

20
Reje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**"DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA EL SUBTIPO
H₅ N₂ DEL VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR A PARTIR
DE LA YEMA DE HUEVO"**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A :

MIGUEL ARTURO ASPILLAGA SALAZAR

ASESORES:

MVZ. AURORA VELAZQUEZ E.

MVZ. ANGEL RETANA REYES

MVZ. MOISES FRAIRE CACHON



México, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADEZCO Y DOS GRACIAS A DIOS
POR EL ESFUERZO Y LA PACIENCIA
QUE ME BRINDARON

A MI ESPOSA:

YAZMIN

A MIS HIJOS:

JOSUE Y LUIS MIGUEL

A MI MAMA:

SRA. JULIA

A MI PAPA:

SR. JOSE

A MIS HERMANOS:

JOSE, LUIS, CESAR, ALBERTO Y
VICTOR.

A MIS CUÑADOS:

LUIS ANGEL, DAVID, SERGIO,
JUAN CARLOS, ADALBERTO Y
JESSICA

A LA MAESTRA:

VIOLANTE O. PEREZ SILICEO.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

A MIS ASESORES:

M.V.Z. AURORA VELAZQUEZ R.

M.V.Z. ANGEL RETANA

M.V.Z. MOISES FRAIRE C.

AL HONORABLE JURADO

AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA

EL MAS SINCERO AGRADECIMIENTO A LAS
SIGUIENTES PERSONAS POR SU VALIOSA
COLABORACION

M.V.Z. AURORA VELAZQUEZ R.

M.V.Z. ANGEL RETANA

M.V.Z. MOISES FRAIRE

M.V.Z. RICARDO CUETOS C.

Q.F.B. ISABEL DE FRAIRE

ASI TAMBIEN AL PERSONAL QUE LABORA EN EL DEPARTAMENTO
DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA.

AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE LA COMISION MEXICO -
AMERICANA PARA LA FIEBRE AFTOSA Y OTRAS ENFERMEDADES
EXOTICAS.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL
LABORATORIO DE SEROLOGIA DEL DEPARTAM
MENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINA-
RIA Y ZOOTECNIA DE LA U. N. A. M.

I N D I C E

| | PAG. |
|--|------|
| I. RESUMEN. | 1 |
| II. INTRODUCCION | 2 |
| III. HIPOTESIS Y OBJETIVO | 7 |
| IV. MATERIAL Y METODOS. | 8 |
| V. RESULTADOS. | 15 |
| VI. DISCUSION. | 18 |
| VII. CONCLUSION | 23 |
| VIII. BIBLIOGRAFIA | 24 |
| IX. APENDICE. | 34 |
| X. CUADRO DE TITULOS DE ANTICUERPOS. | 36 |

R E S U M E N

En el presente trabajo se usó la prueba de inhibición de la hemoaglutinación para determinar anticuerpos contra el virus de la influenza aviar $H_5 N_2$ a partir de la yema de huevo. Se trabajaron 20 muestras de gallinas inoculadas experimentalmente con este virus $H_5 N_2$ de la influenza aviar aislado en México por la Comisión México Americana para la Prevención de la Fiebre Aftosa y de otras enfermedades exóticas, - en los animales (C.P.A.), que se usaron como testigos positivos.

Se usaron 100 muestras de diferentes granjas mantenidas en aislamiento con historia clínica y serología negativa y que se usaron como testigos negativos.

De los Estados de Morelos, México, Jalisco, Querétaro, Guanajuato, Puebla se usaron 300 muestras problema encontrando 6 muestras negativas y niveles de anticuerpos que van desde 1:10 a 1:60.

Se concluye que esta técnica es una herramienta más - con la que se puede contar para los muestreos serológicos en la campaña de control y erradicación de la influenza aviar - $H_5 N_2$, presente en México.

I N T R O D U C C I O N

"DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS H₅ N₂ DEL
VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR A PARTIR DE LA YEMA
DE HUEVO".

