

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



**GUATEMALA, ABRIL DE 2011**

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

**“Determinación del virus Influenza en cerdos,  
en dos comunidades del área central de Guatemala”**

**TESIS**

**PRESENTADA A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**POR**

**DENNYS RENNATO MARROQUÍN**

**AL CONFERÍRSELE EL GRADO ACADÉMICO DE  
MÉDICO VETERINARIO**

**GUATEMALA, ABRIL DE 2011**

## **JUNTA DIRECTIVA**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**Decano:** Med. Vet. Leonidas Ávila Palma  
**Secretario:** Med. Vet. Marco Vinicio García Urbina  
**Vocal I :** Lic. Zoot. Sergio Amilcar Dávila Hidalgo  
**Vocal II :** Mag. Sc. M.V. Dennis Sigfried Guerra Centeno  
**Vocal III :** Med. Vet. Mario Antonio Motta González  
**Vocal IV:** P.A. Set Levi Samayoa González  
**Vocal V:** Br. Luis Alberto Villeda Lanuza

## **ASESORES**

**Mag. Sc. M.V.** Lucero Serrano Arriaza  
**Mag. Sc. M.V.** Francisco Escobar Serrano  
**M.A Med. Vet.** Evelin Godoy Aguilar

**HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR**  
**EN CUMPLIMIENTO CON LO ESTABLECIDO POR LOS**  
**ESTATUTOS DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE**  
**GUATEMALA, PRESENTO A SU CONSIDERACIÓN EL**  
**TRABAJO DE TESIS TITULADO:**

**“Determinación del virus Influenza en cerdos,  
en dos comunidades del área central de Guatemala”**

**QUE FUERA APROBADO POR LA JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA COMO REQUISITO PREVIO A  
OPTAR AL TITULO PROFESIONAL DE**

**MÉDICO VETERINARIO**

## **AGRADECIMIENTO**

**A todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización del presente trabajo de tesis.**

## INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	HIPOTESIS	2
III.	OBJETIVOS	3
3.1	Objetivo General	3
3.2	Objetivo Específico	3
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1	Sinónimos de Influenza Aviar de notificación obligatoria	4
4.2	Agente etiológico	4
4.3	Resistencia a las acciones físicas y/o químicas	4
4.4	Características del virus Influenza	4
4.5	Periodo de incubación	5
4.6	Reservorio natural	5
4.7	Transmisión	6
4.8	Signos en aves	7
4.9	Lesiones en aves	8
4.10	Huéspedes intermediarios	8
4.11	Mutación del virus	9
4.11.1	Mutación hacia el cerdo	9
4.11.2	Mutación hacia el hombre	10
4.11.3	Contagio hombre-hombre	12
4.12	Diagnóstico	12
4.12.1	Identificación del agente causal	12
4.12.2	Test serológico	13
4.12.3	Pruebas serológicas	14
a)	<i>Inmunodifusión en gel de agar</i>	14
b)	<i>Inmunodifusión doble en gel de agar</i>	14

c)	<i>Hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación</i>	15
4.12.4	Nuevas técnicas para el diagnóstico de la influenza aviar	16
a)	<i>Detección del antígeno</i>	16
b)	<i>Detección directa del ARN</i>	17
4.13	Valoración de la patogenicidad	17
4.14	Control y prevención	19
4.15	Influenza Aviar en Guatemala	20
4.16	Influenza Aviar a nivel mundial	22
4.17	Importancia económica	23
4.18	Importancia en Salud Pública	24
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1	Recursos	24
5.1.1	Recursos Humanos	24
5.1.2	Recursos de campo	25
5.1.3	Recursos de laboratorio	25
5.1.4	Recursos biológicos	25
5.2	Ubicación geográfica	26
5.3	Metodología	26
5.3.1	Criterio de selección de las aldeas para la toma de la muestra	26
5.3.2	Criterio de selección de los cerdos para la toma de la muestra	26
5.3.3	Medidas de bioseguridad en la obtención de la muestra	26
5.4	Diseño estadístico	27
5.5	Toma de Muestra y transporte al laboratorio para su procesamiento	27
VI.	RESULTADOS Y DISCUSION	30
VII.	CONCLUSIONES	31
VIII.	RECOMENDACIONES	32

IX.	RESUMEN	33
X.	BIBLIOGRAFIA	34
XI.	ANEXOS	37



## I. INTRODUCCIÓN

La Influenza Aviar es una enfermedad altamente contagiosa producida por virus, afecta gran variedad de aves, tanto domésticas como silvestres, fue reconocida en Italia en 1878 y se le denominó como Peste Aviar (Fowl Plague) actualmente esta en todo el mundo.

Clínicamente puede no presentar síntomas, aparece en una forma leve, aguda o altamente mortal. Una particularidad del virus influenza es que tiene la capacidad de mutar, por lo que existe el peligro de que al estar circulando en una población susceptible pueda transformarse en virus altamente virulento con mortalidad cercana al 100% siendo la convivencia multi especie también factor predisponente que puede facilitar la adaptación del virus a otra especie distinta a la de origen.

Los porcinos adquieren importancia por ser susceptibles a todos los subtipos del virus influenza aviar (en ensayos experimentales) y a los de influenza humana, pueden llegar a infectarse al mismo tiempo con estos virus, pudiendo formarse un híbrido al estar presentes ambos subtipos en el mismo organismo, pudiendo ser de gran malignidad tanto para aves como para mamíferos.

Se ha comprobado que el peligroso virus del subtipo H5N1 de la denominada “gripe del pollo” o Influenza Aviar, que ha obligado al sacrificio de miles de aves para tratar de controlar la enfermedad en las áreas afectadas, ha sido detectado en cerdos.

## **II. HIPÓTESIS**

Los cerdos de dos comunidades del área central de Guatemala son negativos a la presencia del virus influenza.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

Determinar el status sanitario de influenza en cerdos en dos comunidades del área central de Guatemala.

#### **3.2. Objetivo Específico**

Determinar en cerdos de dos comunidades del área central de Guatemala la presencia del virus de influenza tipo A Subtipo H5.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 SINÓNIMOS DE INFLUENZA AVIAR DE NOTIFICACION OBLIGATORIA:

Se le conoce también como Gripe Aviar o Peste Aviar.

### 4.2 AGENTE ETIOLÓGICO:

Es un virus que comprende cuatro géneros: Influenza A, B, C (tres tipos de virus de genoma ARN de la familia Orthomyxoviridae) y Thogotovirus, también denominado Influenza D. Sólo el primero se sabe que afecta a las aves. (2,7)

### 4.3 RESISTENCIA A LAS ACCIONES FÍSICAS Y/O QUÍMICAS.

- Temperatura: Inactivación a 56° C durante 3 horas ó 60° C durante 30 min.
- pH: Inactivado por pH ácido.
- Agentes químicos: Inactivado por agentes oxidantes, SDS, solventes lipídicos, β-propiolactona.
- Desinfectantes: Inactivado con formalina y compuestos yodados.
- Supervivencia: Permanece viable durante largos períodos en tejidos, heces y en el agua.

