

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

AISLAMIENTO DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN PIERNA Y
PECHUGA DE POLLOS DESAFIADOS CON VIRUS H5N2 VACUNADOS Y
NO VACUNADOS CON VACUNA RECOMBINANTE

TESIS

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

POR

MARÍA JIMENA DE AGUIRRE RIVERA

AL CONFERÍRSELE EL GRADO ACADÉMICO DE

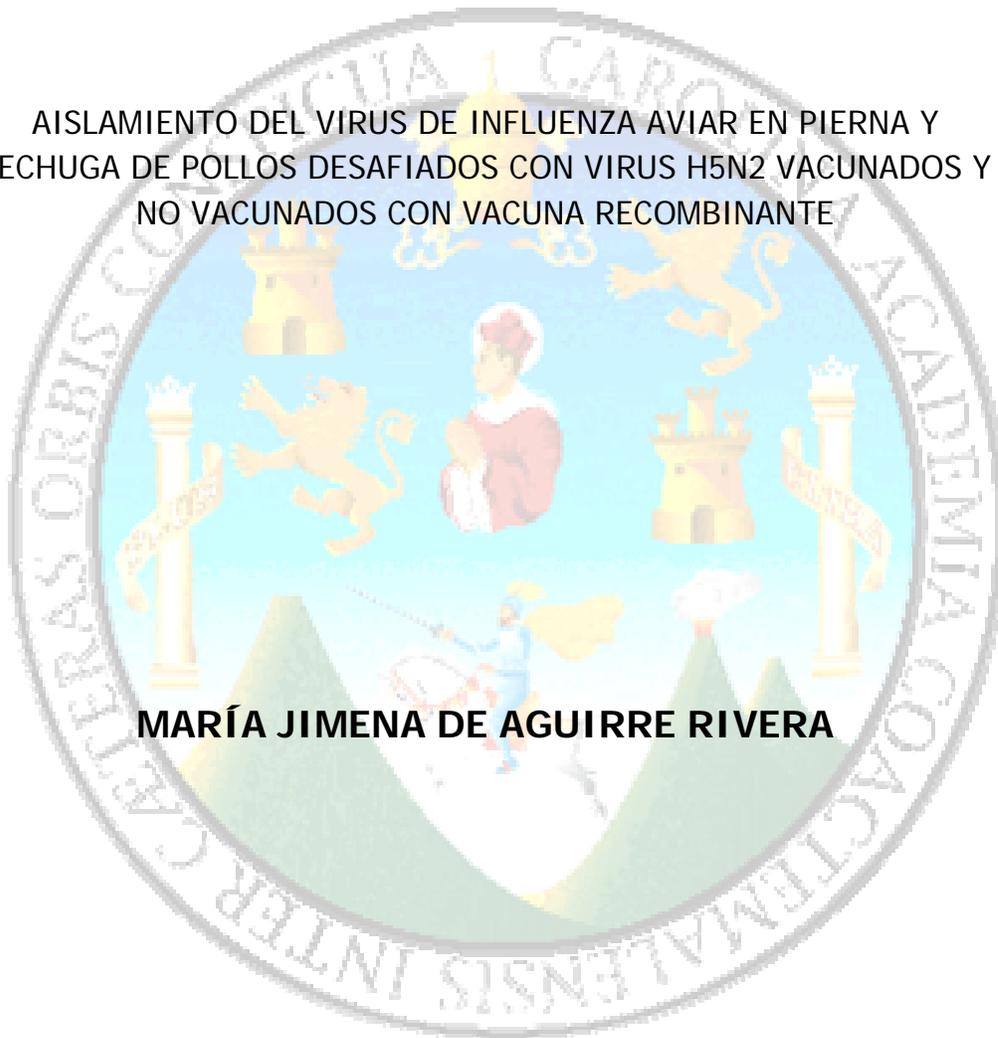
MÉDICA VETERINARIA

GUATEMALA, MAYO DE 2010

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

AISLAMIENTO DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN PIERNA Y
PECHUGA DE POLLOS DESAFIADOS CON VIRUS H5N2 VACUNADOS Y
NO VACUNADOS CON VACUNA RECOMBINANTE

MARÍA JIMENA DE AGUIRRE RIVERA



GUATEMALA, MAYO DE 2010

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: Med.Vet. YERI EDGARDO VÉLIZ PORRAS
VOCAL II: Mag. Sc. M.V. FREDY ROLANDO GONZÁLEZ GUERRERO
VOCAL III: Med.Vet. y Zoot. MARIO ANTONIO MOTTA GONZÁLEZ
VOCAL IV: Br. SET LEVI SAMAYOA LÓPEZ
VOCAL V: Br. LUIS ALBERTO VILLEDA LANUZA

ASESORES

MSc. M.V LUCRECIA MOTTA RODRIGUEZ
MSc. M.V. LUCERO SERRANO ARRIAZA
MSc. M.V. FRANCISCO ESCOBAR SERRANO

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los estatutos de la Universidad de San Carlos de Guatemala presento a vuestra consideración el trabajo de tesis titulado:

AISLAMIENTO DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN PIERNA Y PECHUGA DE POLLOS DESAFIADOS CON VIRUS H5N2 VACUNADOS Y NO VACUNADOS CON VACUNA RECOMBINANTE

Que fuera aprobado por la junta directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar el título profesional de

MÉDICA VETERINARIA

TESIS QUE DEDICO

A DIOS

A mis papás: Por su cariño, ejemplo y apoyo. Gracias por ayudarme a concluir este sueño.

A mis hermanos: Rodrigo por esos buenos consejos y Manuel por esas clases de medicina, sos un ejemplo.

A mis amigos: Por apoyarme durante estos años y por regalarme tan buenos momentos.

A la familia Johnston: Por la oportunidad de crecer y realizarme como profesional.

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

AL PERSONAL DEL DEPARTAMENTO DE ORNITOPATOLOGÍA Y
AVICULTURA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

A MIS ASESORES:

MSc. M.V LUCRECIA MOTTA RODRIGUEZ

MSc. M.V. LUCERO SERRANO ARRIAZA

MSc. M.V. FRANCISCO ESCOBAR SERRANO

Gracias por su apoyo y GRAN PACIENCIA.

A CLÍNICA Y HOSPITAL VETERINARIO VISTA HERMOSA (VISTAVET)

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	HIPÓTESIS	2
III.	OBJETIVOS	3
3.1	Objetivo General	3
3.2	Objetivo Específico	3
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1	Definición	4
4.2	Sinónimos	4
4.3	Historia	4
4.4	Etiología	6
4.4.1	Clasificación	6
4.4.2	Nomenclatura	6
4.4.3	Estructura del virus	7
4.4.3.1	<i>Morfología</i>	7
4.4.3.2	<i>Organización del Genoma</i>	8
4.5	Patotipo	12
4.6	Patogenia	13
4.7	Signos Clínicos	17
4.8	Lesiones Macroscópicas	18

4.9	Lesiones Microscópicas	20
4.10	Diagnóstico	21
4.10.1	<i>Aislamiento del virus de la influenza aviar</i>	21
4.10.2	<i>Técnicas de tipificación de virus de la influenza aviar</i>	23
4.10.3	<i>Pruebas Serológicas</i>	23
4.10.4	<i>Métodos Moleculares Ácido/Base</i>	24
4.11	Diagnóstico Diferencial	25
4.12	Toma De Muestras, Conservación y Transporte	25
4.13	Tratamiento	26
4.14.	Prevención y Control	26
4.14.1	<i>Sacrificio sanitario</i>	26
4.14.2	<i>Descontaminación y eliminación</i>	26
4.14.3	<i>Vacunación estratégica</i>	27
4.14.3.1	<i>Vacuna en emulsión oleosa</i>	27
4.14.3.2	<i>Vacuna recombinante</i>	28
4.15.	El Virus de Influenza Aviar en Carne Congelada	28
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1	Materiales	29
5.1.1	<i>Recursos Humanos</i>	29
5.1.2	<i>Recursos de Campo</i>	29
5.1.3	<i>Materiales y equipo de Laboratorio</i>	29
5.1.4	<i>Recursos biológicos</i>	31
5.2	Métodos	31
5.2.1	<i>Manejo del lote experimental</i>	31
5.2.2	<i>Reactivación del virus</i>	32
5.2.3	<i>Inoculación del virus</i>	32
5.2.4	<i>Reaislamiento viral</i>	32

5.2.5 Prueba de microaglutinación	33
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
VII. CONCLUSIONES	37
VIII. RECOMENDACIONES	38
IX. RESUMEN	39
X. BIBLIOGRAFÍA	40

I. INTRODUCCIÓN

La Influenza Aviar es una enfermedad viral de tipo respiratorio que pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, afectando a las aves de todas las edades y provocando importantes pérdidas sanitarias, sociales y económicas.