La influenza aviar (I.A.) es una enfermedad causada por un virus de la familia Ortomixoviridae del grupo de los Influenza virus tipo A que afecta a las aves y se caracteriza por signos respiratorios, con elevada morbilidad y mortalidad para cepas altamente patógenas, sin embargo existen serotipos de baja virulencia en donde la morbilidad es elevada y la mortalidad es nula (1,3,4,5,8,9,19,28,29,34,46,56).

La enfermedad fue descrita por primera vez en Italia en 1878 (Perroncito) pero su agente viral fue identificado hasta 1955 en Alemania (Schafer) quien llamó plaga aviar a este padecimiento (12,17,19,48). Son virus RNA envueltos, de 80 a 120 nm de diámetro, pleomórficos con simetría helicoidal y con actividad hemaglutinante y neuraminidasa. Existen tres tipos de virus de Influenza: A, B y C, los cuales se clasifican de acuerdo a las características antigénicas de las proteínas de la matriz (M) y de la nucleoproteína (NP) (6,7,8,30,31,33,35,54). Los virus tipo A afectan a humanos, aves, equinos y cerdos, mientras que los B y C sólo han sido encontrados en Humanos. Los virus tipo A, tienen dos antígenos importantes de superficie, Hemaglutinina (H ó HA) y Neuraminidasa (N ó NA). Existen subtipos que dependen de estas características para

diferenciarse, a la fecha se han identificado 13 hemaglutininas según Pearson (38) y 9 neuraminidasa diferentes (35,36, 45,50). Entre los subtipos no se presenta antigenicidad cruzada (5,11,55). La virulencia de los virus de Influenza es extremadamente variable y no puede ser determinada por el huésped de origen o el subtipo antigénico de los virus aviares. Los subtipos H₅ y H₇ han sido asociados con alta patogenicidad en las aves. Sin embargo, existen cepas apatógenas de los mismos subtipos (5,12,19,24,27,38,45). Las bases moleculares que determinan la virulencia de los virus de IA no han sido completamente explicadas. La presencia de aminoácidos básicos en la porción terminal de la hemaglutinina está asociada a la virulencia del virus. Así mismo los virus de Influenza apatógenos tienen una glicosilación en la hemaglutinina (HA) que bloquea su unión a las células, una simple mutación que elimine dicha glicosilación puede convertir a una cepa en altamente patógena (25,27,42,49,50,53).

El virus se puede replicar en embriones de pollo inoculados en cavidad alantoidea, causando muerte embrionaria en 48 a 72 horas. En cultivos celulares el virus produce efecto citopatogénico (11, 19,20,22,23,24,25,29,31,35,42,44).

Clinicamente la IA se presenta como una enfermedad leve o asintomática y con complicaciones bacterianas, observando los siguientes signos en aves de 3 a 7 semanas de edad: depresión

disminución de consumo de alimento, problemas respiratorios de rápida difusión, estertores, estornudo, moco en fosas nasales, lagrimeo, párpados edematizados, inflamación de la cabeza, deyecciones verde claro, congestión de tráquea con tapones blanquecinos, signos nerviosos en algunas aves (5,13,18,21,35,36,37,41,48,49,52,55). Las lesiones varían dependiendo de la patogenicidad del virus, en la mayoría de los brotes de influenza en los pollos hay una inflamación de ligera a moderada de la tráquea, senos, sacos aéreos y conjuntiva (5,13,19,21,36,41,48,55). En las gallinas ponedoras frecuentemente hay una involución del ovario y del oviducto. En la infección con virus altamente patógeno, las lesiones macroscópicas en las aves son extensas y severas, frecuentemente se observa aerosaculitis, salpingitis, pericarditis, peritonitis con exudado fibrinoso, los pulmones pueden estar consolidados por neumonía, puede presentarse una marcada sinusitis y los senos están disetendidos por la presencia de exudado, se puede encontrar pequeños focos necróticos en la piel, cresta, barbillas, hígado, riñones, bazo, pulmones, intestino y pancreas. En los brotes severos de IA se presenta frecuentemente congestión, edema, hemorragia, infiltración perivascular linfocitaria, incluso en cerebro (5,9,19,22,36,47). La enfermedad puede diseminarse a través de manejo inadecuado de aves infectadas,