### 4.4 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS INFLUENZA:

El virus del género: Influenza virus A, está formado por una cadena lipídica, es de cadena simple, de sentido negativo, cuyo genoma está compuesto por 8 genes segmentados (factor importante en su patogénesis) que codifican para 10 proteínas, se dividen en subtipos en función de la naturaleza antigénica. Dentro de estas proteínas codificadas, dos glicoproteínas son utilizadas para el estudio epidemiológico del virus: La Hemoaglutinina y la Neuraminidasa. Están reportadas 16 subtipos de hemoaglutininas (H1 a H16) y 9 neuraminidasas (N1 a N9). La mayoría de las infecciones con el virus de la Influenza Aviar (con los subtipos H1 a H16) son subclínicos o producen una moderada enfermedad, mientras que pocos aislamientos de los subtipos H5 y H7 inducen una enfermedad

altamente severa y fatal denominada Influenza Aviar altamente patógena. Todos estos subtipos han sido aislados en aves acuáticas migratorias. (2, 6, 12, 15 )

Los virus Influenza A son endémicos, causan infecciones y enfermedad en seres humanos (*Homo sapiens*), caballos (*Equus caballus*), cerdos (*Sus scrofa*) y varias especies de aves. Los virus de Influenza A, han causado brotes esporádicos de manera natural en Minks (*Mustela vison*) y varios mamíferos marinos como focas y ballenas. (7)

En estudios experimentales, los roedores (especialmente ratones y hamsters) carnívoros y rumiantes ungulados son susceptibles a ser infectados con virus Influenza A, pero ellos parece ser, no son los reservorios naturales. Además, no se tiene evidencia de que ellos influyan para la transmisión de Virus de Influenza A entre humanos, cerdos, caballos y aves domésticas, especies que experimentan la Influenza endémica. (7)

#### **Sistema Afectado:**

- Respiratorio
- Nervioso
- Urogenital
- Digestivo

#### **4.5 PERÍODO INCUBACIÓN:**

A efectos del Código Terrestre de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (O.I.E.) el período de incubación de la influenza aviar de declaración obligatoria es de 21 días. (15)

#### **4.6 RESERVORIO NATURAL:**

Las aves acuáticas son el natural reservorio para todos los virus A de Influenza, principalmente en patos, aves playeras y garzas. También se han aislado en aves de vida

libre tales como golondrinas de mar (*Sterna hirundo*), Rufino (*Puffinus pacificus*), patos silvestres y otras especies; afecta también aves domésticas (pollos, patos, pavos). (6, 14 )

#### **4.7 TRANSMISIÓN:**

Un rasgo característico de las aves es que el virus de la influenza se multiplica tanto en el sistema respiratorio como en el intestino y, una vez eliminado por las heces, el agente contamina el medio ambiente. (6)

Las aves que sobreviven a la infección excretan el virus durante por lo menos 10 días, tanto por vía oral como por vía fecal, facilitando así, aún más, la diseminación en los mercados de aves vivas y a través de las aves migratorias.(1)

El virus al invadir al huésped, la caparazón usa una proteína que la adhiere a receptores en la parte exterior de las células en las vías respiratorias. La adherencia lleva al virus dentro de la membrana protectora de la célula. La caparazón del virus se fusiona con la membrana y pasa a través de ella, entrando al citoplasma de la célula, donde la caparazón se abre y libera su ARN. El citoplasma es una sustancia gelatinosa que ayuda a mantener la forma y consistencia de la célula, almacena elementos químicos esenciales para la vida y es la residencia de los orgánulos que producen proteínas y energía para las células. El ARN viral de "sentido negativo", imagen gemela del ARN mensajero que la célula usa para producir proteínas entra al núcleo de la célula, en donde hace copias "positivas" que vuelven a salir al citoplasma. La célula trata a los ARN virales igual que a cualquier otro ARN mensajero y los usa para hacer copias de las proteínas virales, secuestrando esencialmente la propia maquinaria de la célula de producción de proteínas. Dentro del núcleo, otras copias positivas del ARN viral actúan como moldes para producir más ARN viral negativo. El nuevo ARN viral se desplaza de vuelta al citoplasma donde se une a las proteínas virales recién producidas para formar nuevas copias del virus completo. El ensamblaje tiene lugar dentro de la membrana de la célula y, a medida que se completa el proceso, el nuevo virus de la gripe sale de la pared de la célula y queda libre en las vías respiratorias para encontrar otra célula para infectar, o sale en busca de un nuevo huésped. Finalmente la replicación del virus se apodera tanto de la maquinaria de la célula que la mata. (14, 12 , 13 )

La forma de los receptores en la pared de la célula difiere un poco de una especie a otra, de manera que un virus que puede adherirse a una célula de ave generalmente no

puede infectar a un ser humano. Pero el proceso no es exacto y hay variaciones menores de un organismo a otro, inclusive dentro de las especies. (15, 13 )

Algunas especies tienen receptores cuyas formas son intermedias entre las de las aves y las de los seres humanos. Las cepas de los virus de la gripe aviar y humana pueden infectar a los cerdos. Un cerdo puede ser infectado por ambos virus al mismo tiempo, con proteínas y segmentos de ARN de ambos virus dentro de la célula, podrían formarse nuevos virus, quizás con las proteínas para adherirse a una célula humana pero con características que les den la virulencia del virus aviar, incluida la habilidad de infectar células fuera del tracto respiratorio. (15, 13 )

Los autores Whittaker y Chu descubrieron que la adhesión a un solo receptor no es suficiente para permitir que el virus de la gripe entre en la célula. Tienen que participar también otro receptor u otro proceso. El receptor primario, que ya ha sido estudiado extensamente, varía de un virus a otro, pero cualquiera que sea el paso adicional, parece ser el mismo para muchos virus de gripe diferentes y quizás para todos. ( 15)

Cerdos infectados con virus recombinante humano H1N1 que portaba el gen H5N1 NS experimentalmente presentaron mayor viremia, fiebre y pérdida de peso que los que fueron infectados con un tipo silvestre H1N1. Esto requirió la presencia de ácido glutámico en la posición 92 de la molécula NS1. este hallazgo puede ayudar a explicar el mecanismo de la virulencia del virus influenza H5N1. (12)

#### **4.8 SIGNOS EN AVES:**

- Disminución en el consumo de alimento
- Emaciación
- Tos
- Estornudos
- Estertores
- Sinusitis
- Cianosis
- Plumas erizadas
- Desórdenes del sistema nervioso central

Una vez que las aves se han infectado, y luego de un período de incubación que depende de la virulencia de la cepa viral, se aprecia una baja o cese de la postura de huevos, diarrea, edema de la cabeza y cara, cianosis en cresta y barbillas, sinusitis y otros síntomas respiratorios; con una elevada mortalidad en el caso de los virus altamente patógenos. En los pavos, cepas menos virulentas, pueden causar pérdidas económicas considerables debido a que producen una baja en la producción de huevos y una mortalidad baja acompañada de la aparición de síntomas respiratorios, sinusitis y anorexia. En los patos los síntomas más frecuentes son sinusitis, diarrea y aumento de la mortalidad. ( 11)

#### **4.9 LESIONES EN AVES:**

Pueden llegar a ser tan severas las lesiones macroscópicas como son: Inflamación, hemorragias con necrosis y muerte celular en piel, cerebro, corazón, glándula adrenal, páncreas y otros órganos viscerales. Así como también úlceras en intestino, hemorragias en proventrículo, congestión de vísceras y traqueitis.(7)

#### **4.10 HUÉSPEDES INTERMEDIARIOS:**

Son aquellos que participan en la transmisión entre especies de los virus de Influenza esto incluye a codornices y cerdos como los principales, debido a que poseen todos los receptores para todos los subtipos de los virus de Influenza, de este modo en ellos pueden coexistir dos o más diferentes virus y dar origen a un cruzamiento genético, obteniéndose así nuevos virus; se han encontrado casos de cerdos que en una misma célula contiene virus de humano y aves. (13)

La pandemia de influenza de 1918-19 causada por un virus A(H1N1) (gripe española) relacionado a influenza porcina y de probable origen aviar. Durante muchos años se pensó que para lograr una eficiente introducción en humanos de un nuevo virus de influenza era necesario que los cerdos actuaran como huésped intermediario o “balón de mezclado” debido a poseer éstos los receptores específicos de virus humanos y aviares. (12)



#### **4.11 MUTACIÓN DEL VIRUS:**

Los cambios pueden ocurrir por 2 mecanismos:

- 1). Mutaciones aleatorias en el genoma ARN, especialmente en la hemoaglutinina, lo cual ocurre gradualmente todo el tiempo.
  
