba se utiliza suero de aves, además del antígeno comercial elaborado a partir de membrana corioalantoidea de embriones de pollo, el medio utilizado es el de agarosa. (4,11)

En esta prueba cuando el antígeno y anticuerpo difunden uno hacia el otro en el medio del agar gel entran en contacto, se combinan y forman una línea visible en la zona de equivalencia, lo que se interpreta como positivo a la

presencia del virus de Influenza Aviar tipo A . Cuando se utiliza esta prueba se emplea antígenos de referencia y producen Líneas de Identidad Total, los resultados se obtienen en 24 hrs. (4,7,8,11,23)

Los sueros de pollo pueden ser positivos a la prueba de precipitación desde los 2 o 3 días después de los primeros signos de la enfermedad. (6,18)

b) Inhibición de la Hemoaglutinación (HI): Esta prueba se realiza a partir de muestras de suero y yema de huevo, utilizando un serotipo específico de virus de Influenza Aviar. La prueba de HI resulta indispensable para confirmar la identidad del subtipo de virus de influenza aviar ; además detecta y cuantifica anticuerpos específicos presentes en sueros de aves, después de una infección o vacunación con virus de influenza aviar. La base de esta prueba, es la interacción de los anticuerpos específicos con la hemoaglutinina viral homóloga, que inhibe la aglutinación de los eritrocitos. (4,7,8,11,23,26)

c) Inmunoabsorción con Enzimas Asociadas (ELISA): Esta prueba por ser rápida, sensible y específica se utiliza para detectar y medir anticuerpos presentes en el suero de aves, para lo cual se utilizan placas de microtitulación que constan de 96 celdillas o fosos. La prueba se lee utilizando un lector de placas en el cual la intensidad de color de cada muestra es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en la muestra, quedando registradas en Densidades Ópticas (D.O.). (1,6,23,25)

Diagnostico Diferencial :

La enfermedad de Influenza Aviar por su amplio espectro de signos y lesiones, clínicamente puede ser fácilmente confundida con las enfermedades de Newcastle velogénico viscerotropico y otros paramixovirus, Chlamydia, Mycoplasma, Cólera Aviar, Bronquitis infecciosa, Laringotraqueitis infecciosa y Síndrome de la Cabeza Hinchada. Comúnmente se observan infecciones concurrentes entre el virus de Influenza con mycoplasma y otras bacterias. Por lo tanto el diagnóstico definitivo debe establecerse por medio de métodos virológicos y serológicos para su confirmación. (5,6,18,27,28,34)

TRATAMIENTO

No hay tratamiento efectivo para las infecciones por virus de Influenza Aviar; sin embargo, estudios recientes en pollos muestran que el uso de clorhidrato de amantadina y rimantadina, administradas en el agua de beber redujo la mortalidad; no obstante, las aves permanecieron infectadas y eliminando el virus. La amantadina estuvo presente en el suero, musculo e hígado de las aves tratadas; desapareciendo las concentraciones séricas y tisulares en un plazo de 24 hrs., después de retirado el fármaco, pero la concentración en clara y yema de los huevos se conservó durante más o menos 3 días. Es por esta razón que este fármaco no está aprobado para usarse en aves para el consumo humano. (6,7)

Los demás tratamientos que se han empleado han sido de sostén para aliviar los problemas secundarios causados por infecciones concurrentes como mycoplasma y bacterianas (4,5,6).

PREVENCIÓN Y CONTROL

Los métodos para la prevención y control de la Influenza Aviar se centra en prevenir la introducción inicial del virus y del control de su propagación si ya se ha introducido. (6)

La Prevención está encaminada a fortalecer las practicas de bioseguridad dentro de cada país o región y en cada granja o parvada:

- * Establecer la regla de "Todo dentro Todo fuera" en cada explotación.
- * Evitar que la parvada entre en contacto con aves enfermas, así como del contacto directo e indirecto con aves silvestres, exóticas y migratorias.
- * Permitir el ingreso a las granjas únicamente de los trabajadores y vehiculos indispensables.
- * Proveer de ropa limpia y lugares de desinfección a los empleados de las granjas.
- * Limpiar y desinfectar cuidadosamente los vehículos que entren y salgan de las granjas.
- * No prestar equipo u otro material a otras granjas.
- * No permitir el ingreso de aves y subproductos de México a Centro América.

- * Limpiar y desinfectar cuidadosamente las galeras cada vez que tenga un lote nuevo de aves.
- * Eliminar el estiércol, plumas y otros desperdicios de la parvada.
- * Los huevos para incubar deben provenir de parvadas libres de Influenza.
- * El reservorio de virus de Influenza Aviar en las aves silvestres son fuente potencial para las aves domésticas, en particular aquellas en áreas abiertas.