gallinaza y otros productos avícolas, además de cajas y separadores de huevo (17,43). Existe la posibilidad de transmisión por contacto indirecto por medios mecánicos como: equipo ropa, zapatos, vehículos y personas (10,19,21). Las aves silvestres y acuatáticas migratorias, (5,41,45,52) los insectos, roedores, perros y gatos pueden llevar al virus de aves infectadas a las susceptibles (10,18,19,55). El control y erradicación de IA altamente patógena son caros (21). Los costos de la erradicación son altos, incluyen: aves sacrificadas, pago a los avicultores, cuarentena, limpieza de granjas, sepultar, muertos y desinfectar (15,16,37,39,40).

En los meses de abril y mayo de 1994 se notificó la presencia de un virus de baja patogenicidad en aves criadas en el valle de México, el diagnóstico se realizó en el laboratorio de alta seguridad de la Comisión-México-Americana para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas, se identificó como un virus $H_5 N_2$ de baja virulencia, sin embargo, tomando como experiencia lo acontecido en los Estados Unidos de Norteamérica en 1984, en donde también se identificó el virus $H_5 N_2$ de baja virulencia, se observó que este virus posteriormente mutó a ser una cepa de alta virulencia; esto motivó el uso de los mecanismos para su control y erradicación en México (2,13,14,26,27,32,44,53).

Dentro de las técnicas serológicas para el muestreo

de las parvadas, contra virus de influenza se usa la técnica de Inhibición de la hemoaglutinación y la de Precipitación en agar. La primera es una técnica que permite identificar niveles bajos de anticuerpos considerando títulos de 1/10 como positivos. La prueba de precipitación en agar es una técnica recomendada para detectar anticuerpos cuando éstos se encuentran elevados.

En los muestreos serológicos de las parvadas, se sangran las aves para realizar las pruebas ocasionando un manejo adicional que repercute en la producción de carne y huevo (16). Una alternativa en el caso de gallinas de postura sería la de terminación de anticuerpos a partir de la yema de huevo, considerando que una ave que ha estado en contacto con un virus ha sufrido de la infección, su sistema inmunológico responderá con la producción de anticuerpos y linfocitos sensibilizados. Gran parte de estos anticuerpos de la gallina en postura son transferidos a través de la yema tanto de protenitoras, reproductoras y en gallinas productoras de huevo comercial, por ser un mecanismo de inmunidad pasiva natural (51).

HIPOTESIS

El diagnóstico de la Influenza aviar se puede hacer mediante la detección de anticuerpos en la yema de huevo.

OBJETIVO

Determinar la presencia de anticuerpos a partir de la yema de huevo contra el virus de la influenza aviar $H_5 N_2$, mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se obtuvieron 300 huevos de gallinas con antecedentes de brotes por el virus H_5N_2 y positivos serológicamente a la prueba de inhibición de la hemoaglutinación en los 5 Estados. De estos huevos se obtuvo la yema, se realizó una dilución 1:2 en Solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) PH 7.3 y se mantuvieron en congelación hasta su uso considerándose como lote experimental.

El lote testigo negativo fue formado por 100 yemas de --huevo de gallinas serológicamente negativas y se les hizo el mismo tratamiento arriba mencionado.

El lote testigo positivo de 20 huevos de gallinas inoculadas experimentalmente con el subtipo H_5N_2 positivos serológicamente a la prueba de IH.A.