Esta enfermedad es de notificación obligatoria de acuerdo con el Código Sanitario para Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), y se caracteriza por alta morbilidad y mortalidad en aves, posee un carácter transfronterizo y de riesgo zoonótico. La introducción del virus en diversas zonas geográficas mediante el comercio internacional, ingreso ilegal y la migración de aves silvestres, son situaciones que implican un riesgo a nivel internacional.

En marzo del 2000 fue diagnosticada por primera vez el virus de Influenza Aviar en Guatemala, aislando una cepa de baja patogenicidad H5N2 en el laboratorio de Ornitopatología y Avicultura de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Este brote afectó la producción avícola nacional sobre todo a pequeños productores y el desarrollo de ésta industria a nivel regional.

Estudios previos han reportado que el virus de influenza tipo A de alta patogenicidad no se aísla de la carne congelada en aves desafiadas con este virus, por lo que en este estudio se pretende demostrar que no hay persistencia del virus de baja patogenicidad H5N2 en la carne de canal (pierna y pechuga) limitando el riesgo de contagio a través del consumo de carne de pollo.

II. HIPÓTESIS

Ho. No hay presencia del virus de Influenza Aviar H5N2 en pierna y pechuga congelado de pollos desafiados vacunados y no vacunados.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Aislar el virus de Influenza Aviar H5N2 de pierna y pechuga de pollo congelado para determinar si el virus persiste en músculo.

3.2. Objetivos Específicos

- Comprobar la presencia del virus de Influenza Aviar H5N2 en carne de pierna y pechuga congelada, de aves vacunadas y no vacunadas que posteriormente serán desafiados con el virus.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Definición

La influenza aviar (IA), es una enfermedad de reporte obligatorio a nivel mundial. Se define como una infección o síndrome de enfermedad, ocasionada por cualquier virus de influenza tipo A, miembro de la familia Orthomyxoviridae. (11)

4.2. Sinónimos

Peste Aviar, Influenza Aviar Altamente Patógena, Influenza Letal, y lo más reciente Gripe de Pollo. (17)

4.3. Historia

El virus de influenza aviar lo describió Perroncito como una enfermedad grave de pollos en Italia en 1878, y como ocasionada por un agente filtrable Centanni y Savunozzi en 1901. (11)

Los primeros casos característicos de Peste Aviar, fueron muy severos, que originaron una mortalidad alta en pollos, pavos y otras especies. (21)

En Alemania, Shafer en 1955 determinó que el agente era el virus de influenza tipo A, y que emparentaba con otros virus de influenza que causaban infecciones respiratorias en humanos, cerdos y caballos. (19)

Los primeros aislamientos fueron obtenidos en abril de 1983, de pollos que experimentaban enfermedad respiratoria aguda. Este mismo año se reporta un brote en la ciudad de Pennsylvania que deja enormes pérdidas económicas. (11)

Durante 32 años ocurrieron 10 brotes de cepas altamente patógenas de IA tipo A, siendo estos en Australia (1975 y 1985), Inglaterra (1979), E.U.A. (1983 y 1984) e Irlanda (1983 y 1984); en el año de 1997 se presentaron 3 brotes en los países de Italia, Australia y Hong Kong, incrementando la frecuencia de ocurrencia. (11,17, 14)

El virus tipo A/H5N1 ha sido incriminado en epidemias de IA en aves domésticas y silvestres en varios países de Asia, con alta patogenicidad y consecuencias económicas sanitarias importantes. Los brotes ocurridos en el año 2003 en esta región afectaron a personas causando hasta un 33% de mortandad. Estos casos provocaron un alerta internacional ante la posibilidad de la presencia de una pandemia de IA en humanos causada por esta variedad de virus (A/H5N1). (3, 14,19)

Del año 2004 al 2009 se han reportado 8 brotes de A/H5N1 en los países de Nigeria, Egipto, Canadá, E.U.A., Indonesia y Pakistán.

El riesgo de diseminación del virus es básicamente debido a la trayectoria intercontinental de las aves migratorias (Europa, Asia y Oceanía), extendiéndose así el virus a nivel mundial. (3, 15, 19)

4.4. Etiología

4.4.1 Clasificación

El virus de Influenza Aviar pertenece a la familia Orthomyxoviridae de un segmento en sentido negativo del ARN, el cual se divide en cinco diferentes géneros incluyendo el virus influenza tipo A, B y C, Isavirus y Thogotovirus. (19)

- Influenza tipo A: afecta las aves, humanos, equinos, suinos, visón, focas, ballenas (agente zoonótico).
- Influenzavirus tipo B: humanos solamente.
- Influenzavirus tipo C: humanos y suinos (rara enfermedad seria)
- Isavirus: incluye patógenos infecciosos en peces como el virus de la anemia en el salmón. (19)
- Thogotovirus: arbovirus aislado en humanos y vida libre transmitido por garrapatas. (19)

4.4.2 Nomenclatura

Los virus tipo A se dividen en 144 subtipos distintos clasificados con base en diferentes combinaciones de 16 hemaglutininas y 9 neuraminidasas y dos patotipos diferentes: baja patogenicidad (LP) y alta patogenicidad (HP). (11)

Los virus de Influenza Aviar de baja patogenicidad se conservan en las aves silvestres y deben sufrir una adaptación para pasar a las aves domésticas. Los de alta patogenicidad surgen en la población avícola e históricamente no se transmiten a aves silvestres. Sin embargo, el virus de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad Asiático H5N1, se readaptó a algunas especies de aves silvestres creando un nuevo mecanismo de diseminación. (19)

Con formato: Espacio Después: 10 pto, Ajustar espacio entre texto latino y asiático, Ajustar espacio entre texto asiático y números

La nomenclatura utilizada para describir el virus de influenza ha sido estandarizado de la siguiente forma:

- 1) El nombre del virus de IA incluye el tipo antigénico (A, B o C);
- 2) Huésped de origen (con excepción al humano);
- 3) Origen geográfico que puede ser ciudad, estado, provincia, o país;
- 4) Numero de cepa (si existe), y
- 5) Año de aislamiento, seguido por el subtipo (H) y NA (N) en paréntesis. (19)

Por ejemplo en Guatemala en el año 2000 fue nombrado de la siguiente forma:
A/Ck/Guate/01/00/H5N2. (7)

4.4.3 Estructura del Virus

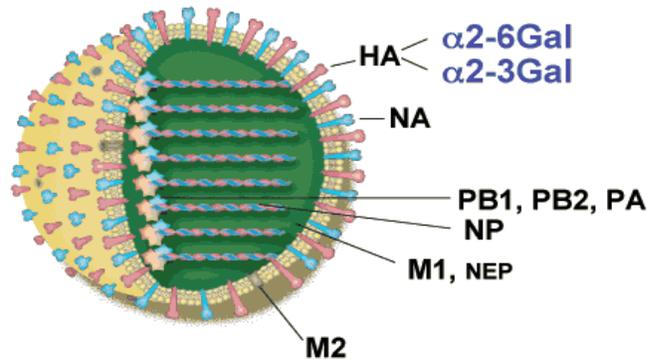
4.4.3.1 Morfología

La morfología del virus puede ser muy variable. Los viriones pueden ser esféricos con un diámetro de 80 a 120 nm, no obstante, a menudo hay formas filamentosas del mismo diámetro con longitudes variables. (11)

Los viriones están rodeados de una envoltura de naturaleza fosfolipídica procedente de la membrana citoplasmática de la célula que infectan. En la envoltura se encuentran ancladas dos glicoproteínas, la hemaglutinina (HA, mayoritaria) y la Neuraminidasa o sialidasa (NA). (11,16)

Además de la HA y la NA, en la envoltura se integra un número limitado de proteínas M2. Tapizando la cara interna de la envoltura del virión se encuentra la proteína M1 que forma una matriz proteica la cual da consistencia a la estructura de la partícula vírica. (16)

virus Influenza A



(6)

4.4.3.2 Organización del Genoma

Los ocho segmentos de ARN, que constituyen el genoma de los virus influenza A (se nombran del 1 al 8 y de mayor a menor tamaño), codifican once polipéptidos reconocidos: PB1, PB1-F2, PB2, PA, HA, NA, M1, M2, NP, NS1 y NS2.