- 2). Reacomodo de los 8 segmentos del genoma que ocurre de manera abrupta cuando 2 virus de Influenza infectan una misma célula y da como resultado virus híbridos. En humanos, estos cambios han sido denominados Drift y Shift respectivamente. La frecuencia de que sucedan dichos cambios varía de acuerdo a la tasa de infección en diferentes especies animales. (7, 12)

##### **4.11.1 Mutación hacia el cerdo:**

En los humanos, las células epiteliales del tracto respiratorio predominantemente contienen receptores de unión alfa 2,6 galactosa; mientras que en las aves el epitelio respiratorio contienen receptores de unión alfa 2,3 galactosa. Sin embargo, las células del epitelio respiratorio del cerdo presentan ambos receptores de unión, tanto alfa 2,6 galactosa como alfa 2,3 galactosa; lo cual explica porque esta especie animal es susceptible tanto a los virus de Influenza Humana como de Influenza Aviar.(7, 12)

Científicos han comprobado la presencia del virus H5N1 de los pollos en cerdos, por lo que todas las autoridades sanitarias de varios países y la Organización Mundial de la Salud (OMS), la OIE, la FAO, etc., se han puesto en alerta roja para evitar una pandemia, que de no controlarse podría dejar cifras verdaderamente altas de muertes de humanos en varios países del mundo. (13)

Sin embargo los sueros porcinos son difíciles de testear contra gripe y los resultados necesitan ser confirmados por pruebas adicionales en un laboratorio de referencia que realice los test validados para los anticuerpos de la gripe en cerdos. (1)

**Importancia:** Según la OMS, el apareamiento del virus de la influenza aviar en cerdos podría tener implicaciones serias, pues los cerdos pueden portar a la vez variedades de virus aviar y humano, lo que potencialmente puede crear una cepa más peligrosa. (5)

#### **4.11.2 Mutación hacia el hombre:**

En el caso de los virus de Influenza Aviar, la dificultad de transmisión e infección a los humanos puede ser parcialmente atribuido a las diferencias que presentan en la eficiencia de la unión de la hemoaglutinina del virus con los receptores de la superficie celular de las células epiteliales del tracto respiratorio de aves y humanos. Se sabe que la hemoaglutinina de los virus de Influenza Aviar se une a los residuos de ácido sialico a través de las uniones con receptores alfa 2,3 galactosa de la célula huésped. Mientras que la hemoaglutinina de los virus de Influenza Humana se unen con receptores alfa 2,6 galactosa de la célula huésped, es decir los virus de Influenza Humana e Influenza Aviar reconocen diferentes receptores celulares para infectar a su huésped natural. (7)

Sin embargo los cerdos sirven como “vehículo de cruzamiento” capaces de mezclar virus humanos y aviáres para producir nuevos virus de gran virulencia que pueden infectar al hombre produciendo en éste altas mortalidades. Se ha estimado que el virus de Influenza de cerdo H1N1 quizá se ha transmitido en un alto porcentaje a personas jóvenes menores de 20 años de edad, quienes han tenido contacto con cerdos. (13)

De los subtipos del virus de la Influenza Aviar, la cepa H5N1 es especialmente preocupante por varias razones: cambia rápidamente y tiene una tendencia a adquirir genes de virus que infectan a otras especies animales; su capacidad para causar una enfermedad grave en el hombre. (6)

Desde hace mucho tiempo se piensa que las condiciones favorables para que se produzca un cambio genético involucran a humanos que viven en proximidad con aves de corral y cerdos. Dado que los cerdos son susceptibles a la infección tanto por virus aviar como por virus de mamíferos, incluyendo las cepas humanas, pueden comportarse como un

“recipiente de mezcla” en el que se combinan los materiales genéticos de los virus humanos y aviar, resultando en un nuevo subtipo de virus. Sin embargo, eventos recientes han identificado un segundo posible mecanismo, a través de contacto directo de humanos con aves. (6)

Esta cepa H5N1 está demostrando su capacidad de infectar directamente al hombre y si se propaga la infección entre las aves aumenta la probabilidad de una infección directa en el hombre y si éste se infecta simultáneamente por cepas de la gripa humana y aviar puede convertirse en un “mezclador”, igual que el cerdo, para dar origen a un nuevo subtipo que posea los suficientes genes humanos para poder transmitirse fácilmente de una persona a otra lo que originaría una verdadera pandemia. (13)

Se han documentado infecciones humanas con 4 subtipos: H5N1; H7N3; H7N7 y H9N2. Hasta la fecha, la influenza A (H5N1), es la única cepa aviar que produce cuadros severos con una alta tasa de letalidad en los humanos. (5)

La evolución de la enfermedad es similar a una influenza humana severa. Los síntomas incluyen: fiebre alta, tos, dolor de garganta, dolor de cabeza, dolor de las articulaciones y en algunos casos neumonía. Alrededor del 50% de los pacientes tienen diarrea, náuseas y dolor abdominal. En los casos de complicaciones se puede sufrir de malestar respiratorio agudo. La nueva gripe aviar puede tener una tasa de mortalidad alta. (14)

La transmisión es desde aves enfermas o muertas a humanos por contacto directo con sus secreciones o contacto con superficies o fómites contaminados. En las áreas afectadas por el virus, las actividades de riesgo que han sido descritas para adquirir la infección incluyen: manipulación, matanza, desplume al momento de beneficio, manipulación de aves para consumo, contacto con gallos de pelea, consumo de sangre. (5)

### **4.11.3 Contagio hombre-hombre:**

Una pandemia es básicamente, la consecuencia de la aparición de una cepa de influenza que no existe en la población humana y que de alguna manera aparece, se adapta y se puede transmitir entre humanos muy rápidamente.

Los virus de la influenza representan motivo de gran preocupación para la salud pública: los virus de la influenza tipo A, incluyendo los subtipos de diferentes especies, pueden intercambiar o “readjudicar” material genético y fusionarse.

Este proceso de readjudicación, conocido como cambio antigénico, resulta en un nuevo subtipo, diferente de los dos virus progenitores. Debido a que las poblaciones carecen de inmunidad contra el nuevo subtipo y no existen vacunas que confieran protección, históricamente, el cambio antigénico ha resultado en pandemias altamente letales. Para que esto suceda, el nuevo subtipo debe contener genes del virus de la influenza humana que lo hagan fácilmente transmisible de persona a persona durante un período suficientemente largo. (6)

Cabe aclarar que por ahora sólo se transmite de ave a humano. El contagio tiene lugar por vía respiratoria y es necesario un contacto directo y reiterado con las aves infectadas o sus excrementos en granjas o en mercados de animales vivos.

## **4.12 DIAGNÓSTICO:**

### **4.12.1. Identificación del agente causal:**

Se toman heces o muestras cloacales/traqueales de animales vivos o muestras de órganos o heces de animales muertos y se suspenden en una solución de antibióticos: penicilina (2000 uds/mL), estreptomycinina (2 mg/mL), gentamicina (50 µg/mL) y micostatina (1000 uds/mL) para tejidos y torundas traqueales y cinco veces más concentrados para heces y torundas cloacales.

El método preferido para cultivar virus de influenza aviar es la inoculación en huevos embrionados libres de patógenos específicos (SPF) o huevos negativos a anticuerpos específicos (SAN). El sobrenadante de los centrifugados de las muestras se inocula en el saco alantoideo de al menos 5 huevos de 9-11 días de incubación y se incuba a 35-37°C durante 4-7 días. Los embriones muertos, cuando esto ocurra, o los que queden al final del período de incubación se refrigeran a 4°C y el líquido alantoideo se chequea con la prueba de hemaglutinación. Si se detecta actividad de hemoaglutinación hay una probabilidad alta de la presencia de virus de influenza A o de un paramixovirus aviar. Los fluidos que den reacción negativa deben inocularse al menos en otro lote de huevos (15)

Se puede confirmar la presencia del virus de la influenza A mediante una prueba de inmunodifusión en gel entre el virus concentrado y un antisuero contra la nucleocápside que es genérica de todos los virus de la influenza A. Se preparan los antígenos concentrando el virus a partir del fluido alantoideo o de la membrana corioalantoidea.