En las muestras del grupo experimental y del grupo testigo negativo se realizó la prueba de inhibición de la hemoaglutinación contra el virus H_5N_2 , siendo la técnica de la - Norma Oficial Mexicana de Sanidad Animal SSARF (16).

La base de la IH es la interacción, de los anticuerpos con el virus homólogo, que inhiben la aglutinación de los eritrocitos.

PREPARACION DE REACTIVOS

A. PREPARACION DE G.R. (0.5%).

- Sangre de pollo colectada en solución de Alseaver.
(v/v).
- Lavar los eritrocitos colocando en un tubo de centrifuga un volúmen de sangre con Alseaver y llenar el tubo con SSAF.
- Invertir el tubo varias veces para suspender los eritrocitos.
- Centrifugar la sangre a 800 r.p.m. durante 10 minutos.
- Quitar el SSAF y la capa de células blancas.
- Llenar nuevamente el tubo con SSAF.
- Repetir el ciclo del lavado y centrifugación 2 veces más.
- Diluir los eritrocitos a una concentración final de 0.5% en SSAF, sin albúmina.

B. SOLUCIONES:

1.- Solución Salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) pH 7.3

(Apendice Hoja No. 34)

2.- Anticoagulante de Alseaver.

(apendice Hoja No. 34)

C. ANTISUERO POSITIVO PARA EL SEROTIPO DE VIRUS QUE SE EM
PLEA DONADO POR C.P.A.

D. ANTIGENO VIRAL INACTIVADO (H_5N_2).

con título 8 UHA donado por C.P.A.

E. TITULACION DE ANTIGENO.

1.- Poner 0.05 ml de SSAF con albúmina. dos filas de 12
pozos en una microplaca.

2.- Agregar 0.05 ml de antígeno en el primer pozo de
cada fila.

3.- Utilizando micropipetas o microdiluidores de 0.05ml,
se efectúan diluciones dobles seriadas (1:2 a 1:1024) del an-
tígeno, dejando los dos últimos pozos de cada fila sin antige-
no para que sirvan como testigos de las células.

4. Agregar 0.05 ml de la suspensión al 0.05% de eritrocitos de ave a cada pozo y agitar la microplaca para mezclar los reactivos.

F. INTERPRETACION DE LA TITULACION DEL ANTIGENO (HA).

1.- El punto final de la titulación del antígeno está en la dilución más alta del antígeno que produzca 100% de hemoaglutinación. En esta dilución se considera que existe -- una unidad hemoaglutinante.

G. PROCEDIMIENTO PARA EFECTUAR LA PRUEBA DE (IH)

Detección de anticuerpo en sueros. (Prueba tamiz). Se usará la misma prueba, utilizando detección y anticuerpo en yema de huevo que será la muestra.

1.- Identificar y hacer una relación exacta de las yemas (muestra) que se someterán a la prueba.

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

3.- Siguiendo un orden secuencial, depositar 0.025 ml las muestras que se van a probar, Ejemp. en el pozo A1 se

deposita la muestra No. 1, en el pozo A12 la muestra No. 12, en el pozo B1 depositar la muestra No. 13 y así sucesivamente hasta el pozo H12, en el que se deposita la muestra No. 96.

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

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

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

Esta operación se repite con las demás muestras empleando 2 pozos por cada muestra. En cada microplaca se debe poner una muestra positiva y un control de eritrocitos.

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

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

Ejemp. título del antígeno 256, unidades deseadas - - 4 (256/4) en la dilución 1:64 existirán 4 unidades hemoaglutinantes por cada 0.25 ml. Después de agregar la dilución del antígeno deberá hacerse una comprobación del número de unidades en la prueba.