Cada uno de los segmentos de ARN vírico existe como un complejo de ribonucleoproteína (RNP) individual. (16)

La organización del genoma se da de la siguiente manera:

PB2. La proteína PB2 está codificada por el segmento 1 de ARN. Interviene en el inicio de la síntesis de ARNm vírico.

PB1. La proteína PB1 está codificada por el segmento 2 del ARN vírico. Forma parte del complejo ARN polimerasa dependiente de ARN, como la proteína responsable de la elongación del ARNm vírico. También interviene en la síntesis de ARN complementario y en la síntesis de ARN vírico. La PB1 se localiza en el núcleo de las células infectadas.

PA. La proteína PA está codificada por el segmento 3 de ARN vírico. Se localiza en el núcleo de las células infectadas y, al igual que PB2 y PB1, forma parte del complejo ARN polimerasa dependiente de ARN. Probablemente actúa como una proteína quinasa o como una proteína de desdevanar la hélice.

NP. La proteína NP está codificada por el segmento 5 de ARN vírico. La NP es transportada al núcleo de la célula infectada, donde se une y encapsida individualmente a cada uno de los segmentos que forman el ARN vírico. Es una proteína fosforilada y constituye uno de los principales blancos de la respuesta inmunitaria del hospedador mediada por linfocitos T citotóxicos. Las diferencias antigénicas en la proteína NP sirven de base (junto con la proteína M1) para distinguir los géneros Influenzavirus A, B y C.

M1. La proteína M1, proteína matriz, está codificada por el segmento 7. Es la más abundante en las partículas víricas, formando una cubierta alrededor de las nucleocápsides de los viriones, e inmediatamente por debajo de la envoltura vírica.

M2. La proteína M2 se transcribe también a partir del segmento 7 del ARN vírico. Esta es una proteína no glicosilada y forma tetrámeros que constituyen un canal iónico dependiente del pH del medio. Se activa con el bajo pH de la vacuola endocítica (endosoma) y así se acidifica el interior de los viriones facilitando la descapsidación de los mismos.

HA. La HA es una glicoproteína de tipo I con el extremo C-terminal insertado en la envoltura de los viriones y que constituye el principal antígeno de superficie de los virus influenza. Tiene forma alargada y está constituida por un trímero, en el que cada monómero acaba en una cabeza globular. Está codificada por el segmento 4 del ARN vírico. La HA es responsable de la unión de los viriones a los receptores de la célula hospedadora y de la fusión de la envoltura del virus con una membrana intracelular de las células infectadas.

La HA es el principal antígeno de superficie de los virus influenza e induce la formación de anticuerpos neutralizantes, que son muy importantes en la protección del hospedador frente a la infección.

NA. La neuraminidasa, también llamada sialidasa, es una glicoproteína de tipo II que contiene su extremo N-terminal insertado en la envoltura de la partícula vírica y el extremo C-terminal distal de la superficie de la misma.

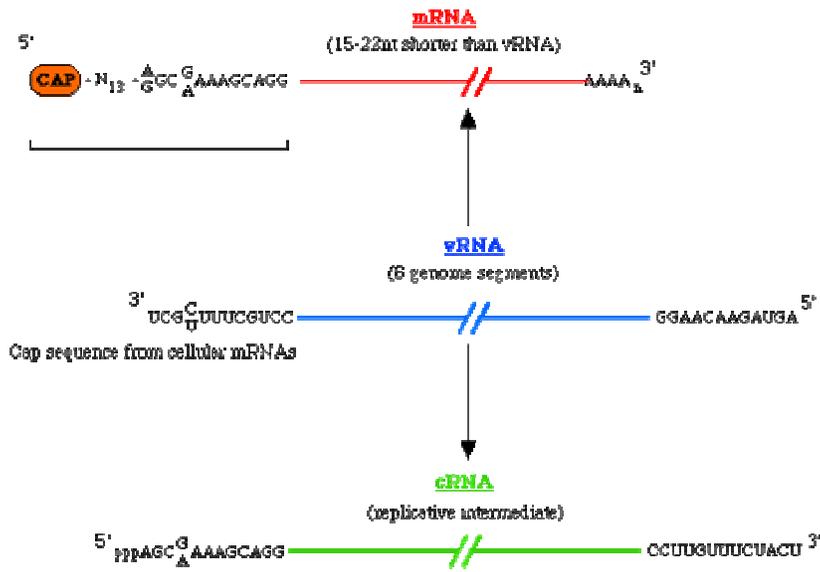
Está codificada por el segmento 6 del ARN vírico, es el segundo antígeno superficial, en importancia, del virión y los anticuerpos sintetizados contra ella son importantes en la protección del hospedador.

Es una sialidasa que hidroliza el ácido siálico terminal de glicoproteínas y glicolípidos y de este modo, contribuye a la liberación de las partículas víricas de los receptores de las células infectadas permitiendo que la progenie vírica escape de la célula en la que se forma y facilitando su diseminación.

NS1 y NS2. Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 están codificadas por el segmento 8 del ARN vírico. La NS1 ocupa un marco de lectura continuo y es traducida de un ARNm equivalente en longitud con la porción del ARN vírico correspondiente. Sin embargo, la proteína NS2, de menor tamaño, se traduce a partir de un ARNm que ha sufrido un procesamiento con eliminación de algunos nucleótidos y en un nuevo marco de lectura (+1 respecto al de NS1).

La NS1 se localiza fundamentalmente en el núcleo, mientras que la NS2 se encuentran en el citoplasma principalmente. La proteína NS1, única proteína no estructural de los virus influenza A, tiene varias funciones: unión a ARN de doble cadena, modulación de la replicación vírico y bloqueo de la respuesta celular a la infección, que está mediada por interferón. (16)

Segmento	Tamaño(nt)	Polipéptido(s)	Función
1	2341	PB2	Transcriptasa: cap binding (capuchón)
2	2341	PB1	Transcriptasa: elongación
3	2233	PA	Transcriptasa: actividad de la proteasa (?)
4	1778	HA	Hemoaglutinina
5	1565	NP	Nucleoproteína: RNA de unión; parte del complejo de la transcriptasa; transportador citoplasmático del núcleo del vRNA
6	1413	NA	Neuraminidasa: Liberación de virus
7	1027	M1	Proteína Matriz: Componente mayor del virión
		M2	Proteína de la membrana integral: canal del ion
8	890	NS1	No estructural: Núcleo, efectos en el RNA de transporte celular, splicing, translation. Proteína Anti-interferón.
		NS2	No estructural: nucleo+citoplasma, función desconocida



Organización del genoma del virus de Influenza Aviar

4.5 Patotipo

La Organización Mundial de Salud Animal (anteriormente OIE) define la patogenicidad de la IA en:

1) Virus de influenza aviar notificable de alta patogenicidad (HPNAI), tienen un índice de patogenicidad intravenosa (IVPI) en pollos de 6 semanas de edad mayor de 1.2, causa por lo menos el 75% de mortalidad en pollos de 4-8 semanas de edad infectados intravenosamente. Virus H5 y H7 que no tienen un IVPI mayor de 1.2, o que causan una mortalidad menor del 75% en un test de letalidad intravenosa, debe ser secuenciado para determinar si múltiples bases de aminoácidos están presentes en el sitio de escisión de la molécula de hemoaglutinina (HAO); si el motivo de aminoácido es similar al observado para los otros aislados de HPNAI, el aislado que está siendo probado debe ser considerado como un HPNAI;

2) Virus de influenza aviar notificable de baja patogenicidad (LPNAI) son todos los virus influenza A del subtipo H5 y H7 que no son virus HPNAI.