En los últimos años, el cultivo de virus ha sido reemplazado por la RT-PCR como técnica confirmatoria y para hacer la identificación del mismo. Para la tipificación del virus, el laboratorio debe tener antisueros específicos contra los antígenos aislados de cada uno de los 16 subtipos de hemaglutinina (H1 a H16) y 9 subtipos de neuraminidasa (N1 a N9) del virus de la influenza A. (15)

#### **4.12.2. Test serológicos:**

Debido a que todos los virus de la influenza A poseen una nucleocápside antigénicamente muy similar, se utilizan los test de inmunodifusión en gel y los ELISA para detectar anticuerpos contra estos antígenos. No obstante, hay que destacar que no todos los animales desarrollan dichos anticuerpos por lo que a veces estas técnicas pueden dar falsos negativos.

También se utilizan los test de inhibición de la hemoaglutinación para detección de anticuerpos en los laboratorios serológicos pero también es posible que ésta técnica dé falsos negativos ya que la hemoaglutinina es específica del subtipo.(15)

#### **4.12.3. Pruebas serológicas:**

##### ***a) Inmunidifusión en gel de agar***

Todos los virus de influenza A tienen antígenos similares de la matriz y la nucleocápside, lo que hace posible que se pueda demostrar la presencia o ausencia de anticuerpos frente a cualquier virus influenza A por medio de la inmunidifusión en gel de agar. Esta prueba ha sido muy utilizada en diagnósticos de rutina en pollos y pavos como indicador de infección, empleando generalmente preparaciones enriquecidas en antígenos de la nucleocápsida obtenidas a partir de membranas corioalantoideas de huevos embrionados y posteriormente inactivadas. No todas las especies de aves producen anticuerpos precipitantes tras una infección con virus influenza. (11)

##### ***b) Inmunodifusión doble en gel de agar:***

Este método permite determinar la presencia del virus de influenza aviar A al demostrar la existencia de antígenos de la nucleocápside o de la matriz. A tal fin se usa como antígenos las membranas corioalantoideas infectadas de los huevos inoculados cuyo fluido alantoideo haya resultado positivo a la hemoaglutinación, negativo al control bacteriológico y a la inhibición de la hemoaglutinación con un suero contra Enfermedad de Newcastle.

También determina el control serológico cuando se desconoce el subtipo de Influenza A contra el que se quiere detectar anticuerpos.

En ambos casos se utilizará agarosa o agar al 1% que contenga un 8% de cloruro sódico en una solución amortiguadora de fosfato 0,1 M de ph 7,2. Queda confirmada cuando las líneas de precipitación formadas por el antígeno problema y el antígeno positivo conocido, frente al antisuero positivo conocido, se unen para dar una línea de identidad ó cuando las líneas de precipitación formadas por el suero problema y el suero positivo conocido, frente al antígeno conocido, se unen para dar una línea de identidad según se utilice para verificar un aislamiento viral o como prueba diagnóstica serológica. (11)

**c) Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación:**

Se considera que los títulos de inhibición de la hemoaglutinación son positivos cuando existe inhibición con una dilución del suero problema de 1/16 o mayor cuando es enfrentado con el antígeno a una concentración de 4 HAU (unidades de hemoaglutinación).  
(11)

**Reactivos:**

- Solución salina isotónica amortiguada de fosfato.
- Fluido alantoideo que contenga el virus, diluido con solución salina isotónica amortiguadora de fosfatos hasta que contenga 4 u 8 unidades de hemoaglutinación por cada 0,025 ml
- Suspensión de hematíes de gallina al 1%.
- Suero de pollo control negativo
- Suero de pollo control positivo.

**Método:**

1. Distribuir 0,025 ml de solución isotónica de fosfatos en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de plástico (usar pocillos con fondo en V)
2. Introducir 0,025 ml de suero en el primer pocillo de la placa.
3. Utilizar una micropipeta para hacer diluciones a la mitad del suero en toda la placa.
4. Añadir 0,025 ml de fluido alantoideo diluido que contenga 4 u 8 unidades de hemoaglutinación.
5. Homogeneizar golpeando ligeramente la placa refrigerada a 4 ° C durante al menos 60 minutos o dejarlas a temperatura ambiente durante 30 minutos como mínimo
6. Añadir 0,025 ml de suspensión de hematíes al 1% a todos los pocillos.
7. Homogeneizar golpeando ligeramente las placas y refrigerarlas a 4 °C

8. Examinar las placas después de 30 a 40 minutos cuando se hayan sedimentado los hematíes de control. El examen se efectuará inclinando las placas y observando la presencia o ausencia de un movimiento en forma de lágrima similar al de los pocillos de control que contengan hematíes (0,025 ml) y solución isotónica de fosfatos (0,05 ml) solamente.
9. El título de inhibición de la hemoaglutinación será la mayor dilución del antisuero que produzca una inhibición completa a 4 u 8 unidades de virus (en todas las prueba deberá incluirse una titulación de hemoaglutinación para confirmar la presencia de las unidades de hemoaglutinación necesarias).
10. La validez de los resultados dependerá de la obtención de un título de menos de  $2^3$  para 4 unidades de hemoaglutinación o de  $2^2$  para 8 unidades de hemoaglutinación con el suero de control negativo y un título que esté entre el doble y la mitad (un orden de dilución) del título conocido del suero de control positivo (11)

#### **4.12.4. Nuevas técnicas para el diagnóstico de la influenza aviar:**

En la actualidad las técnicas convencionales de aislamiento y caracterización del virus siguen siendo los métodos de elección, al menos para el diagnóstico inicial. Sin embargo los métodos convencionales resultan costosos, laboriosos y lentos. Las nuevas técnicas disponibles son:

##### ***a) Detección del antígeno***

El kit comercial disponible Directigen® Flu (Becton Dickinson Microbiology Systems), ha sido empleado para detectar la presencia del virus influenza A en aves, en particular en USA. Emplea un anticuerpo monoclonal contra la nucleoproteína y debería ser capaz, por tanto, de detectar cualquier virus de influenza A. Aunque fue desarrollado para detectar el virus en infecciones de mamíferos, se ha aplicado con éxito también en aves. Su principal ventaja es que puede demostrar la presencia del virus en 15 minutos. La desventaja es que puede faltarle sensibilidad, no ha sido validado para diferentes especies de aves, no se logra la identificación del subtipo y el kit es caro. Debe ser interpretado



como una prueba de rebaño y no como una prueba individual en una sola ave. La mayor sensibilidad se logra con muestras de orofaringe y tráquea de aves afectadas clínicamente o muertas.

***b) Detección directa del ARN***

rT-PCR: La Reacción en cadena de la polimerasa para la transcripción inversa, podría, lograr una rápida detección e identificación del subtipo, al menos de los H5 y H7, y se obtendría un ADN complementario sobre el que podría emplearse la secuenciación de nucleótidos. Se debe tener en cuenta el tipo de muestra clínica empleada, ya que según parece, las muestras traqueales de aves infectadas muestran una gran sensibilidad y especificidad para la detección del virus por RT-PCR, pero con las muestras de heces la sensibilidad sería deficiente. La aplicación práctica de la rT-PCR podría estar en la identificación rápida de brotes subsecuentes una vez que se ha detectado un foco primario y se ha caracterizado el virus.