(5,6,13,17,22,26,34)

El Control va dirigido a las recomendaciones y responsabilidades para contener brotes de Influenza Aviar causados por virus de patogenicidad variable, entre las cuales se mencionan:

- * Establecer Medidas de Cuarentena, lo que reduce la posibilidad de propagación del virus.
- * Realizar periódicamente Vigilancia epidemiológica a nivel de campo por medio de aves centinelas y de laboratorio, para detectar nuevos brotes y evitar propagaciones.
- * Mantener un buen programa de desinfección en la explotación.
- * Realizar vacunaciones, pero cabe mencionar que esta NO se practica en áreas o países libres de la enfermedad. Sin embargo en países como en México se ha utilizado vacunas inactivadas con adyuvantes administrados individualmente en algunos brotes (solo los causados por virus de baja o mediana patogenicidad) utilizando la cepa de virus de Influenza que está causando el problema en el área ; pero estas no son efectivas en áreas geográficas extensas debido a la

diversidad antigénica existente entre los virus de Influenza Aviar. Por lo tanto las vacunaciones impiden la vigilancia epidemiológica y serológica y pueden provocar infección y conservación viral en ausencia de enfermedad, aun cuando aparentemente reduzcan la intensidad y propagación del virus, el cual no será del todo eliminado de la población aviar.

- * Practicar la Erradicación, en caso de emergencia principalmente en los brotes causados por virus de alta patogenicidad.
- * Reportar inmediatamente todos los brotes de Influenza Aviar a las autoridades sanitarias correspondientes.

(5,6,13,17,22,26,28,34)

En México ante la presencia inexorable del virus de influenza aviar se tomaron una serie de medidas para enfrentar este nuevo problema, las cuales están contempladas en el Plan Operativo de Control y Erradicación de la Influenza Aviar. Las fases importantes de este plan incluyen :

- ◆ La investigación epidemiológica y diagnóstico de la enfermedad.
- ◆ Determinación de la magnitud del problema.
- ◆ Prevención y control.
- ◆ Vigilancia Epidemiológica.
- ◆ Requisitos zoonosarios para el manejo de las aves y sus productos.
- ◆ Educación y concientización de las medidas de bioseguridad.
- ◆ Erradicación de la enfermedad.

Cabe mencionar que en este país actualmente se esta vacunando contra la Influenza Aviar con el propósito de controlar la enfermedad sin llegar a la erradicación mediante el sacrificio de las aves, sin olvidar que la mejor alternativa para evitar la introducción y propagación del virus son los programas de bioseguridad, vigilancia y reporte. (12,21,26,27,31)

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

RECURSOS HUMANOS.

- a. Estudiante investigador.
- b. 4 Asesores Médicos Veterinarios.
- c. Técnicos de laboratorio.
- d. Personal administrativo DIGESEPE CENTRAL.

MATERIAL BIOLÓGICO.

- a. sueros de aves
- b. microplacas adsorbidas con Antígeno de la Enfermedad de Influenza Aviar (AIV).
- c. 30 μ l de suero control positivo, conteniendo anticuerpos específicos contra la enfermedad de Influenza Aviar.
- d. 300 μ l de conjugado de cabra-anti-pollo-IGg peroxidasa.
- e. 30 ml de solución de sustrato Hidrogeno peroxidasa (ABTS).
- f. 30 μ l de suero control negativo
- g. antígeno de AIID.
- h. antisuero.
- i. globulos rojos de gallina lavados, al 1%.
- j. antígeno de AIHI.
- k. antisueros positivo y negativo.
- l. albumina serica bovina.

MATERIALES DE LABORATORIO.

- a. medio de Agarosa.
- b. solución buffer.
- c. solución de bloqueo.
- d. placas para HI en fondo U.
- e. placas de Petri
- f. micropipetas (multicanal) de 8 a 12 canales con capacidad de 50-200 μ l.
- g. labador de pipetas de 12 canales con recipiente de 1 litro.
- h. tubos de ensayo graduados (25 ml, 50 ml, 100 ml).
- i. reservorio de reactivos.
- j. puntas de pipetas (1-200 μ l).
- k. placas ELISA de 96 pozos de fondo plano vacías (placas de dilusion de sueros).
- l. cronómetro.
- m. lector de placas ELISA (filtro de 405-410 nm.).

MATERIALES DE CAMPO.

- a. hielera.
- b. Computadora y monitor.
- c. diskette.
- d. impresora.
- e. papel.

f. tinta para computadora.

METODOLOGÍA.

Obtención de la muestra:

En el presente estudio se analizaron todas las muestras de suero de aves provenientes del interior de la República de Guatemala que ingresaron al laboratorio central de DIGESEPE en el periodo de marzo a agosto de 1997, siendo el área fronteriza con México la más estudiada ; los sueros llegaron al Laboratorio para realizarles las pruebas serológicas de diagnóstico de la enfermedad de Influenza Aviar. Para darles ingreso al Laboratorio las muestras se identificaron con un número de registro en el protocolo correspondiente.

En el laboratorio los sueros fueron decantados en viales estériles debidamente identificados, luego se tinalizaron en baño de María a 56°C por 30 min., y posteriormente se almacenaron en congelación hasta el momento de realizar las pruebas.

a. Prueba de Precipitación en Agar Gel.

Se utilizó una placa de petri conteniendo 15 ml. del medio de agarosa, en la cual se hicieron las perforaciones en forma de roseta (7 fosos) ; utilizando 5 fosos para los sueros problema, 1 foso para el control positivo y el foso central para el antígeno AIID (anexo 1).