El Patotipo LPAI puede incluir los subtipos de virus IA de cualquiera de las 16 HA (H1-H16) y 9 NA (N1-N9), mientras que los virus LPNAI son un subgrupo de virus LPAI: ej. Solo los virus LPAI H5 y H7. (11,19)

4.6 Patogenia

El periodo de incubación varía según la especie, vías de exposición y dosis del virus, de 3 horas a 3 días; la patogenicidad varía de inaparente a 100% de mortalidad. (15)

La infección inicia con la destrucción de células que cubren el tracto respiratorio, incluidos tráquea y bronquios; el virión penetra principalmente por vía aerógena hasta la nasofaringe y se disemina por el tracto respiratorio infectando células susceptibles. El virus debe primero atravesar las secreciones respiratorias, que contienen una gran cantidad de mucoproteínas, la cual es hidrolizada por la neuraminidasa viral. (20)

La adhesión del virus a la célula susceptible se produce por la interacción entre la hemaglutinina y los receptores de ácido siálico. (11)

La HA tiene un sitio específico de reconocimiento muy conservado en su cabeza globular a modo de una pequeña hendidura donde alberga al ácido siálico de la glicoproteína receptora de la célula hospedadora. La proteína NA también puede reconocer al receptor mediante un sitio análogo. (16)

El ingreso del virus dentro de la célula es dado por endocitosis. En la vacuola endocítica se produce una disminución drástica del pH (acidificación) que induce un cambio conformacional de la HA, dando lugar a la fusión de la membrana del endosoma y la envoltura vírica. (6)

Dentro del endosoma, el canal iónico, formado por la proteína M2, expone al interior del virus a un pH bajo, lo que favorece la disociación de la proteína M1 del complejo ribonucleoproteínas víricas (vRNPs), quedando libres en el citoplasma. Las vRNPs son transportadas al núcleo de la célula por señales de localización nuclear, contenidas en el complejo RNP (PB1, PB2 y NP), donde tiene lugar la transcripción. (16,19)

El primer paso del proceso de transcripción consiste en la ruptura, mediante una endonucleasa codificada por el virus, de una región del extremo 5' del ARNm donador de 10 a 13 nucleótidos corriente abajo del "capuchón". Aunque las ribonucleasas dejan generalmente en el extremo 3' un grupo fosfato en sus productos de digestión, la endonucleasa de los virus influenza genera productos con un grupo hidroxilo en dicho extremo. De esta forma, el oligonucleótido resultante puede actuar directamente como iniciador o "primer" sin necesidad de desfosforilación. (16,19)

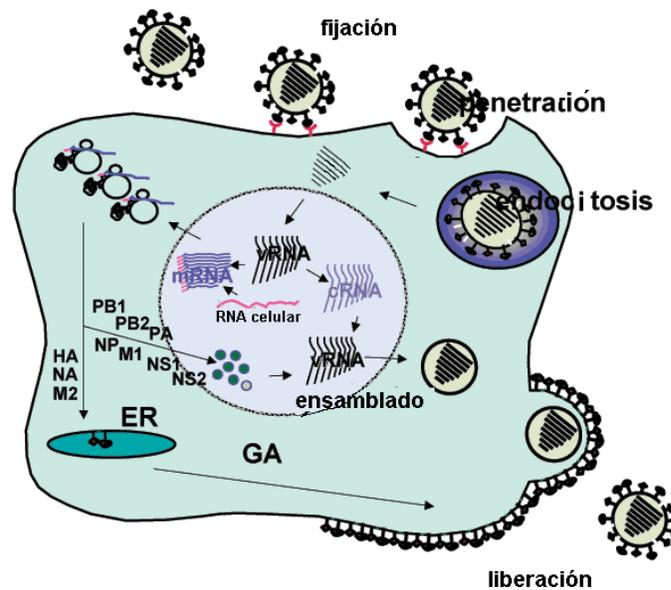
La síntesis de los distintos ARNm se lleva a cabo por el complejo ARN polimerasa, dependiente de ARN del virus. Cinco de los ocho segmentos de ARN vírico se transcriben de forma monocistrónica y se traducen en las proteínas HA, NA, NP, PB2 y PA, sin embargo, tres de los segmentos de ARN vírico se transcriben, cada uno de ellos, en dos ARN mensajeros mediante un mecanismo de procesamiento del transcrito. Los genes M, NS y PB1 son traducidos en diferentes marcos de lectura generando M1 y M2, NS1 y NS2, y PB1 y PB1-F2, respectivamente.

La NP y la NS1 son proteínas tempranas que se sintetizan en los primeros momentos de la infección (transcripción primaria). La síntesis de ARNm celular queda bloqueada. (16)

La NP y la NS1 migran al núcleo. Se cree que un incremento en la concentración de la NP libre cambia la síntesis de ARN mensajeros víricos por ARNc y ARNv. Los ARN víricos sintetizados de nuevo son encapsidados con la NP en el núcleo y sirven

como molde para la transcripción secundaria de los ARN mensajeros víricos. Los productos mayoritarios de la traducción, en esta fase tardía de la infección, son M1, HA y NA. (16)

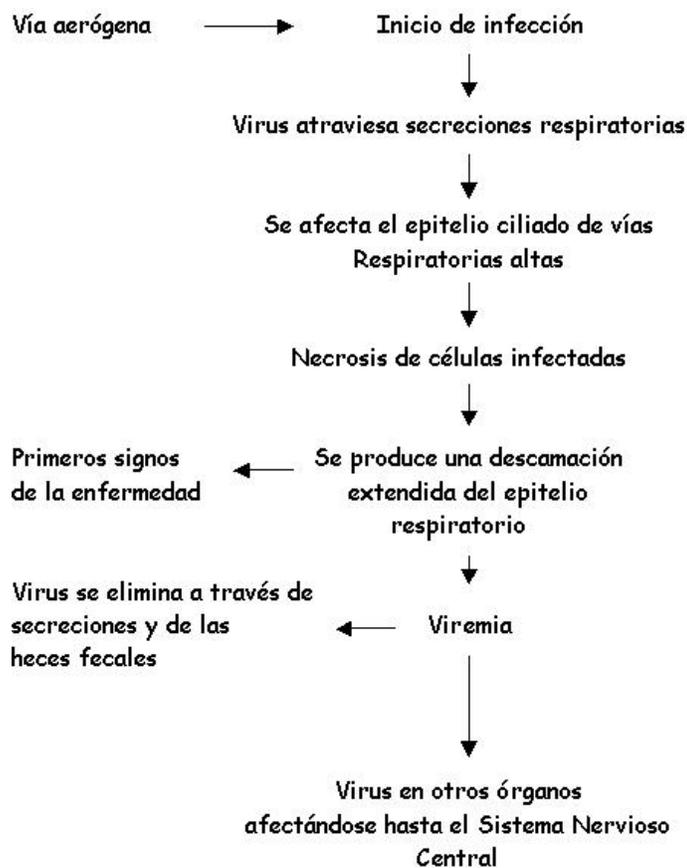
El ARN del virión unido a las nucleoproteínas abandona el núcleo celular y se dirige hacia la membrana junto con proteínas víricas transmembranaras (hemaglutinina, neuraminidasa y proteínas M) y una capa subyacente de proteína M1 que se acumulan en determinadas regiones de la membrana celular y protruyen sobre la membrana en esas zonas, liberando finalmente un nuevo virus completo, con envoltura, en el fluido extracelular. (6,16)



(6)

Durante la infección el epitelio ciliado de las vías respiratorias altas son las primeras células infectadas. Poco después de la infección sobreviene la necrosis de estas. En esta fase puede haber una descamación extendida del epitelio respiratorio con lo que se presentan los primeros signos respiratorios de la enfermedad. El virus se disemina fácilmente a otros órganos, pudiendo afectar incluso al SNC. (20)

El virus se elimina a través de cualquier secreción y de heces fecales, por lo tanto, las formas probables de transmisión incluyen tanto contacto directo entre las aves infectadas y susceptibles como contacto indirecto, con aerosoles y fómites.



(20)

El virus H5N1 altamente patógeno puede vivir en las heces de las aves durante al menos 35 días a baja temperatura (4°C). A temperaturas más altas (37°C), se ha mostrado que puede sobrevivir, en muestras fecales, durante 6 días. (3)

Para la inactivación del virus puede someterse a temperaturas de 56°C por un periodo de 3 horas o a 60°C por 30 minutos. En general la OMS recomienda cocinar las aves de corral hasta que todas las partes alcancen una temperatura interna de 70°C. (10)

Es vulnerable a pH ácido y a agentes oxidantes (dodecil sulfato de sodio), y disolventes de lípidos (β -propiolactona), se inactiva por la acción de la formalina y compuestos de yodo. En cuanto a su supervivencia permanece por un largo tiempo en los tejidos, heces y agua. (7)

4.7 Signos Clínicos

Los siguientes factores influyen en los signos clínicos de la influenza aviar: la cepa del virus (alta o baja patogenicidad), la especie, edad y estado inmunitario del huésped contra el virus y contra los otros agentes de enfermedades concomitantes (E. Coli, Mycoplasma y NDV), condiciones deficientes y factores ambientales. (4,13)

En su forma leve, (baja patogenicidad) los signos de la enfermedad puedan manifestarse con plumaje erizado, reducción de la producción de huevos o efectos leves en el sistema respiratorio.