**4.13 VALORACIÓN DE LA PATOGENICIDAD:**

Se han producido numerosos aislamientos de subtipos de cepas H5 y H7 de baja patogenicidad, pero todas las cepas altamente patógenas aisladas hasta la fecha tenían la hemoaglutinina H5 o H7. Para obtener más información sobre la patogenicidad real o potencial de los subtipos de H5 o H7 aislados se puede recurrir al secuenciado de su genoma ya que la patogenicidad va ligada a la presencia de múltiples aminoácidos básicos (arginina o lisina) en el punto de corte del precursor de la hemoaglutinina. Este secuenciado de aminoácidos en los virus influenza H5 o H7 de baja virulencia debería poner de manifiesto a aquellos virus que como el de Pensilvania tenían la capacidad de, tras una simple mutación, convertirse en altamente patógenos para las aves. (11)

El criterio adoptado por la OIE para clasificar a un virus influenza como virus de influenza aviar declarable altamente patógena es el siguiente:

a) Se emplea uno de los dos métodos siguientes para determinar su patogenicidad en pollos. Es un virus de influenza aviar declarable altamente patógena si:

i) Es letal (cuando las aves están demasiado enfermas para comer o beber deben someterse a eutanasia). Para 6, 7 u 8 de 8 pollos susceptibles de 4 a 8 semanas de edad en el plazo de 10 días tras la inoculación intravenosa de 0.2 ml de una dilución 1/10 de fluido alantoideo infectivo libre de bacterias.

ii) Cualquier virus que tiene un índice de patogenicidad intravenosa mayor de 1.2, siguiendo un procedimiento establecido para determinarlo, que se basa como el anterior en la inoculación en pollos de fluido alantoideo de un determinado título infectivo.

b) Para todos los virus H5 y H7 de baja patogenicidad en pollos se debe determinar la secuencia del péptido de conexión de la hemoaglutinina. Si la secuencia es similar a la observada en los altamente patógenos, el virus que se está analizando debe ser considerado también como altamente patógeno. (11)

La OIE también establece el siguiente sistema de clasificación para identificar los virus para los que se requiere una declaración de enfermedad y medidas de control.

a) Todos los virus aislados que cumplan los criterios anteriormente expuestos se consideran virus de influenza aviar declarable altamente patógena. VIADAP

b) Todos los subtipos H5 y H7 no virulentos para el pollo y que en el punto de corte de la hemoaglutinina no tienen una secuencia de aminoácidos similar a la de los definidos anteriormente como declarables y altamente patógenos se consideran virus de influenza aviar declarable de baja patogenicidad. VIADBP.

c) Los subtipos que no son H5 o H7 y que no son virulentos para el pollo se clasifican como virus de influenza aviar de baja virulencia. VIABV.

Para el secuenciado del código genético que codifica para la región de corte del precursor de la hemoaglutinina de los subtipos H5 y H7 se emplea la transcripción inversa con la reacción en cadena de la polimerasa y varias etapas de este procedimiento se facilitan empleando kits comerciales disponibles y secuenciadores automáticos. (11)

#### **4.14 CONTROL Y PREVENCIÓN:**

La cuarentena de las granjas avícolas infectadas y la destrucción de las poblaciones de aves infectadas o potencialmente expuestas, constituyen medidas de control estándar para prevenir la diseminación a otras granjas y el eventual establecimiento del virus en la población avícola. (15)

Aparte de ser altamente contagiosos, los virus de la influenza aviar son fácilmente transmitidos de granja a granja por vía mecánica, como por ejemplo a través de equipo contaminado, vehículos, alimento, jaulas o ropa. Parte de ello radica en el lavado y desinfección de equipo para transporte de animales, así como de los vehículos que se utilizan para la movilización de estos por ello es importante el uso de detergentes y desinfectantes que nos permitan tener la seguridad de la eliminación de este virus evitando así, la entrada a las instalaciones de materia que pueda contenerlo; pero al mismo tiempo no sean corrosivos para la pintura de los vehículos de transporte. (15)

Los virus altamente patógenos pueden sobrevivir en el ambiente durante largos períodos, especialmente a bajas temperaturas. Sin embargo, las estrictas medidas sanitarias en las granjas pueden conferir cierto grado de protección.(15)

Numerosas vacunas contra la Influenza Aviar han sido desarrolladas y bajo condiciones experimentales y de campo han mostrado ser eficaces para la prevención de la enfermedad. (15)

#### **4.15 INFLUENZA AVIAR EN GUATEMALA:**

Se ha seguido con atención el recorrido a nivel mundial que está alcanzando la cepa viral H5N1 de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (IAAP), porque en la medida que trasciende las fronteras de un país a otro, la amenaza se hace más latente para países libres de este virus.

Es importante hacer una diferenciación de los subtipos de influenza existentes, porque de ello depende que se tomen medidas precautorias de carácter interinstitucional o se promuevan falsas alarmas en la población guatemalteca. Y es necesaria esta diferenciación porque la cercanía de Guatemala con países afectados por un subtipo de Influenza Aviar de Baja Patogenicidad nos hace creer que estamos cercanos a la “cepa asiática” de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad H5N1, cuando en realidad son dos afecciones distintas. En el caso de México concretamente, los brotes detectados son de H5N2 que generalmente afecta sólo a las aves.

En México en el año 1994 se presentó un brote de Influenza Aviar Altamente Patógena (IAAP) del virus H5N2, también se han presentado en la región casos de influenza aviar de baja patogenicidad en el año 2000 en Guatemala y El Salvador (H5N2).

Para Guatemala se focalizaron tres departamentos que se encuentran en control y centinelización, y que según explica el Programa Nacional de Sanidad Avícola (PROSA) son: Sacatepéquez, Guatemala capital y Chimaltenango.

Estos episodios si bien han sido aislados, hace pensar en una posible amenaza, considerando la información sobre rutas migratorias de aves y las especies involucradas en la difusión de la IAAP y la movilización de productos avícolas.(1)

Actualmente existen proyectos cuyo objetivo es reforzar la capacidad de los países centroamericanos para generar y compartir información sobre la IAAP, con el fin de

fortalecer los planes de alerta precoz y reacción temprana ante una eventual introducción de la IAAP en las regiones, en especial, a través de aves migratorias y del comercio de aves silvestres. La cabecera operacional del proyecto y su Coordinador Regional está ubicada en: San Salvador – El Salvador. (1, 10)

A nivel regional se conformó La Comisión Nacional Antipandémica de Influenza Aviar (CNAPI). En 2006 la Organización Panamericana para la Salud (OPS) ente técnico normativo y Salud Pública dan inicio a la preparación y respuesta ante la amenaza de una pandemia de *Influenza Aviar*, proponen medidas y acciones con el objeto de implantar el proceso de participación inter-institucional y sectorial sostenible para elaborar, modificar e implementar el Plan Nacional.

La FAO tiene en marcha un Proyecto de Asistencia TCP/RLA/3104 para reforzar los servicios veterinarios de los países de la Región.

En el 2006, OIRSA apoya la Reunión de Ministros de Agricultura, Ambiente y Salud en Panamá.

En Abril del 2007, Guatemala inicia el Comité Multisectorial. (10)

El plan de acción incluye el integrar planes anti pandémicos, activar el comité intersectorial y las estrategias de financiamiento para el apoyo de la vigilancia. (14)

Por otra parte PROSA dentro de sus acciones estableció la vigilancia en las zonas de los humedales por ser reservorios de biodiversidad, áreas de cría y refugio de diferentes especies y que figuran entre los ecosistemas más vulnerables a los Cambios Globales (clima, productividad del suelo, recursos hídricos y oceánicos, química atmosférica y la ecología de los sistemas terrestres) que puedan alterar la capacidad del planeta para sustentar la vida y que incide grandemente en el cambio del comportamiento de los agentes etiológicos de las enfermedades que afectan al humano y a los animales. (12, 13, 14)

CONAP reporta en Guatemala un inventario de 191 humedales de los que clasifica como marino costeros 6 , pantanos 3, lagos, lagunas y lagunetas 63, ríos y arroyos 114. (10)

Las acciones tienen por objeto evitar el impacto negativo en la salud pública y la avicultura nacional, además de establecer la primera línea de defensa y permitir una alerta temprana. Además realiza sus actividades priorizando los humedales de densidad media - elevada de aves migratorias, alta densidad de aves de corral, y los sitios de reunión de las aves migratorias, alta densidad poblacional de aves silvestres. Categorizando el riesgo en base a la densidad de población humana y animal, convivencia entre especies animales, el movimiento de aves y personas, costumbres, accesos, rutas de aves migratorias, costumbres de captura, encierro de aves migratorias con domésticas y su comercialización. (2, 13)

#### **4.16 INFLUENZA AVIAR A NIVEL MUNDIAL:**

Históricamente, los brotes de la IAAP han ocurrido en todos los continentes. La epidemia actual de Influenza Aviar, causada principalmente por el subtipo H5N1 de linaje asiático, ha persistido desde que fue reconocida inicialmente en Corea del Sur en diciembre de 2003. A pesar de los esfuerzos realizados para su control, aun se registran brotes en Tailandia, Vietnam, Indonesia, la República Popular China y Camboya, y se ha extendido a países del Este de Europa, Medio Oriente y África.