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

INTERPRETACION DE LA PRUEBA DE (IH)

La lectura de la prueba se realiza cuando los eritrocitos en el control de células se sedimente, formando un botón circular con bordes bien delimitados en el fondo el pozo. La inhibición de la hemoaglutinación producida por las muestras

positivas tiene un patrón semejante al control de células, un botón circular con bordes definidos que se desliza tomando la forma de una lágrima en el fondo del pozo, si la placa se inclina en un ángulo de 45 grados. Cuando las muestras son negativas y no alcanzan a inhibir la acción hemoaglutinante del antígeno, los eritrocitos se sedimenta formando una capa uniforme en el fondo de los pozos.

Se deberá efectuar la titulación para determinar el punto final de las muestras que resulten positivas en la prueba tamiz, todas las muestras que produzcan inhibición de la hemoaglutinación franca de la dilución 1:10 deben considerarse positivas.

RESULTADOS

Se trabajaron 420 huevos, 300 huevos eran de 18 granjas avícolas productoras de huevo comercial procedentes de los Estados de Morelos, México, Jalisco, Guanajuato y Puebla; -- las cuales fueron muestras problema. Simultáneamente se inocularon 20 gallinas de postura en las unidades de aislamiento de la comisión México Americana para la prevención de la fiebre aftosa y de otras enfermedades exóticas (CPA), con el virus de Influenza Aviar H_5N_2 siendo los huevos de estas -- aves los testigos positivos. También se trabajaron 100 huevos procedentes de aves libres a la infección del virus H_5N_2 utilizándose estos como testigos negativos.

Los resultados de los huevos del lote testigo positivo de las gallinas inoculadas experimentalmente con el virus H_5N_2 a la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación fueron -- 12 (60%) con título de 1:40, 5 (25%) con título de 1:80, 3 -- (15%) con título de 1:160 (cuadro 1).

Los resultados obtenidos de lote testigo negativo mediante la prueba de la inhibición de la Hemoaglutinación para -- los 100 huevos procedentes de gallinas libres a la infección del virus H_5N_2 fueron negativos.

Del Estado de Morelos se recolectaron 60 huevos procedentes de 2 diferentes empresas comerciales ambas empresas con antecedentes de haber sufrido brote de influenza aviar e incluso se aisló el virus siendo confirmado por CPA. Obteniendo de éstas los siguientes títulos, 6 (10%) con 1:10, 7, - - (11.6%) 1:20, 10, (16.6%) 1:40; 17, (28.3%) 1:80, 20, (33.3%) 1:160, (cuadro 2).

Del Estado de México se recolectaron 60 muestras de 2 empresas comerciales productoras de huevo comercial éstas sin antecedentes clínicos los resultados fueron con los siguientes títulos; 3 (5%) con 1:10, 3 (5%) 1:20, 5, (8.3%) 1:40, 22, 36.6%) 1:80; 25, 1:160 y 1, (1.6%) negativo (cuadro 2).

Del Estado de Jalisco se trabajaron 60 muestras de 10 granjas productoras de huevo comercial ubicadas en diferentes empresas del Estado estas sin antecedentes clínicos de la enfermedad; los resultados fueron: 6 (10%) negativos, 10, (16.6%), 1:10, 7, (11.6%) 1:20, 5, (8.3%) 1:40, 10, (16.6%) 1:80, 22, (26.6%), 1:160, (cuadro 2).

En el Estado de Guanajuato se procesaron 60 muestras de 2 granjas reproductoras de huevo comercial ubicadas en diferentes municipios, éstas sin antecedentes clínicos de la enfermedad; los resultados fueron: 8, (13.3%) de 1:20, 14, (23.3%) de 1:40, 19, 31.6%) de 1:80, 19, (31.6%) de 1:160; (cuadro 2).

En Puebla se recolectaron 60 muestras de 2 granjas reproductoras de huevo comercial ubicadas en diferentes regiones del Estado sin antecedentes de la enfermedad; los resultados fueron: 8, (13.3%) 1:10, 12, (20%) 1:20, 21, (35%) 1:40; 10, -- (16.6%) 1:80, 9, (15%) 1:160, (cuadro 2).