En su forma grave, (alta patogenicidad) el virus no sólo afecta al tracto respiratorio, sino que también invade varios órganos y tejidos y puede producir hemorragia interna masiva.

Las aves infectadas con Influenza Aviar altamente patógena (incluida la cepa H5N1) pueden presentar los signos clínicos siguientes o al menos algunos: (3)

- Muerte repentina ausente de síntomas clínicos;
- Postración y depresión extrema;
- Huevos deformes o con cáscara blanda y con poca coloración;
- Edema y congestión de carúnculas y crestas;
- Edema de la piel debajo de los ojos;
- Decoloración morada en la barba, cresta, y patas;
- Tos, estornudos, Edema traqueal,
- Signos nerviosos, incoordinación;
- Diarrea acuosa verde brillante, que puede pasar a ser totalmente blanca;
- Hemorragias en tarsos;

Se pueden producir algunas muertes durante varios días, seguidas de una difusión rápida y una tasa de mortalidad cercana al 100% dentro de las 48 horas. (3,4,5)

4.8 Lesiones Macroscópicas

Cuando la enfermedad es producida por cepas de baja patogenicidad se observan las siguientes lesiones:

- En los senos infraorbitarios se pueden encontrar inflamación catarral, fibrinosa, serofibrinosa, mucopurulenta
- Rinitis
- Sinusitis
- Secreción nasal descargas de mucoso a mucopurulento
- Edema y congestión traqueal, ocasionalmente hemorrágica, con exudados que pueden ser serosos y tornarse caseosos
- Bronconeumonía fibrinopurulenta

- Aerosaculitis que va de catarral a fibrinogena y llega a ser fibrinopurulenta según el transcurso de la enfermedad
- Peritonitis causada por la ruptura de las yemas
- Salpingitis
- Catarro visceral provocado por fallo renal
- Enteritis, tiflitis, proctitis puede observarse en pavos
- Palidez del páncreas, y moteado con hemorragias. (19)

Cuando la enfermedad es producida por cepas de alta patogenicidad se pueden observar las siguientes lesiones:

- Edema periorbital e intermandibular
- Hiperemia y edema en el área de párpados, conjuntiva
- Edema, hemorragias y necrosis en todos los órganos viscerales, sistema cardiovascular, sistema nervioso y tegumentario.
- Inflamación de cabeza, cara, cuello, piernas y patas, acompañado de hemorragias petequiales y equimóticas principalmente en el área sin plumas.
- Cianosis de cresta y barbillas
- Hemorragia en epicardio y coronarias
- Hemorragias en serosas y mucosas de proventrículo, ventrículo, músculos pectorales;
- Hemorragias ocasionales en esternón, tonsilas cecales y divertículo de Meckel,
- Coloraciones variables del páncreas y necrosis
- Ruptura de las yemas,
- Hemorragias en placas de Peyer;
- Edema y hemorragia pulmonar;
- Edema cerebral,
- Focos necróticos en hígado y riñones
- Depósitos de uratos en riñones pueden presentarse,
- Focos neumónicos intersticiales y difusos en pulmones,

- En aves jóvenes atrofia de la bursa y el timo y pueden presentar hemorragias,
- Esplenomegalia, con focos necróticos y parénquima pálido. (19)

4.9 Lesiones Microscópicas

Las cepas de baja patogenicidad se caracterizan por ocasionar lesiones microscópicas como:

- Neumonía linfocítica
- Edema capilar
- Nefritis y nefrosis
- Necrosis de acinis pancreáticos
- Pancreatitis comúnmente en pollos y menos frecuente en pavos
- Depleción linfocítica, necrosis o apoptosis de bursa, timo, bazo y otras áreas de acumulaciones linfocíticas.

Las cepas de alta patogenicidad ocasionan:

- Procesos inflamatorios y necróticos, ocasionando cambios en piel, cerebro, corazón, pulmones, páncreas, glándulas adrenales y órganos linfoides
- Meningoencefalitis con necrosis neuronal, neurofagia, gliosis focal edema y hemorragia
- Degeneración focal a multifocal difusa, necrosis coagulativa, miositis cardíaca, acompañada de inflamación linfocitaria
- Microtrombosis de las áreas desplumadas de la piel, vasculitis, edema generalizado perivascular, edema subcutáneo, y necrosis del endotelio capilar acompañado de vesículas epidermales
- Necrosis en las fibras del músculo esquelético, tubulos renales, células vasculares endoteliales, células corticotrópicas de la glándula adrenal y del epitelio acinar pancreático
- Depleción de linfocitos y necrosis o apoptosis de la bursa, timo y bazo
- Neumonía intersticial. (19)

4.10 Diagnóstico

Identificación del agente:

Inoculación de huevos de gallina embrionados de 9-11 días de edad seguida por:

- Prueba de la hemaglutinación
- Prueba de inmunodifusión para confirmar la presencia del virus de la influenza A
- Determinación del subtipo con antisueros mono específicos
- Evaluación de la virulencia de la cepa: evaluación del índice de patogenicidad intravenoso en gallinas de 4-8 semanas de edad. (12)

Pruebas serológicas

- Hemaglutinación y prueba de inhibición de hemaglutinación
- Inmunodifusión en Agar gel. (12)

4.10.1 Aislamiento del virus de la influenza aviar

El aislamiento viral se logra normalmente inoculando extractos de órganos (pulmón, tráquea, intestino, cerebro) y heces de aves muertas o hisopados de cloaca y/o tráquea de animales vivos en huevos embrionados de pollo de 9 a 11 días, o bien en células fibroblásticas de cultivo primario derivadas de embrión de pollo, aunque esta técnica es menos utilizada. (18)

Los embriones se deben obtener de gallinas SPF (libres de patógenos específicos). Antes de inocular los embriones, se deben revisar los huevos embrionados en cámara oscura con el ovoscopio, para certificar la edad, la viabilidad y la localización del embrión. Tras delimitar la cámara de aire se define el punto de inoculación, que debe estar localizado a una distancia aproximada de 3 mm por encima de la cámara de aire y en el extremo opuesto a donde se encuentra el embrión. Los embriones SPF, no menos de cuatro por muestra, se inoculan en la cavidad alantoidea y se incuban a 35-37° C durante seis días. Los embriones que mueran en las primeras 24 horas no se tomarán en consideración siempre y cuando se demuestre que el líquido alantoideo no presenta actividad hemaglutinante. (18)

Generalmente el virus de la IA mata a los embriones entre los dos y cuatro días postinoculación, aunque la cepa H5N1 altamente patógena puede matar al embrión en menos de 20 horas.