Se depositó en el foso central 0.30 ml. del antígeno AIID ; en los fosos periféricos los sueros, en la siguiente forma : en el foso 1 se depositó 0.30 ml de suero control positivo ; en los 5 fosos restantes se depositaron 0.30 ml. de cada

suero problema, utilizando diferentes pipetas . Se incubaron a temperatura ambiente (20-22°C) por 24 horas y luego se realizó la lectura con una lampara de 60 watts a contra luz.

b. Prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI).

Para realizar esta prueba se identificó una microplaca como Placa de Dilución, en la cual se depositó 0.100 ml. de PBS con albúmina en todos los fosos ; luego siguiendo un orden secuencial se depositaron 0.025 ml. de cada suero a evaluar (ejemplo : foso A1 el suero 1, el foso A12 el suero 12 ; foso B1 el suero 13, y así sucesivamente hasta llegar al foso H12 donde quedó el suero 96), obteniendo una dilución de 1:5 .

En otra microplaca " Placa para la Prueba" se depositó 0.025 ml. de PBS con albúmina a todos fosos ; luego con una micropipeta de 12 canales se transfirieron 0.025 ml de los sueros de la línea A (A1-A12) de la placa de dilución a la línea A de la placa para la prueba , se mezclaron y se transfirieron 0.025 ml. a la línea B de esa misma placa, se volvió a mezclar y se descartó 0.025 ml. La dilución resultante en la línea A será de 1:10 , mientras que en la línea B fue de 1:20. Esta operación se repitió con los demás sueros, dejando en cada microplaca empleada un suero control positivo y un control de eritrocitos.

Una vez efectuadas las diluciones, se agregó a cada foso 0.025 ml. del antígeno de AIHI conteniendo 4 DHA , se cubrió y agitó la placa para incubarla a temperatura ambiente (20-22°C) por 30 min. Luego se agregó 0.05 ml. de la

suspensión de eritrocitos al 0.5% a cada foso, se cubrió y agitó de nuevo la placa para volver a incubar a temperatura ambiente por 30-45 min. Se realizó la lectura.

c. Prueba de Inmunoabsorción con Enzimas Asociadas (ELISA).

Con los sueros recolectados y almacenados se realizaron diluciones (1:50) con solución buffer, antes de iniciar la prueba. Así mismo con los demás reactivos se prepararon y se llevaron a temperatura ambiente antes de utilizarlos.

El procedimiento de la prueba fue:

Paso 1. marcar la plantilla de acuerdo a cada suero a evaluar. (anexo 2)

Paso 2. agregar 50 μ l de solución buffer a cada foso de la plantilla.

Paso 3. agregar 50 μ l de suero control positivo a los fosos A1, A3 y H11.

Paso 4. agregar 50 μ l de suero control negativo a los fosos A2, H10 y H12.

Paso 5. transferir 50 μ l de las muestras de suero diluidos en los fosos restantes.

Paso 6. incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.

Paso 7. sacudir fuertemente la placa sobre papel secante hasta que se considere libre de cualquier contenido. Este paso es uno de los más importantes.

Paso 8. lavar cada foso con 300 ml. de agua destilada de 3 a 5 veces.

Sacudir fuertemente la placa sobre papel secante hasta que se considere libre de cualquier contenido extraño.

Paso 9. agregar 100 μ l del conjugado diluido cabra-anti-pollo IgG peroxidasa dentro de cada foso.

Paso 10. incubar por 30 min., a temperatura ambiente.

Paso 11. repetir los pasos 7 y 8.

Paso 12. agregar 100 μ l de la solución substrato ABTS., dentro de cada foso.

Paso 13. incubar por 15 min., a temperatura ambiente.

Paso 14. colocar 100 μ l de la solución de bloqueo (stop) a cada foso para detener la reacción. La lectura se debe realizar a los 5 min.

Paso 15. medir y registrar los valores de Absorbancia utilizando un filtro de 410 nm., para las muestras problema, controles positivo y negativos.

Paso 16. efectuar los cálculos matemáticos de los resultados de acuerdo a las siguientes fórmulas:

* Promedio Absorbancia Control Positivo (PCP): $A1 + A3 + H11 / 3$.

* Promedio Absorbancia Control Negativo (PCN): $A2 + H10 + H12 / 3$.

* Control Positivo Correcto (CPC): $PCP - PCN$.

* Calculo de la Muestra Positiva (SP):

$$SP = \frac{(\text{Promedio Absorbancia de la muestra}) - (PCN)}{CPC}$$

Sí la proporción SP es menor a 0.300 la muestra se considera como negativa. Proporciones de SP igual o arriba de 0.5 indican la presencia de anticuerpos contra la enfermedad de Influenza Aviar en el suero de las aves ; se anotaron los resultados en la hoja respectiva. (anexo 3)

ANÁLISIS DE DATOS.

Se estimó la prevalencia puntual de reactores positivos a la enfermedad de Influenza Aviar y se determinó la procedencia .

Se midió la sensibilidad de las pruebas de HI y ELISA contra la prueba de PAG. Los resultados se trabajaron en base a porcentaje (%) de sensibilidad de estas dos pruebas contra la prueba de precipitación.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

En el periodo de estudio ingresaron al Laboratorio Central de DIGESEPE un total de 1754 muestras de sangre de aves (*Gallus gallus*); las muestras procedían en su mayoría de la parte fronteriza con México (Alta Verapaz, Huehuetenango, otros); como parte del Programa de Vigilancia continua que se realiza para evitar el ingreso de esta enfermedad a nuestro país que actualmente se encuentra libre pero en constante riesgo por la localización geográfica con el país endémico.