Los brotes detectados en enero de 2007 en Hungría y Nigeria, y posteriormente en Inglaterra en el mes de febrero, demuestran que la enfermedad sigue propagándose y constituyen una nueva señal de alerta para los países de América Latina y el Caribe, respecto al riesgo de un posible contagio.

Esta variante, caracterizada por su rápida evolución, la gravedad de los signos que produce y una mortalidad de hasta el 100%, constituye una real amenaza para la avicultura mundial.

#### **4.17 IMPORTANCIA ECONÓMICA:**

La Influenza Aviar Altamente Patógena (IAAP) siempre afecta gravemente a los avicultores en todos los lugares donde se presenta, y ante la posibilidad de una pandemia de este subtipo sería devastador tanto para la economía como para la población. (15, 10)

Consideraciones Iniciales sobre impacto económico-comercial:

- a) El consumo de carne aviar (pollos, pavos y patos) aproximado en la UE asciende a los 10.5 millones de toneladas anuales, con una producción de 11.1 millones de tons. Los principales países productores son Francia, Reino Unido, España, Alemania e Italia.
- b) Anualmente, la UE importa 590 mil toneladas de carne aviar fresca, congelada o cocinada.

La crisis de gripe aviar, en el caso de países productores como Alemania, Francia, España, Italia o Reino Unido, generarían impactos diversos en lo económico-comercial difíciles de cuantificar, pero que podrían concentrarse en lo siguiente:

- Baja del consumo de carne de aves refrigerada, de origen europeo;
- Aumento del consumo por sustitución de la carne porcina, donde la UE es fuerte productor;
- Pérdida de terceros mercados de exportación por parte de la UE;
- Disminución del consumo de piensos europeos e importados para la avicultura.

Para los terceros países, productores y exportadores, los impactos podrían ser:

- Aumento de exportaciones por la sustitución de carne refrigerada europea por carne congelada no europea;

- Aumento de exportaciones hacia terceros países clientes hoy de la UE;
- Posibles disminuciones de exportaciones a la UE de maíz, soya y harina de soya para alimentos para animales. (15)

#### **4.18 IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA:**

Debido a que es una enfermedad que compete a las autoridades de sanidad animal, se ha manifestado preocupación por la posibilidad de que ésta se transmita a las personas y adquiriera el virus la capacidad de propagarse entre los seres humanos y se desarrolle una pandemia. Esto representa un desafío veterinario, epidemiológico y virológico para la comunidad científica internacional. (7)

Además, la facilidad de una propagación de la infección entre las aves en los mercados de aves de corral vivas y a través de las aves migratorias aumenta la probabilidad de una infección directa del hombre. Si a medida que pasa el tiempo crece el número de personas infectadas, aumentará también la probabilidad de que el ser humano, cuando se vea infectado simultáneamente por cepas de la gripe humana y la gripe aviar, sirva también de «tubo de ensayo» del que emerja un nuevo subtipo que posea los suficientes genes humanos para poder transmitirse fácilmente de una persona a otra. (7)

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 RECURSOS:**

#### **5.1.1 RECURSOS HUMANOS:**

- Profesional del Diagnóstico aviar, del Programa Nacional de Sanidad Avícola (PROSA), del Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación (MAGA).
- Médico Veterinario, Jefe del Área Central, PROSA
- 2 Técnicos, PROSA
- Tesista
- 3 Médicos Veterinarios asesores de tesis



- Profesional y Técnica del Laboratorio de Investigaciones Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas (IIQBBB) de la Universidad Mariano Gálvez de Guatemala.

#### **5.1.2 RECURSOS DE CAMPO:**

- Vehículo automotor.
- Sujetador para cerdos.
- Boletas numeradas proporcionadas por el laboratorio.
- Tubos de polipropileno identificables, conteniendo medio de transporte en gel.
- Hisopos de dacrón o poliéster con mango de plástico.
- Bolsas Ziploc.
- Termo hielera con sus correspondientes refrigerantes.
- Bolsas plásticas debidamente identificadas.
- Guantes desechables
- Mascarillas desechables.

#### **5.1.3 RECURSOS DE LABORATORIO:**

- Laboratorio Nivel de seguridad III
- Hardware y Software PCR
- Kit para el diagnóstico del virus
- Reactivos
- Insumos para la realización de las pruebas.

#### **5.1.4 RECURSOS BIOLÓGICOS:**

- 60 Cerdos
- Contenido en muestras de hisopado rectal tomado a los cerdos.

## 5.2 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

La investigación de campo del presente trabajo se llevó a cabo en dos aldeas del Área Central de Guatemala, incluye ésta los departamentos de Guatemala, Chimaltenango, Sacatepéquez y Baja Verapaz, definida así por el Programa Nacional de Sanidad Avícola de acuerdo a sus lineamientos de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades aviares, las aldeas en donde se tomaron las muestras para el estudio fueron Pachalí de San Juan Sacatepéquez y Agua dulce de Zaragoza Chimaltenango,

## 5.3 METODOLOGÍA

### 5.3.1 Criterio de selección de las aldeas para la toma de la muestra:

- a. Estar ubicada en alguno de los departamentos del Área Central de Guatemala.
- b. Tener registro del comportamiento serológico de Influenza Aviar en la aldea por el Programa Nacional de Sanidad Avícola.

### 5.3.2 Criterio de selección de los cerdos para la toma de la muestra:

- a. Que los cerdos no fueran de reciente introducción
- b. Ser mayores de seis meses

### 5.3.3 Medidas de bioseguridad en la obtención de la muestra

Para la toma de la muestra en el campo se llevaron a cabo las medidas higiénicas sanitarias, y de bioseguridad recomendadas por el laboratorio:

Uso de bata, mascarilla y guantes desechables.

Calzado cubierto con bolsas plásticas.

Se descartó esta indumentaria y los materiales utilizados, colocando todo dentro de la bolsa plástica proporcionada para el efecto.

Se colocó todos los materiales sobrantes dentro de la bolsa plástica indicada

Se rociaron las bolsas plásticas con el desinfectante proporcionado por el laboratorio.

Al finalizar la toma de las muestras, se roció con desinfectante la vestimenta y el calzado de los participantes, con el desinfectante proporcionado por el laboratorio.

Antes de salir de la aldea se lavó y desinfectó el vehículo.

#### 5.4 DISEÑO ESTADÍSTICO

Se utilizó el método de Cannon y Roe, según fórmula  $n = (1 - (1 - \alpha)^{1/D}) (N - (D - 1) / 2)$   
 Tamaño de la Población es de 500 cerdos. El nivel de Confianza 95%  
 Prevalencia esperada 10% Tamaño de la muestra 30  
 Las muestras se distribuyeron en 10 casas de la comunidad tomando como referencia los cuatro puntos cardinales y el centro. El número de muestras es de 30 por cada comunidad.

#### 5.5 TOMA DE LA MUESTRA Y TRANSPORTE AL LABORATORIO PARA SU PROCESAMIENTO.

La recolección de las muestras fue llevada a cabo por el investigador con la colaboración de los dos técnicos del Programa Nacional de Sanidad Avícola. En las dos comunidades del Área Central de Guatemala, se identificaron las casas de los diferentes puntos cardinales, que tenían cerdos que no eran de reciente ingreso y eran mayores de seis meses. En cada una de ellas se procedió a llenar la boleta proporcionada por el laboratorio, la cual estaba numerada y a la que se le asignó un código conformado por el Número de Área, municipio y el correlativo correspondiente a la muestra, se identificó el tubo correspondiente, con el número de boleta asignada. Utilizando el sujetador con el cerdo, se tomó un hisopado rectal, se colocó el hisopo dentro del tubo, moviendo suavemente la cabeza del hisopo dentro del gel para conservar la muestra; el tubo se colocó dentro de la bolsa Ziploc y ésta se introdujo inmediatamente en el termo hielera que contenía los refrigerantes; ésta a su vez dentro de la bolsa plástica correspondiente.

Se cumplió con las medidas de bioseguridad indicadas por el laboratorio.