Se recoge el líquido alantoideo de todos los embriones muertos y de los que queden hasta el término del período de incubación, para la realización de la prueba de hemaglutinación (HA). Si no se detecta HA se debe repetir el procedimiento anterior utilizando fluido alantoideo sin diluir como inóculo. El fluido amnio-alantoideo de los embriones infectados por el virus de IA tiene una concentración suficiente de hemaglutininas para producir la aglutinación de eritrocitos de pollo. Esta propiedad del virus permite en forma fácil, rápida y sencilla identificarlo mediante la hemaglutinación en placa. En todos los casos donde se demuestre la presencia de hemaglutininas en embriones inoculados, se deberá descartar la presencia de otros agentes hemaglutinantes como los *Paramyxovirus* aviares. (18)

Ante una HA positiva del fluido alantoideo, existen varias técnicas que permiten confirmar la presencia de un virus Influenza A, (inmunodifusión en gel de agar (AGID), ELISA o técnicas moleculares). (18)

4.10.2 Técnicas de tipificación de virus de la influenza aviar

Una vez detectado el virus influenza, es necesario determinar a qué subtipo pertenece. La determinación clásica se basa en el uso de antisueros específicos. La técnica empleada para tipificar la hemaglutinina de superficie del virus, conocida como Inhibición de la Hemaglutinación (IHA), consiste en medir la inhibición de la capacidad hemaglutinante del virus con diluciones de antisueros de especificidad conocida frente a los 16 distintos subtipos de virus IA, H1-H16. Para tipificar la neuraminidasa de superficie se emplea asimismo una técnica serológica equivalente, la inhibición de la neuraminidasa (INA) que mide la capacidad de inhibir la actividad enzimática de la neuraminidasa viral por medio de la adición de antisueros específicos preparados frente a los nueve distintos subtipos de neuraminidasa existentes, N1-N9. Estas técnicas requieren que la preparación de virus a tipificar tenga una cierta concentración, que sólo se alcanza normalmente cuando se multiplica el virus por inoculación en huevos embrionados de pollo, o bien en cultivos celulares. (18)

4.10.3 Pruebas Serológicas

Estas pruebas se utilizan para demostrar la presencia de anticuerpos específicos. Éstos pueden detectarse aproximadamente 7 días después de la infección. Con los estudios serológicos se pueden poner en evidencia tanto los anticuerpos de grupo (frente a virus Influenza A, sin discriminar el subtipo) como los anticuerpos específicos frente a las distintas HA y NA. (18)

Las técnicas más utilizadas son la Inmunodifusión doble en gel de agar (AGID) y la prueba ELISA:

a) AGID: Para la realización del AGID se utiliza como antígeno el líquido alantoideo de embriones infectados que contiene tanto proteína NP como proteína matriz. El AGID sirve para detectar anticuerpos en gallinas y pavos, pero no para las demás especies ya que no todas las especies aviares producen anticuerpos precipitantes, especialmente los patos.

b) ELISA: Es una técnica más sensible que el AGID. Los disponibles hasta ahora eran ELISAs indirectos para la detección de anticuerpos en gallinas y pavos, lo que dificultaba la realización de investigaciones serológicas en otras especies, patos y aves silvestres, por ejemplo. Actualmente se han desarrollado y se están evaluando ELISAs de competición que permiten la detección de anticuerpos frente a Influenza A, independientemente de la especie de la que se trate. (18)

4.10.4 Métodos Moleculares Ácido/Base

RT-PCR es la técnica de elección para la detección de virus de influenza aviar. Este es un método eficaz que es dirigido a la amplificación específica de una región del gen de la nucleoproteína muy conservada entre virus influenza tipo A, por lo que detectará todos los virus pertenecientes a este género.

Recientemente se han desarrollado métodos de RT-PCR en tiempo real (RRT-PCR) basados en sondas fluorogénicas hidrolizables, tipo «Taq-Man», para la detección de virus influenza, que conjuntamente con sistemas automatizados de extracción de ácidos nucleicos permiten aumentar enormemente la capacidad de análisis de muestras por PCR. (18)

Se han desarrollado kits comerciales de detección de los antígenos del virus basados en técnicas de inmunocromatografía en papel, dichos kits utilizan anticuerpos monoclonales contra las nucleoproteínas de la cápsida, por lo que son capaces de detectar la presencia del propio virus de la influenza A. (1)

4.11 Diagnóstico Diferencial

Enfermedad de Newcastle en su presentación velogénica, laringotraqueitis infecciosa, cólera aviar, peste de los patos, envenenamiento como las enfermedades que cursan con inflamación de crestas y barbillas, cólera aguda, septicemias, celulitis bacterianas de crestas y barbillas, clamidiasis y micoplasmosis. (11,18)

4.12 Toma De Muestras, Conservación Y Transporte

En las aves vivas se deben tomar hisopos traqueales/ bucofaríngeos e hisopos cloacales.

En el caso de aves muertas y dependiendo del tiempo transcurrido desde la muerte y el estado del cadáver, se deben tomar al menos las mismas muestras que en el caso de los animales vivos, hisopos traqueales/bucofaríngeos e hisopos cloacales o heces (contenido intestinal) y además se pueden tomar muestras de tráquea, pulmón, sacos aéreos, intestino, bazo, riñón, cerebro, hígado y corazón.

Las muestras, sobre todo los hisopos, deben introducirse en tampón fosfato-salino a pH fisiológico (PBS) con antibióticos (con el fin de evitar la proliferación bacteriana), en cantidad suficiente para cubrir la muestra pero no en exceso para no diluir el posible virus.

En el caso de que el envío se realice en menos de 48 horas, las muestras deben ser conservadas a 4° C desde su obtención hasta la llegada al laboratorio. También es importante que los hisopos se transporten en posición vertical con el fin de que el algodón siempre vaya incluido en el PBS. En el caso de que no sea posible garantizar el transporte al laboratorio en menos de 48 horas desde la toma, las muestras se deben congelar a 70° C y ser transportadas sin romper la cadena de frío. (18)

4.13 Tratamiento

En la actualidad no hay tratamiento específico práctico para las infecciones por virus de influenza aviar. El clorhidrato de amantadina y el clorhidrato de rimantadina son eficaces en la profilaxia de las infecciones por influenza humana. También se sabe que la amantadina es eficaz contra la infección con virus de influenza A en pollos, codornices y pavos. (11)

4.14 Prevención Y Control

4.14.1 Sacrificio sanitario

El sacrificio sanitario, como medio de lucha contra un foco de influenza aviar, deberá efectuarse en condiciones decentes y tomando en cuenta los principios de bienestar animal. (12)

Se ha prohibido la vacunación en brotes en los que hay virus altamente patógenos, cuando el objetivo es la erradicación. (11)

4.14.2 Descontaminación y eliminación

Las estrategias para la eliminación de aves muertas deben preverse con suficiente antelación antes de la aparición de cualquier foco. Entre los principales factores a considerar cabe mencionar el número de aves implicadas, el desplazamiento de los animales infectados o expuestos, así como también de las personas y de los equipos, las cuestiones ambientales, etc. (12)

4.14.3 Vacunación estratégica

La lucha contra la influenza aviar es un problema cada vez más complejo que exige elaborar estrategias de control como complemento del enfoque tradicional de sacrificio sanitario. La vacunación tiene como objetivo proteger a la población de aves susceptibles de una eventual infección reduciendo así la incidencia o la gravedad de la enfermedad. Las estrategias de vacunación pueden resultar útiles en situaciones de emergencia ante un foco o como medida de rutina en zonas endémicas. (12)

En el caso de virus de patogenicidad de grado bajo o moderado, se permite la vacunación con el empleo de vacunas inactivadas monovalentes y polivalentes, con adyuvantes que tienen la capacidad de inducir anticuerpos y dar protección contra morbilidad, mortalidad y baja en la producción de huevo. Estas vacunas pueden reducir en potencia la intensidad de la enfermedad y la propagación de virus en la situación de campo, pero el virus no será eliminado de la población. (11)

4.14.3.1 Vacuna en emulsión oleosa

Vacunas que generalmente son elaboradas mediante emulsificación en aceite mineral con el virus inactivado contenido en líquido alantoideo, colectados en huevos embrionados inoculados. Las vacunas en emulsión oleosa también pueden ser elaboradas usando sólo el antígeno hemoaglutinina (HA) del virus. Esta puede ser administrada por vía subcutánea en el tercio medio posterior del cuello. (2, 21)

4.14.3.2 *Vacuna recombinante*

Vacuna liofilizada (elaborada en membrana y embrión de pollo) que contiene el virus recombinante de Viruela Aviar que contiene el virus de viruela como vector, expresando la hemoaglutinina H5 del virus de Influenza Aviar. Esta vacuna puede ser administrada por punción en el ala o vía subcutánea en el tercio medio y posterior del cuello en el primer día de edad en pollos, pollas de reemplazo de ponedoras y reproductoras sanas y en aves que no están en producción como auxiliar en la prevención de la Viruela Aviar y la Influenza Aviar (A1).

4.15 El Virus De Influenza Aviar En Carne Congelada

La mayoría de las cepas del virus de influenza aviar se encuentran en el tracto respiratorio y gastrointestinal de aves infectadas, y no en el tejido muscular. Sin embargo, varios estudios indican que el virus de influenza aviar de alta patogenicidad H5N1, se replica en todo el organismo incluyendo músculo. El virus de influenza aviar sobrevive en carne cruda contaminada, productos y subproductos el cual puede ser distribuida al área comercial, como también en carne fresca y congelada.