A las muestras se les separó el suero y se les corrió las siguientes pruebas: Precipitación en Agar Gel (PAG), con antígeno AIID y antisueros específicos positivo y negativo obteniéndose resultados negativos a esta prueba.

De los 1754 sueros solo fueron analizados 180 sueros (10.26%), esto debido a que los demás no llenaron los requisitos exigidos así: 822 sueros (46.86%) se descartaron por estar hemolisados, 451 sueros (25.71%) se perdieron en el proceso de tindalización y 301 muestras (17.16%) no tuvieron cantidad suficiente de suero

Con los 180 sueros (100%) se realizó la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI) con antígeno de Influenza Aviar tipo A y antisueros específicos positivo y negativo, obteniéndose el 100% de resultado negativos. En la prueba de Inmunoabsorción con enzimas Asociadas (ELISA) 152 sueros (84.45%) fueron negativos y 28 sueros (15.55%) fueron falso - positivo. Debido a que el método de ELISA es más sensible a dar falsos - positivos en sueros

contaminados o hemolisados que el método PAG y HI; esto hace que los resultados obtenidos por ELISA no tengan una correlación directa con los otros dos métodos serológicos.

La calidad de los sueros en cuanto a factores como contaminación y grados de hemólisis influyeron en los resultados de el método ELISA (Gráfica 1).

Con respecto a la procedencia de los sueros falso - positivos se determinó que el 35.72% provenían del departamento de Alta Verapaz, el 21.43% del departamento de Huehuetenango y el otro 42.85% de diversos departamentos (Cuadro 1, Gráfica 2).

VI. CONCLUSIONES

En la presente investigación las muestras de suero analizadas por medio de las pruebas serológicas de PAG y HI, fueron negativas en su totalidad ; lo cual evidencia que no hay presencia de anticuerpos circulantes contra la enfermedad de Influenza Aviar.

Las pruebas de PAG y HI son confiables para el diagnóstico de la Influenza Aviar.

El método de ELISA es altamente sensible, pero no específico por lo que las muestras de suero deben ser de alta calidad para evitar obtener resultados falso - positivos.

México representa un riesgo para la avicultura Centroamericana por ser un país endémico a la enfermedad de la Influenza Aviar y por la cercanía geográfica a la cual se encuentra.

De acuerdo al estudio realizado en el presente trabajo de investigación se a podido demostrar que Guatemala esta libre de Influenza Aviar.

VII. RECOMENDACIONES

Continuar con la Vigilancia Epidemiológica mientras persista el riesgo de infección con el país endémico.

Realizar programas de capacitación sobre Bioseguridad para evitar el ingreso de la enfermedad de Influenza Aviar a nuestro país.

Por los resultados obtenidos en esta investigación se recomienda seguir utilizando los métodos de PAG y HI para el monitoreo de la Influenza Aviar, ya que son pruebas de alta confiabilidad.

Por la alta sensibilidad a hemólisis y contaminación de los sueros el método de ELISA no se recomienda utilizarlo en el muestreo epidemiológico Nacional para evitar resultados falso - positivo.

Instruir a los técnicos pecuarios en la forma correcta de recolección y envío de las muestras de sangre al laboratorio.

Toda enfermedad exótica como la Influenza Aviar debe ser de reporte obligatorio.

VIII. RESUMEN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio Central de DIGESEPE al cual ingresaron 1754 sueros de aves de traspatio procedentes del interior de la República de Guatemala, para realizarles las pruebas serológicas de PAG ; arrojando el 100% de negatividad a la prueba. De los 1754 sueros se eliminaron un total de 1564 por causas de : 822 sueros hemolisados, 451 sueros se perdieron en la tindalización y 301 sueros no tenían la cantidad necesaria para realizar las demás pruebas ; quedando solamente 180 sueros, a los cuales se les corrió las pruebas de HI y ELISA.

Con la colaboración del Laboratorio de Avícola Villalobos se pudo realizar las pruebas de HI y ELISA, obteniéndose los siguientes resultados : en la prueba de HI los 180 sueros fueron negativos, en la prueba de ELISA 152 sueros (84.45%) fueron negativos y 28 sueros (15.55%) fueron falsos - positivos.

Se determinó que el método de ELISA es altamente susceptible a la contaminación y hemólisis de los sueros, en comparación con los métodos de PAG y HI, ya que dichos factores dieron lugar a obtener resultados falso - positivo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluyó que no hay presencia de anticuerpos circulantes contra la enfermedad de Influenza Aviar en aves de traspatio de nuestro país. Se deben seguir usando las pruebas de PAG y HI para el diagnostico de la enfermedad. Además la alta sensibilidad del método de ELISA establece que para su utilización se requieren sueros de alta calidad.