Las muestras y el material utilizado para el efecto se transportó al laboratorio de Investigaciones Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas (IIQBBB) de la Universidad Mariano Gálvez de Guatemala.

El personal designado por el laboratorio llevó a cabo la recepción, verificación e identificación de las muestras para su procesamiento.

### Procesamiento de las muestras en el laboratorio.

Para la detección del virus Influenza Tipo A Sub tipo H5, se utilizó la técnica de Reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real :

**1ro.** Para la realización de las pruebas diagnósticas se utilizo el Kit: **TaqMan Influenza A/H5 Detection Kit Version 1.0 de Applied Biosystems, Lote # J11275,**

<b>Specificity Matrix (any influenza)</b>	<b>M+25* 5´primer</b>	<b>Secuence 5´-AgATgAgTC TTC TAA CCg AggTCg-3´</b>
<b>BHQ-1</b>	<b>M+64*  Probe</b>	<b>5´-FAM-TCaggC CCC CTC AAA gCC gA-</b>
	<b>M-124* 3´Primer</b>	<b>5´TgC AAA AAC ATC TTC AAg TCT CTg-3´</b>
<b>H7-North American</b>	<b>H7+1244* 5´primer</b>	<b>5´-ATT ggA CAC gAg ACg CAA Tg-3´</b>
	<b>H7+1281* Probe a</b>	<b>5´-FAM-TAA TgC TgA gCT gTT ggT ggC-BHQ-1-3´</b>
	<b>H7-1342* 3´primer</b>	<b>5´-TTC TgA gTC CgC AAg ATC TAT Tg-3´</b>
<b>H5- North American</b>	<b>H5+1456* 5´NA primer</b>	<b>5´-ACgTATgACTATCCACAATACTAC-3´</b>
<b>H5-Eurasian</b>	<b>H5+1456* 5´EAprimer</b>	<b>5´ACgTATgACTACCCgCagTATTCA-3´</b>
	<b>H5+1637* Probe</b>	<b>5´-FAM-TCA ACA gTg gCg AgT TCC CTA gCA-BHQ-1-3´</b>
	<b>H5- 1685* 3´primer</b>	<b>5´- AgA CCA gCT ACC ATg ATT gC-3´</b>

**2do.** El método de extracción para el RNA fue a través de la técnica de extracción con **Trizol**.

**3ro.** Se utilizó un control de proceso, (muestra referencia positiva para el virus Influenza Tipo “A” pero negativa para el “H5 “. Y un liofilizado de H5 N3 donado por la Universidad de Vicosa, Brasil, como control positivo para H5.

**4to.** Se utilizó el equipo de Applied Biosystems: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System

## VI . RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el desarrollo del presente estudio se llevo a cabo la determinación de virus influenza en cerdos, fueron recolectadas 60 muestras de hisopado rectal, en dos comunidades del Área Central de Guatemala.

En la aldea Pachalí de San Juan Sacatepéquez del departamento de Guatemala, se recolectaron 30 muestras de hisopados rectales de cerdos de traspatio mayores de seis meses, en diez casas ubicadas en los cuatro puntos cardinales y el centro.

En la aldea Agua dulce, Zaragoza del departamento de Chimaltenango, se recolectaron 30 muestras de hisopados rectales de cerdos de traspatio mayores de seis meses, en diez casas ubicadas en los cuatro puntos cardinales y el centro.

Los cerdos de las comunidades no presentaban síntomas respiratorios al momento de recolectar la muestra. La condición física de los animales era irregular. Se incluyeron en la muestra hembras y machos indistintamente.

Las muestras fueron sometidas a la detección directa del *ARN* del virus Influenza tipo A y la del sub tipo H5, a través de la reacción en cadena de la polimerasa para la transcripción inversa (rT-PCR)

El laboratorio reportó resultados negativos para la presencia del virus Influenza Tipo A y el Sub tipo H5 en el total de las muestras remitidas.

## VII. CONCLUSIONES

1. Los cerdos de las aldeas Agua Dulce y Zaragoza son negativos a la presencia del virus Influenza Tipo A y el Sub tipo H5.
2. La detección directa del *ARN* del virus Influenza tipo A y la del sub tipo H5, a través de la reacción en cadena de la polimerasa para la transcripción inversa (rT-PCR) fue negativa en las muestras de hisopado rectal.

## VIII. RECOMENDACIONES

1. Que el presente estudio sea utilizado para continuar investigando lo relacionado con el tema, principalmente si las aves presentan serología positiva a la Influenza Aviar.
2. Llevar a cabo un estudio de Influenza en el que se tomen muestras tanto de los cerdos como de las aves que conviven con estos.
3. Llevar a cabo un estudio de Influenza en cerdos del Área Central, con el Método de PCR en Tiempo Real, utilizando como muestra el suero sanguíneo.
4. Fortalecer los programas de capacitación en los mercados del Área Central, que reúnen a las diferentes autoridades con las personas que se dedican al comercio de especies animales.
5. Apoyar las actividades de educación sanitaria avícola que se llevan a cabo con escuelas de varias comunidades del Área Central, dando a conocer el riesgo entre la convivencia de los cerdos y las aves.



## IX. RESUMEN

El presente estudio se realizó en las aldeas de Agua Dulce del municipio de Zaragoza del departamento de Chimaltenango y Pachalí del municipio de San Juan Sacatepéquez departamento de Guatemala, con el objeto de la determinación del virus de la Influenza tipo A, subtipo H5 en cerdos; utilizando la detección directa del *ARN* del virus a través de la reacción en cadena de la polimerasa para la transcripción inversa (rT-PCR).

El criterio utilizado para definir las comunidades del estudio obedece a la zonificación del país que para el efecto de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades aviares ha sido establecida por el Programa Nacional de Sanidad Avícola (PROSA) del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA), el Área Central incluye a los departamentos de Guatemala, Chimaltenango y Sacatepéquez. Este Programa lleva a cabo las acciones de control y centinelización del virus Influenza Aviar. Cuenta con registros del comportamiento serológico del virus en las aves de ambas comunidades.

Observándose todas las medidas de bioseguridad recomendadas por el laboratorio, en 10 casas de cada comunidad, repartidas en los cuatro puntos cardinales y en el centro, se tomaron 30 muestras de hisopado rectal de cerdos mayores de seis meses de edad que no fueran de reciente introducción al lugar.

Los resultados obtenidos en la prueba rT-PCR fueron negativos a la presencia del virus Influenza tipo A y al subtipo H5.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Asistencia de emergencia para la detección temprana de la influenza aviar en Centroamérica. 2007. (en línea). Consultado 20 ago. 2009. Disponible en [www.fao.org/copyright\\_es.htm](http://www.fao.org/copyright_es.htm)
2. Biomed central , Virology. 2009. (en línea). Consultado 20 ago. 2009. Disponible en [www.biomedcentral.com](http://www.biomedcentral.com)
3. Conserjería Agrícola Argentina ante la Unión Europea. Union europea- la crisis de la influenza aviar: medidas sanitarias y posibles consecuencias economico-comerciales. (en línea). Argentina. Consultado 28 ene. 2008. Disponible en [www.senasa.gov.ar](http://www.senasa.gov.ar).
4. Diagnóstico de la influenza aviar. 2007. (en línea). Consultado 28 ene. 2008. Disponible en <http://epi.minsal.cl/epi/html/normas/circul/circularinflaviar.pdf>
5. Gripe del pollo en cerdos. 2004 (en línea). Consultado 26 jun. 2008. Disponible en [www.bbcmundo.com](http://www.bbcmundo.com).