El virus puede sobrevivir en heces fecales hasta 35 días a bajas temperaturas (4°C), y 6 días a 37°C. También puede mantenerse en superficies ambientales por varias semanas.

Los procesos comunes de preservación de los alimentos como la refrigeración y congelación no reducen sustancialmente la concentración o viabilidad del virus en carne contaminada. Aunque la cocción normal (temperaturas a 70°C o más en todas las partes del producto) inactivarán el virus. A la fecha no hay evidencia epidemiológica de personas infectadas por consumo de carne de aves cocinada adecuadamente. (22)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Recursos Humanos

- Estudiante investigadora
- Tres Médicos veterinarios asesores
- Personal de laboratorio

5.1.2 Recursos de Campo

- Agua
- Bata
- Bebedero
- Bolsas plásticas
- Cámara de desafío
- Comedero
- Comida balanceada fase iniciador
- Desinfectante orgánico
- Guantes
- Lámpara infrarroja
- Lámpara ultravioleta
- Libreta de notas
- Mascarillas
- Papel periódico

5.1.3 Materiales y equipo de Laboratorio

- Alcohol
- Agar macconkey
- Agar sangre

- Asa bacteriológica
- Algodón
- Antibiótico
- Bolsas plásticas estériles
- Campana bacteriológica
- Campana de flujo laminar
- Congelador
- Frascos para colecta de muestras
- Gasas estériles
- Goteros
- Gradillas
- Incubadora de 37°C
- Jeringas de 1, 3, 5 ml
- Marcadores
- Mechero de bunsen
- Papel de aluminio
- Maskin tape
- Micropipetas
- Perforador
- Morteros
- Ovoscopio
- Palillos de dientes
- Pinzas estériles
- Pipetas graduadas 5, 10 ml estériles
- Pipetas Pasteur estériles
- Pipeteador eléctrico
- Pistilos
- Placa de vidrio cuadriculada
- Refrigerador

- Sellador de huevos
- Separador de huevos
- Solución PBS estéril (solución buferada de fosfatos)
- Tijeras estériles
- Tubos de ensayo con tapa rosca estériles
- Viales de vidrio estériles

5.1.4 Recursos biológicos

- 20 pollos de engorde variedad hubbard de 1 día de edad
- Huevos embrionados de pollo de 9-11 días
- Virus de Influenza aviar de baja patogenicidad H5N2 aislado en Guatemala, tipificado en el USDA
- Vacuna recombinante de IA
- Glóbulos rojos lavados al 5%

5.2 Métodos

5.2.1 Manejo del Lote Experimental

Se Utilizó para el estudio una cámara de desafío de acero inoxidable, en la cual fueron alojadas 20 aves divididas en dos grupos, el grupo A vacunado con recombinante al día de edad; y el grupo B sin vacuna (10 aves por grupo). La vacunación se realizó por medio de punción alar.

Las aves permanecieron dentro de la cámara durante 28 días, con comida y agua ad libitum.

El día 21 se inoculó el virus reactivado con una gota al ojo; se observaron las aves y se registraron distintas sintomatologías hasta concluir los 28 días de estudio.

5.2.2 Reactivación del virus

Se reactivó la cepa del virus de Influenza Aviar de baja patogenicidad H5N2 mediante la inoculación de 0.1 ml de virus en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de pollo de 9-11 días. Los huevos inoculados fueron observados diariamente por ovoscopia para confirmar vivos y muertos. Después de 72 horas de inoculación se colectó el líquido alantoideo y se realizó la siembra en AgarSsangre y MacConkey para comprobar la esterilidad. Luego se refrigeró el virus hasta antes de la inoculación de las aves a 4°C.

5.2.3 Inoculación del virus

Se realizaron diluciones del virus inoculando 1ml de virus en 9 ml de PBS en el primer tubo, para hacer la dilución 10^1 , de esta solución se extrajo 1ml para diluciones consecutivas hasta alcanzar el título 10^4 DIE₅₀ /ml, la cual se utilizó para inocular a las aves con una gota (0.03ml) al ojo a los 21 días de edad.

5.2.4 Reaislamiento viral

El día 28 se sacrifico todas las aves, tomando muestras de pierna y pechuga (1gr) de cada uno que posteriormente se congeló por un período de una semana. Se realizaron macerados agregando 5ml de PBS al gramo de muestra, agregando 2ml de antibiótico (Penicilina- estreptomycin 1gr/200ml) dejándolo reposar con una gasa estéril cubierto por 30 minutos en refrigeración a 4°C. Luego se colectó el líquido del macerado y se inoculó 0.1ml en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de 9 días de edad. A las 72 horas se colectó el líquido alantoideo de los huevos inoculados.

5.2.5 Prueba de Microaglutinación

Se preparó una solución de glóbulos rojos al 5%. Se colocó una gota (0.03ml) del líquido alantoídeo en una placa de vidrio adicionando el mismo volumen de glóbulos rojos; homogenizando la muestra con un palillo de madera directamente y luego se realizaron movimientos de rotación durante un minuto, dando así la lectura. Se considera positiva la muestra que presente aglutinación.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados del aislamiento viral de influenza aviar H5N2 en huevos embrionados (9 días de edad) de pechuga y pierna de pollo congelado

Cuadro No. 1

MUESTRA No.	VACUNADOS (macerado de pierna y pechuga)	MUESTRA No.	NO VACUNADOS (macerado de pierna y pechuga)
1	Negativo	11	Negativo
2	Negativo	12	Negativo
3	Negativo	13	Negativo
4	Negativo	14	Negativo
5	Negativo	15	Negativo
6	Negativo	16	Negativo
7	Negativo	17	Negativo
8	Negativo	18	Negativo
9	Negativo	19	Negativo
10	Negativo	20	Negativo

En el cuadro No. 1, se observa que tanto el macerado de pierna y pechuga inoculados en embriones de 9 días para los grupos de pollos vacunados y no vacunados fueron negativos al aislamiento del virus de Influenza Aviar H5N2, después de que éste fue inoculado al ojo, en pollo de 21 días de edad.

Estudios previos evidencian que el virus de influenza aviar de alta patogenicidad H5N1, se replica y es posible aislarlo en todo el organismo incluyendo músculo, sin embargo en el presente estudio se confirma que el virus de Influenza Aviar de baja patogenicidad H5N2 no se aísla a partir de muestras de músculo de pechuga y pierna. Al evaluar el líquido alantoideo extraído de los huevos previamente inoculados con el virus IA H5N2, no se evidenció reacción de microaglutinación en placa de vidrio, por lo que se consideran negativos a la presencia del virus. Los hallazgos coinciden con reportes de Olsen y Swayne, que indican que el virus de influenza aviar de alta patogenicidad se encuentra en el tracto respiratorio (tráquea y bronquios) y tracto gastrointestinal de aves infectadas, y en el tejido muscular, a diferencia del virus de baja patogenicidad que no es aislado de músculo.

Es importante hacer mención que OMS reporta que el virus de influenza aviar sobrevive en carne cruda, productos y subproductos; por lo que es importante someter a proceso de cocción a temperaturas mayores de 70°C para inactivar el virus.

En ambos grupos, aves vacunadas y no vacunadas los resultados a la microhemoaglutinación en placa de vidrio fueron negativos, por lo cual podemos decir que no existe ninguna diferencia de comportamiento de replicación del virus después de ser desafiadas con un virus de influenza aviar de baja patogenicidad.

Sintomatología observada 7 días post desafío del virus H5N2 en aves vacunadas y no vacunadas de 3 semanas de edad.

Cuadro No. 2

SINTOMA	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7
SINUSITIS	-	+	+	+	+	+	+
INFLAMACION DEL SENO INFRAORBITARIO	-	-	+	+	+	+	+
EDEMA PERIOCLAR	-	+	+	+	+	+	+
CONJUNTIVITIS	-	+	+	+	+	+	+
SECRECIÓN OCULAR	-	-	-	-	-	-	-
SECRECIÓN NASAL	-	-	-	-	-	-	-
ESTORNUDOS	-	+	+	+	+	+	+
ESTERTORES	-	-	-	-	-	-	-

En el cuadro No 2 se observa que a partir del segundo día post inoculación, las aves de 21 días de edad mostraron sintomatología clínica característica del virus influenza aviar de baja patogenicidad tales como sinusitis, conjuntivitis, estornudos, edema, etc., lo que comprueba que el virus antes mencionado se replica en tracto respiratorio y no en musculo.