IX. SUMMARY

The present study was performed in the central laboratory of DIGESEPE, in which entered 1754 native poultry serum, coming from the interior of Guatemala Republic, to carry out the serological test of PAG, becoming a 100 % negative. From the 1754 serums were eliminated a total of 1574 for the following reasons : 822 serums for hemolysis, 451 serums where lost in the process , and 301 serums did not have enough quantity to perform the other tests ; remaining only 180 serums, on which were performed the test of HI and ELISA.

The method of ELISA could be carry out with the collaboration of the laboratory of Avícola Villalobos. Obtaining the following results : in the test of HI 180 serums where negative, in the method of ELISA 152 (84.45%) serums where negative and 28 (15.55%) where false-positive.

It was determined that the ELISA method is highly susceptible to the contamination and hemolysis of the serum, in comparison to the methods of PAG and HI, since we obtained false-positive.

According to the results, it was concluded that there is no presence of circulating antibodies against the disease of Avian Influenza in poultry of our country. There should continue to use the method PAG and HI for the diagnosis of the disease. In addition to the high sensibility of the method ELISA has determine that for it's utilization it's required serum of high quality.

X. BIBLIOGRAFIA.

1. AROCHA, C.A. 1987. Determinación de la transferencia de anticuerpos contra la enfermedad infecciosa de la bolsa de fabricio a la progenie de reproductoras pesadas por los métodos de inmuoabsorción con enzimas asociadas (ELISA) y de inmunodifusión radial en gelosa (INDIRAG). Tesis Med. Vet. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. p. 16-18, 27, 28.
2. AVIAN INFLUENZA (fowl plague). 1995. Agriculture and Agri-Food Canada. (Canada). no. 4:2. [Http://www.epix.sfu.ca/topics/animal/av_influ.htm](http://www.epix.sfu.ca/topics/animal/av_influ.htm). ; <http://vetpath.afip.mil/poultry.ficken.txt>.
3. BAINS, B.S. 1979. A manual of poultry diseases. Suecia, Roche. p. 130-132.
4. BANDA, C.A. 1994. Metodología diagnóstica para influenza aviar. México, UNAM. p. 44. (Suplemento de Infovet).
5. BARRETO, O. 1984. Revisión sobre influenza aviar (Avian influenza). San Salvador, El Sal., OIRSA. p. 3-6. (Carta informativa, no. 5).
6. CALNEK, B.W. et al. 1995. Enfermedades de las aves. Trad. por Jorge Mérito J. México, El Manual Moderno. p. 651-668.
7. CAMPOS LOPEZ, H. 1992. Dispositivo nacional de emergencia de sanidad animal : Influenza aviar. México, DINESA. p. 3-36.
8. CONGRESO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA. (15, 1997, Cancún Quintana Roo, México). 1997. Evaluación de dos métodos de extracción de yema para la titulación de anticuerpos ontra influenza aviar. Ed. por Arnulfo Toscano. et al. Memorias]. México, s.n. p. 359, 360.



9. ----- (15, 1997, Cancún Quintana Roo, México). 1997. *Influenza aviar en México : interrelaciones aves silvestres-virus de influenza ; realidades y mitos*. Ed. por Jesús Estudillo L. [Memorias]. México, s.n. p. 97-108.

10. ----- (15, 1997, Cancún Quintana Roo, México). 1997. *Situación actual de la influenza aviar en México*. Ed. por Francisco Gurria T. [Memorias]. México, s.n. p. 158-161.

11. FRAIRE, M. 1998. *Influenza aviar : Diagnostico de laboratorio*. México, Laboratorio de Alta Seguridad. 5 p. (Correspondencia Personal).

12. GARCIA GARCIA, J. *et al.* 1996. *Evaluación de vacunas inactivadas de I.A. en México : Pruebas de laboratorio y de campo*. In *Memorias de la XXI Convención Anual Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas*. Ed. por Miguel A. Ceniceros ; Marcos M. Jensen. Cancún, México, ANECA. p. 40-42.

13. GUILLIGHAM, S. 1996. *Avian influenza : Are you prepared to handle an outbreak ?*. EEUU. Alberta Agriculture, food and rural development. 6 p. <http://itsd-stz.agric.gov.ab.ca/livestck/poultry/psiw9509.html> ; <http://www.brs.gov.au/brs/aphb/aha/ausvet/aivfinal.polf>.

14. HART, S. ; TATLOW, D.K. 1997. *The future of Hong Kong's flu*. E.E.U.U. ABCNEWS.com health & living. 6 p. <http://www.abcnews.com/sections/living/birdflu1218/index.html> ; <http://www.abcnews.com/sections/living/birdflu1226/index.html>.

15. HONG KONG, U.S. BEGIN PROBE INTO 'BIRD FLU' VIRUS. 1997. E.E.U.U. Nando times news. 4 p. http://cgi2.nando.net/newsroom/ntr/health9_26260_body.html ; http://cgi2.nando.net/newsroom/ntr/health/082297/health9_26260_noframes.html.

16. -----BOOTS PAYOUTS FOR SLAUGHTERED POULTRY. 1998. E.E.U.U. Nando times news. 2 p. http://www.cg2.nando.net/newroom/ntr/health/010798/health18_850_body.html.

17. INFLUENZA AVIAR altamente patógena. 1995. Hoja informativa. Servicios Veterinarios. EEUU, Departamento de Agricultura de los EEUU. 1 p.