6. Influenza aviar. 2004. (en línea). Consultado 20 dic. 2008. Tomado del [Boletín Epidemiológico, Vol. 25 No. 1, mar. 2004](#). Disponible en [http://www.paho.org/Spanish/PAHO/about\\_paho.htm](http://www.paho.org/Spanish/PAHO/about_paho.htm)
7. Influenza aviar. 2008. Ficha descriptiva de la enfermedad. (en línea). Consultado 28 jun. 2008. Disponible en [www.bi-vetmedica.com.mx](http://www.bi-vetmedica.com.mx)
8. Influenza (gripe aviar): Su importancia en la salud pública. 2004. (en línea). Consultado 20 dic. 2008. Disponible en [www.gripeaviar.com](http://www.gripeaviar.com)
9. Influenza (H5N1): Infección con Influenza A H5N1. 2008. (en línea). Consultado 22 dic.2008. Disponible en [www.alud.gov.pr/Services/Influenza.aspx](http://www.alud.gov.pr/Services/Influenza.aspx)
10. Lee, Ch; Senne, DA; Suarez, DL. 2004. Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 Avian Influenza Virus. *Journal of Virology*. Pag. 8372 - 8381.
11. Plan nacional de sanidad avícola. Manual de procedimientos Influenza aviar altamente patógena.2003 (en línea). Consultado 26 jun. 2008. Disponible en [Http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/00/programas/sanidad\\_avicola/influenza\\_aviar.pdf](Http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/00/programas/sanidad_avicola/influenza_aviar.pdf)
12. Rivera García, O. 2008. Influenza Aviar: 2008. ¿De los Cerdos al Hombre?. (en línea). Consultado 13 abr. 2008. Disponible en [www.engomix.com](http://www.engomix.com).

13. Swayne, DE; King, DJ. 2003. Avian Influenza and Newcastle Disease. *Vet Med Today*. JAVMA 222 (11) : 1534-1540.
  
14. Swayne, DE et al. 2000. Vaccines protect chickens against H5 highly pathogenic avian influenza in the face of genetic changes in field viruses over multiple years. *Veterinary Microbiology*. Vol. No. 74. Pag. 165 - 172.
  
15. Virus de la influenza aviar: métodos diagnósticos. 2008 (en línea). Consultado 28 ago. 2008. Disponible en [www.cultek.com](http://www.cultek.com).

## XI. ANEXOS

### Anexo 1: TABLA DE RECOLECCION DE DATOS.

**MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA Y ALIMENTACION.  
UNIVERSIDAD MARIANO GALVEZ DE GUATEMALA.  
PROYECTO VIGILANCIA DE INFLUENZA AVIAR H5N1 EN AVES DE TRASPATIO AÑO**

#### INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS

No. De Boleta: \_\_\_\_\_

Código: \_\_\_\_\_

#### Datos Demográficos

País: \_\_\_\_\_ Departamento: \_\_\_\_\_

Municipio: \_\_\_\_\_

Región: \_\_\_\_\_ Comunidad: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Humedal: \_\_\_\_\_

Georreferenciación: \_\_\_\_\_

Nombre Colaborador o Propietario:

\_\_\_\_\_

#### Datos Epidemiológicos:

**Población total de aves:** \_\_\_\_\_

**Tipo de Ave:** Gallo: [ ] Gallina: [ ] Pollo: [ ] Pato: [ ]

Pavos: [ ] Codornices: [ ] Pijije: [ ] Gansos: [ ] Coquecha: [ ]

Otro: [ ] especificar: \_\_\_\_\_

**Procedencia del ave:** Nativa: [ ] Comprada: [ ] Silvestre: [ ]

Migratoria: [ ]

**Han tenido sus aves contacto con aves migratorias:**

Si: [ ] No: [ ] especificar: \_\_\_\_\_

**Se capturan aves en su comunidad:**

Si: [ ] No: [ ]

**El ave a muestrear presenta alguna sintomatología:**

Si: [ ] No: [ ]

**Síntomas:**

	Si	No
Respiratorios	[ ]	[ ]
Digestivos	[ ]	[ ]
Nerviosos	[ ]	[ ]
Otros:	[ ]	[ ]

**Número de Aves enfermas:** \_\_\_\_\_

**Número de Aves muertas:**

\_\_\_\_\_

**Ha sido vacunada contra influenza aviar:** Si: [ ] No: [ ]

**Responsable de la Toma de Muestra:**

\_\_\_\_\_

**Responsable de la Información:**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Datos de laboratorio:**

**Fecha de Toma de Muestra:** \_\_/\_\_/\_\_

**Tipo de muestra:** Sangre: [ ] **Hisopado de Cloaca:** [ ]

**Fecha de Envío de la Muestra:** \_\_/\_\_/\_\_ **Hisopado Traqueal** [ ]

**Fecha de Recepción de la Muestra en el Laboratorio:** \_\_/\_\_/\_\_

**Observaciones:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **Anexo 2: INSTRUCTIVO DE LLENADO DE RECOLECCION DE DATOS PARA PROYECTO VIGILANCIA DE INFLUENZA AVIAR H5N1 EN AVES DE TRASPATIO AÑO 2006-2007**

### **Código:**

En este espacio se escribió el código que identificara cada una de las muestras tomadas, el cual fue elaborado colocando en sus cinco (5) primeros dígitos por los números de codificación para el país, departamento y municipio de Guatemala, establecidos por el Instituto Nacional de Estadística. Posteriormente se anotó el número de boleta que se está llenando, los siguientes dos (2) números corresponderán al mes del año en el cual se toma la muestra y los últimos dos (2) números fueron los que corresponden al año en el que se está tomando la muestra. Los tres grupos de dígitos fueron separados por un guión.

### **Datos Demográficos:**

**Nombre del país:** Se anotó el nombre del país de la comunidad en donde se tomó la muestra.,

**Departamento:** nombre del departamento de Guatemala a donde pertenecía el ave en donde se tomó la muestra.

**Municipio:** nombre del municipio del departamento a donde pertenecía el ave de donde se tomó la muestra.

**Nombre de la región:** Se anotó el nombre de la región del municipio en donde se tomó la muestra.

**Comunidad:** nombre de la comunidad a donde pertenecía el ave de donde se tomó la muestra **Dirección:** Si existía una dirección exacta en la comunidad a donde pertenecía el ave muestreada se anotó en este espacio en blanco.

**Georreferenciación:** En este espacio se anotaron los datos correspondientes a las coordenadas de ubicación de la región o comunidad de donde provenía la muestra, esto se hizo registrando la latitud y altitud en grados y minutos.

**Nombre del propietario o colaborador:** Se anoto el nombre del propietario del ave de la cual se tomo la muestra o en su defecto el nombre del colaborador voluntario de esa comunidad.

**Datos Epidemiológicos:**

**Población Total de Aves:** En este espacio se coloco el número total de aves del lugar a donde pertenecía el ave a la que se le tomo la muestra.

**Tipo de Ave:** Se anoto con una X dentro de los cuadros el tipo de ave que se muestreo. Si fue otro tipo diferente a los especificados se anoto en otros y se escribió la especie a la que pertenece en el espacio en blanco correspondiente.

**Procedencia del Ave:** Se escribió una X dentro del cuadro que indica la procedencia del ave a la que se le tomó la muestra (puede haber más de una opción en este ítem).

**Han tenido sus aves contacto con aves migratorias:** Se escribió una X para indicar si hubo o no contacto con aves migratorias. En caso de que la respuesta fue “sí”, se especificó con cual tipo de ave.

**Se capturan aves en su comunidad:** Se escribió una X en el cuadro de “si” cuando fue positiva la respuesta y lo contrario si no se capturan aves en la comunidad que se visitó para la vigilancia.

**El ave a muestrear presenta alguna sintomatología:** Se anotó una X en el cuadro que corresponde para describir si el ave a muestrear presentó o no síntomas de alguna enfermedad.

**Síntomas:** Se anoto una X en la columna que corresponde, para indicar si el ave presentó algunos de los síntomas que se enumeran en la columna izquierda de la pregunta.

**Número de aves enfermas:** Si existieron, se anotó el número de aves enfermas en la granja o casa a donde pertenecía el ave a muestrear.

**Número de aves muertas:** Si existieron, se anotó el número de aves muertas en la granja o casa a donde pertenecía el ave muestreada.



### Anexo 3

**Lugar de la Investigación: Área central del país de acuerdo al Programa Nacional de Sanidad Avícola (PROSA)**



### Anexo 4

**Localización de las aldeas Agua Dulce y Pachalí**