Según los resultados obtenidos el análisis estadístico no aplica.

VII. CONCLUSIONES

1. No existe diferencia en el aislamiento del virus H5N2 de baja patogenicidad en músculo de aves vacunadas y no vacunadas.
2. Se coincide con otros autores que el virus de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad no se replica en músculo de pierna y pechuga, a diferencia del virus H5N1 de alta patogenicidad.
3. Según la sintomatología observada durante el estudio se confirma la presencia del virus de influenza aviar de baja patogenicidad, en tracto respiratorio de aves vacunadas y no vacunadas.
4. El virus de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad presente en Guatemala no representa riesgo de contagio al humano por consumo de carne de pollo.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda que durante la faena la carne no tenga contacto con vísceras para evitar la contaminación.
2. Se recomienda utilizar temperaturas mayores a 70°C en la cocción de carne de pollo y subproductos para consumo humano para inactivar el virus que contamina la carne por contacto con vísceras.
3. Realizar estudios para determinar la viabilidad del virus en vísceras (proventrículo) frescas y congeladas.

IX. RESUMEN

Con el objeto de aislar el virus de Influenza aviar de baja patogenicidad H5N2 de tejido muscular de pierna y pechuga congelada, se inocularon 20 aves SPF dentro de una cámara de desafío. Las aves se dividieron en dos grupos vacunadas (A) y no vacunadas (B) el estudio se realizó durante 28 días.

La cepa del virus de Influenza Aviar de baja patogenicidad H5N2 se reactivó mediante inoculación de 0.1 ml de virus en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de pollo de 9-11 días, luego se refrigeró el virus hasta antes de la inoculación de las aves a 4°C.

Se realizaron diluciones del virus hasta alcanzar el título 10^4 DIE₅₀ /ml, la cual se utilizó para inocular a las aves mediante una gota (0.03ml) al ojo a los 21 días de edad.

Al día 21 se inoculó el virus reactivado mediante una gota al ojo, se observaron las aves y se registraron los signos hasta concluir los 28 días de estudio.

El día 28 se sacrificaron todas las aves, tomando muestras de pierna y pechuga (1gr) de cada uno que posteriormente se congeló; luego se realizaron macerados y se dejaron reposar con una gasa estéril cubierto por 30 minutos en refrigeración a 4°C. Se colectó el líquido del macerado y se inoculó 0.1ml en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de 11 días de edad. A las 72 horas se colectó el líquido alantoideo de los huevos inoculados.

Para la prueba de hemoaglutinación se utilizó una gota del líquido alantoideo colectado y el mismo volumen de una solución de glóbulos rojos homogenizados en placa de vidrio, dando resultados negativos.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. ----- 2006. CULTEK. Virus de Influenza Aviar, Métodos de Diagnostico, Consultado el 08 de septiembre 2009. en línea, disponible en: <http://www.cultek.com/index.asp?p=IA-diagnostico-introducción>

2. ----- 2008. INTERVET, Shcering-Ploug Animal Health, Nobilis ® IA Inac, consultado el 5 septiembre de 2008, en línea, disponible en: http://www.intervetcom.mx/productos/nobilis_ia_inac/010_informaci_n_de_l_producto.asp

3. _____2002. Influenza Aviar. OIE. Paris, Francia, Consultado el 06 de septiembre 2009. en línea, disponible en: http://www.oie.int/esp/maladies/fiches/e_A150.HTM

4. _____2008. Influenza Aviar Revista Avicultores Colombia. Consultado el 17 de junio del 2008. en línea disponible en http://encolombia.com/veterinaria/fenavi_8702sanidad.htm

5. _____2002. APHIS, Influenza Aviar Altamente Patógena. Consultado el 17 de junio de 2008. en línea disponible en http://www.usda.gov/agency/oc/design/test/bird_biosecurity/Downloads/PDF/fs_ahhpai_sp.pdf

6. _____. 2007. Influenza (gripe) aviar. SIVELE, Sindicato de Veterinarios de León, Consultado el 06 de septiembre de 2008, en línea disponible en: <http://www.terra.es/personal/uscal.le/gripeav/etiolo.htm>

7. Arenas, M. 2003. Determinación de anticuerpos séricos contra las enfermedades de Newcastle e Influenza aviar en aves de traspatio circundantes a una granja avícola tecnificada en Cuilapa, Santa Rosa y la relación de ambas. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Guatemala, pp62.

8. Barrera, L. 2006 Características del virus de influenza aviar y una nueva vacuna FLU-VLPS, Universidad Tecnológica y Pedagógica de Colombia, en línea, consultado 5 junio de 2008, disponible en <http://patologiaaviaruptc.blogspot.com/2006/11/caractersticas-del-virus-de-la.html>

9. Brett, M.; y Saume. E. 2006. Diagnóstico de la Influenza Aviar (IA). Revista Digital CENIAP HOY Número 10, 2006. Maracay, Aragua, Venezuela. ISSN 1690-4117, Depósito legal 200302AR1449. URL: www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n10/art/brett_m/arti/brett_m.htm consultado 6 de junio de 2008

10. Cabrera, J.A, 2006. La gripe aviar, enfermedad emergente. Revista LATINDEX, Consultado el 16 de junio 2008. En línea disponible en

<http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/32/3/La-gripe-aviar,-enfermedad-emergente>.

11. Calnek, B.W. et.al. 1995. Enfermedades de las aves, Editorial El Manual Moderno S.A. México, 1147pp.
12. OIE, 2007. Influenza Aviar. Código de salud de los animales terrestres Consultado el 17 de junio 2008. En línea disponible en http://www.oie.int/esp/info_ev/Other%20FilesAvian%20Influenza_Disease_Card_ES.pdf
13. Jordan, F.T.W. Pattison, M. 1998. Enfermedades comunes de las aves, Editorial Manual Moderno, Tercera edición. México, 522pp
14. LINZITTO, Oscar Roberto, ESPINOZA, Cora, RODRIGUEZ, Celso Alberto *et al.* Reseña sobre vigilancia y prevención de la influenza aviar y rol zoonótico. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* [online]. sept./dic. 2005, vol.39, no.4 [citado 09 Septiembre 2009], p.485-492. Disponible en la World Wide Web: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572005000400012&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0325-2957.

15. Petruccelli, M. Influenza Aviar. Universidad de la Plata, Argentina. Consultado el 10 de febrero del 2009. en línea, disponible en <http://www.fcv.unlp.edu.ar/sitios-catedras/9/material/Influenza%20viar.pdf>
16. Rubio, P. et. al. Documento Técnico, La Gripe Aviar y su Repercusión en Castilla y León, Castilla y León, España. Consultado el 24 de febrero del 2009. en línea, disponible en: <http://www.cescyl.es/pdf/informes/iniciativapropia/aviardot.pdf>
17. Ruiz, J.M., 2001. Determinación de niveles de anticuerpos en respuesta a vacunas contra Influenza aviar, utilizando la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación en pollo de engorde de la granja experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Guatemala, pp53.
18. Sánchez, A. et.al 2009. Influenza aviar: Diagnóstico de laboratorio. Laboratorio Central de Veterinaria (Laboratorio Nacional de Referencia para Influenza Aviar), España, consultado el 07 de septiembre 2009, en línea, disponible en: <http://ranf.com/gripe/influenza/cap03.pdf>
19. Swayne, E.D. 2008. Avian Influenza. Blackwell publishing, Oxford U.K. pp605

20. Treviño, Z. 2006. Enfermedades más comunes en las aves. Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de medicina veterinaria y Zootecnia. Consultado 16 junio de 2008. En línea disponible en <http://fmvz.uat.edu.mx/aves/default.htm#iaviar>.

21. Vásquez, E. 2001. Determinación de la presencia de anticuerpos a la enfermedad de Influenza aviar, en aves traspatio en el departamento de Totonicapán en los municipios de Momostenango, San Francisco el Alto y San Cristóbal Totonicapán, utilizando el método de inmunodifusión en agar gel. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Guatemala, pp33.

22. WHO. 2005. Highly pathogenic H5N1 avian influenza outbreaks in poultry and in humans: Food safety implications, International Food Safety Authorities Network (INFOSAN), Italia, consultado el 18 de diciembre de 2008, en línea, disponible en: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_07_AI_Nov05_en.pdf