18. ----- (Avian influenza). 1994. El informador avícola. (Guatemala). 11 (65) : 8-18.
19. INFLUENZA VIRUS : Virology information. 1996. EEUU. Science.Org TH. 1 p. <http://virology.science.org/influenza.html>.
20. ISOLATION OF AVIAN INFLUENZA A(H₅N₁) VIRUSES FROM HUMANS. 1997. E.E.U.U. Arnot ognet medical center. 7 p. <http://www.aomc.org/NewRelease/Avian2.html>.
21. JORNADA AVÍCOLA NACIONAL "EDUARDO LEMUS O'BYRNE". (7, 1995, San Salvador, El Sal.). 1995. Influenza aviar. Ed. por Ricardo Muñoz S. [Memorias]. El Salvador, s.n. p. 37-40.
22. KREAGER, K. 1996. La bioseguridad y la influenza aviar y su relación con la industria productora de huevo para el plato. In Memorias de la XXI Convención Anual Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Ed. por Miguel A. Cenicerros ; Marcos M. Jensen. Cancún, México, ANECA. p. 19-21.
23. LAMICHHANE, C.M. 1996. Prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra el virus de la influenza aviar tipo A en el suero de pollos y pavos. In Memorias de la XXI Convención Anual Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Ed. por Miguel A. Cenicerros ; Marcos M. Jensen. Cancún, México, ANECA. p. 56,57.
24. LOPEZ, C.R. 1996. Efecto de un virus de I.A. de baja patogenicidad (VIABP) sobre parámetros reproductivos de aves reproductoras pesadas. In Memorias de la XXI Convención Anual Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Ed. por Miguel A. Cenicerros ; Marcos M. Jensen. Cancún, México, ANECA. p. 44-46.
25. MANUAL DE diagnóstico serológico para monitorear la salud avícola. 1995. Honduras, AgroBioTek. Laboratorios Tegucigalpa. p. 5-9, 31, 32.
26. MARQUEZ, M.A. 1995. El brote de influenza aviar en México. s.l., s.n. 15 p. (Correspondencia Personal).

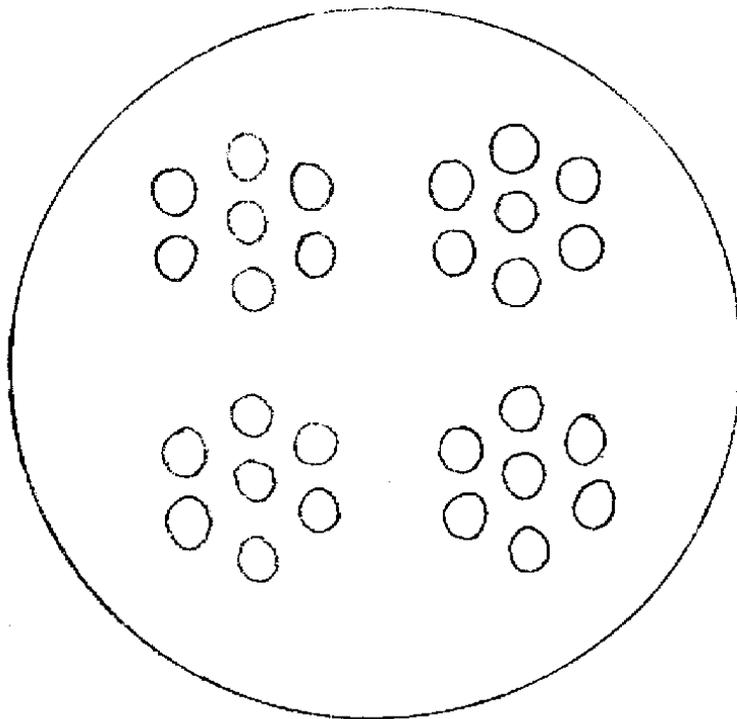


27. MEEDE, S.L. et al. 1996. Influenza aviar en México: Estudio recapitulativo. In Memorias de la XXI Convención Anual Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Ed. por Miguel A. Ceniceros ; Marcos M. Jensen. Cancún, México, ANECA. p. 301-304.
28. MOSQUEDA, A. ; LUCIO, B. ; CRUZ, J.S. 1980. Enfermedades de las aves : Enfermedades infecciosas. México, UNAM. p. 108-114.
29. NORTH, M.O. ; BELL, D.D. 1993. Manual de producción avícola. Trad. por Ana Martínez Haro. 3 ed. México, El Manual Moderno. p. 765.
30. ORTHOMYXOVIRUSES : Virology information. 1997. EE.UU. Science.OrgTH. 2 p. <http://virology.science.org/orthomyxovirus.html>.
31. ORTIZ, M.A. 1996. Experiencias internacionales para la erradicación de influenza aviar. In Memorias de la XXI Convención Anual Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Ed. por Miguel A. Ceniceros ; Marcos M. Jensen. Cancún, México, ANECA. p. 305-307.
32. PERDUE, M.L. et al. 1996. Heterogenicidad en la proteína de la hemoaglutinina entre aislamientos del virus de influenza aviar H₅ N₂ procedentes del centro de México. In Memorias de la XXI Convención Anual Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Ed. por Miguel A. Ceniceros ; Marcos M. Jensen. Cancún, México, ANECA. p. 8-13.
33. PESEK, L. 1997. Ask the vet (Avian influenza). EE.UU. The Aviary. 2 p. <http://www.theaviary.com/s0196-13.shtml>
34. WHITEMAN, C.E. ; BICKFORD, A.A. 1983. Manual de enfermedades de las aves. Trad. por H.A. Medina. 2 ed. Pensilvania, University of Pennsylvania, New Bolton Center. p. 47-52.
35. WILHELM, K. 1997. Hong Kong kills 770,000 chickens. EE.UU. Washingtonpost. 3 p. <http://search.washingtonpost.com/wp-srv/WAPO/19971230/V000691-123097-idx.html>



XI. ANEXOS

Ficha 1. Temple para la perforación de rosetas en el medio de agarosa prueba de
PAG. Laboratorio Central de DIGESEPE. Guatemala, enero 1998.



Ficha 2. Plantilla para la anotación de la lectura de la absorbancia de los sueros problema, suero control positivo, y suero control negativo. Prueba de ELISA.

Laboratorio Avícola Villalobos. Guatemala, enero 1998

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|---|-----|-----|-----|
| A | Cc+ | Cc- | Cc+ | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | Cc- | Cc+ | Cc- |

Cc+ : Suero control positivo.

Cc- : Suero control negativo

Ficha 3. Determinación de la presencia de anticuerpos contra la enfermedad de
Influenza Aviar. Laboratorio Central de DIGESEPE. Guatemala, enero 1998.

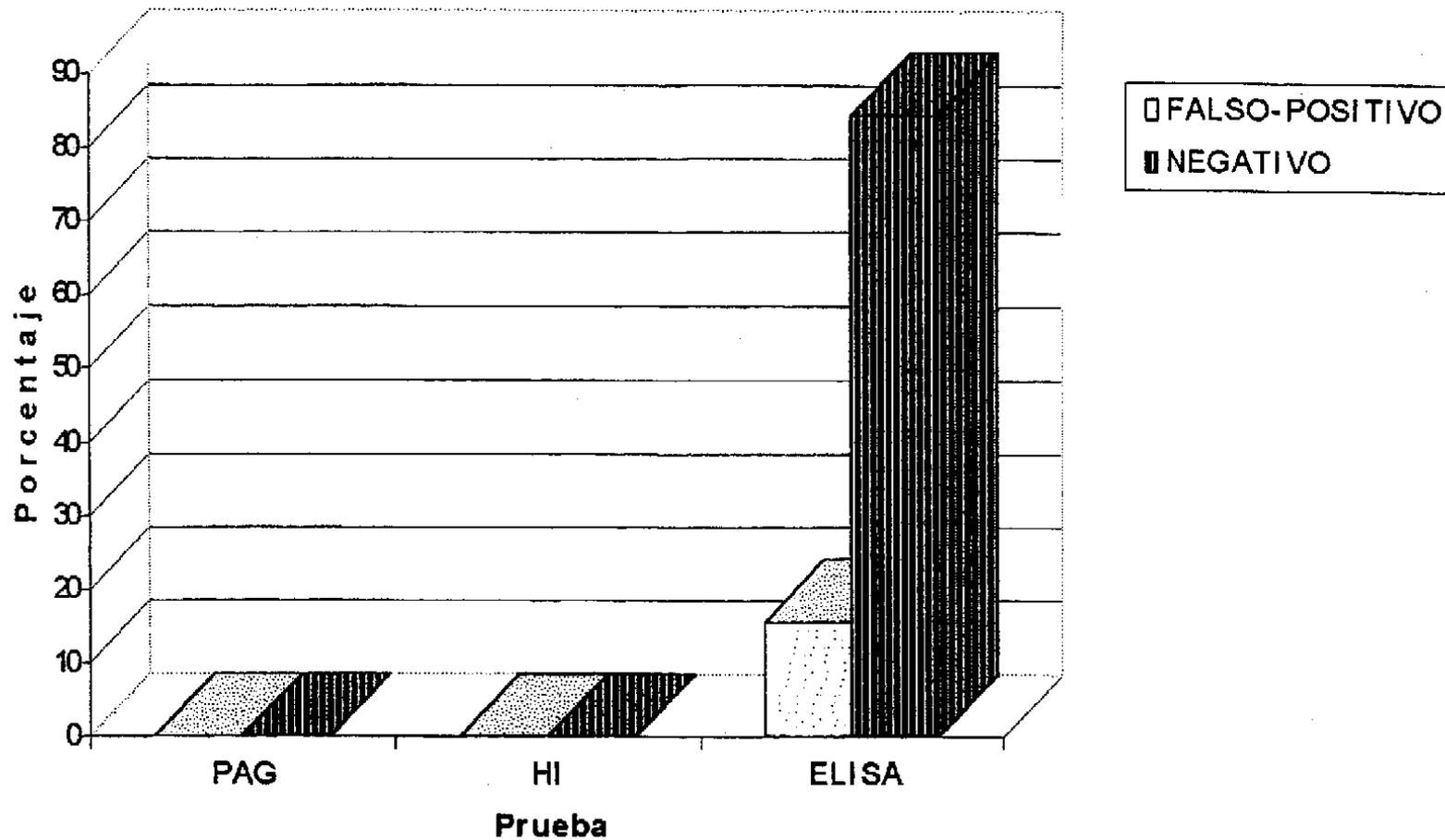
Plantilla No. _____

| No. de suero | ELISA Valor S/P | PAG | | HI \log_2 |
|-----------------|--------------------|----------|----------|----------------|
| | | positivo | negativo | |
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 4 | | | | |
| 5 | | | | |
| 6 | | | | |
| 7 | | | | |
| 8 | | | | |
| 9 | | | | |
| 10 | | | | |
| 11 | | | | |
| 12 | | | | |
| 13 | | | | |
| 14 | | | | |
| 15 | | | | |
| 16 | | | | |
| 17 | | | | |
| 18 | | | | |
| 19 | | | | |
| 20 | | | | |

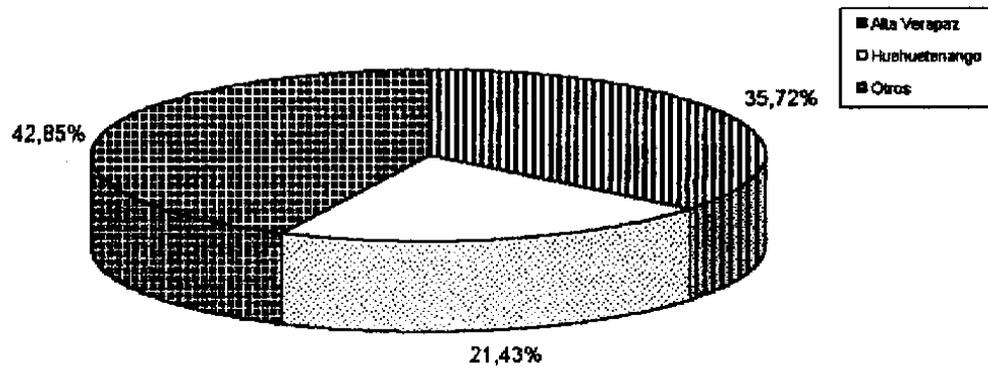
Cuadro 1. : Procedencia de sueros falso - positivos para la prueba de ELISA, en los diferentes departamentos para la enfermedad de Influenza Aviar. Guatemala abril de 1998.

| PROCEDENCIA | FRECUENCIA | PORCENTAJE |
|------------------------|-------------------|-------------------|
| Villa Nueva | 2 | 7.14 |
| Quetzaltenango | 1 | 3.57 |
| Alta Verapaz | 10 | 35.72 |
| Zacapa | 1 | 3.57 |
| Quiché | 2 | 7.14 |
| Huehuetenango | 6 | 21.43 |
| Suchitepequez | 2 | 7.14 |
| Chiquimula | 2 | 7.14 |
| Isabal | 1 | 3.57 |
| San Pedro Sacatepequez | 1 | 3.57 |
| TOTAL | 28 | 100% |

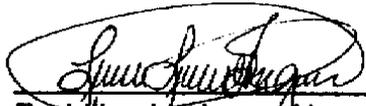
Gráfica1. Comparación de los resultados falso-positivos de las pruebas serológicas de PAG, HI y ELISA para la enfermedad de Influenza Aviar



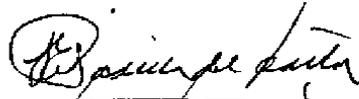
Grafica 2. Porcentaje de la procedencia de sueros falso positivos a la prueba de ELISA.



f)


Br. Lilian L. Arens Alvarado
Investigador

f)


Dra. Elizabeth Padilla de Motta
ASESOR PRINCIPAL

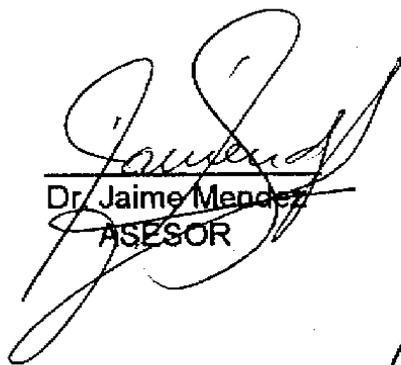
f)


Dra. Lucrecia Motta Rodriguez
ASESOR

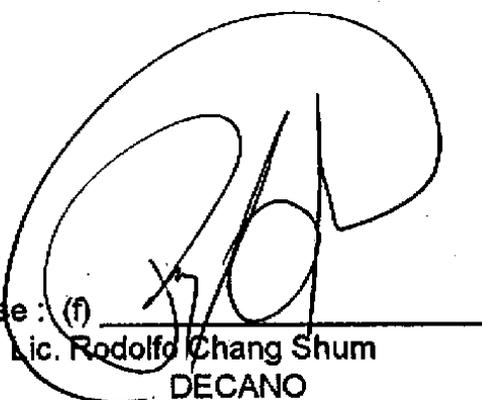
f)


Dra. Consuelo Beatriz Santizo
ASESOR

f)


Dr. Jaime Mendez
ASESOR

Imprimase : (f)


Lic. Rodolfo Chang Shum
DECANO