La prueba de la inhibición de la hemoaglutinación utilizando la yema de huevo para la determinación de anticuerpos contra el virus de Influenza Aviar H_5N_2 se evaluó con la -- misma prueba simultáneamente con sueros positivos y negativos al virus.

D I S C U S I O N

Del grupo testigo positivo se obtuvieron resultados a la prueba de I.H.A. tanto para el suero como para la yema títulos muy semejantes.

Estas aves fueron sangradas y con el suero se corrió la prueba de I.H.A. frente al virus $H_5 N_2$ los títulos obtenidos fueron de 12 sueros (60%), 1:40 y 8 (40%) 1:80; asimismo se recolectaron los huevos de estas aves y a partir de la yema se busco la presencia de anticuerpos contra el virus de -- I.A., los resultados fueron de 12 yemas (60%) 1:40; 5 (25%) - 1:80; y (15%) 1:160. Si comparamos los títulos obtenidos en los sueros con los títulos de las yemas, podemos observar un incremento en la presencia de anticuerpos en la yema de huevo que corresponden a títulos que van de 1:80 a 1:160 y que se observaron en 8 yemas un 40%. Esto es de esperarse debido a que las aves transmiten la inmunidad a su progenie a través de la yema (19,22). (cuadro 1).

Del Estado de Morelos se muestrearon 60 huevos al asar de 2 diferentes empresas avícolas con antecedentes de haber sufrido brote de Influenza aviar, los títulos a la prueba de I. H. A. fueron de 1:10 a 1:160 siendo el 33.3% más alto en la dilución 1:160 cabe señalar que la tendencia es a incrementarse esto puede deberse a que estos animales se han infec

tado en forma natural con el virus (cuadro 2).

Del Estado de México Guanajuato, Puebla y de Jalisco, de cada uno de ellos se muestrearon 60 huevos de aves procedentes de diferentes empresas avícolas sin antecedentes de haber sufrido la enfermedad, los títulos van de 0 a 1:160. En estas aves se puede observar que el mayor porcentaje corresponde a los títulos de 1:160, (cuadro 2).

En cambio en el Estado de Puebla el porcentaje más alto lo encontramos en la dilución 1:40. La diferencia de estos títulos puede deberse a que no todos los individuos responden inmunológicamente igual después de una infección esto puede deberse a factores genéticos, estrés, y a otros agentes inmunodepresores que de alguna forma alteran los títulos de anticuerpos, también en un brote de campo con I.A. no todos los animales se infectan el mismo día si no que la infección va siendo paulatina y si se toman muestras los títulos de anticuerpos son variables e inclusive pueden haber aves negativas. Así también existe la posibilidad de vacunación o reinfección; sin embargo la vacunación no está permitida, porque esta enfermedad está en proceso de control y erradicación y la prueba serológica utilizada en la campaña es la I.H.A., si las aves fueron vacunadas alteraría la interpretación serológica (cuadro 2).

Considerando este muestreo aleatorio en los 5 estados nos hace reflexionar de que el virus se mantiene en las parvas. Sin embargo existen granjas que fueron negativas.

En este trabajo la finalidad fue utilizar muestras obtenidas de huevo para utilizar la prueba de I.H.A. en la yema, consideramos que hizo falta contar con mayor información con respecto a cada una de las granjas y del número de granjas - existentes en cada localidad; así como el número de aves que se maneja en cada una de ellas. Hace falta realizar un trabajo en donde se contemple el número de aves y de granjas en cada uno de los estados para llegar a conocer la prevalencia de esta enfermedad en nuestro país.

La determinación de anticuerpos a partir de la yema nos ofrece ventajas como son la obtención de muestras en el momento que se requieran en cantidad suficiente y calidad deseada sin tener que molestar a las aves que al tomar una muestra sanguínea representa un motivo de estrés y con esto una posible baja en la producción; otra ventaja es que podemos obtener muestras de diferentes Estados y tener un seguimiento de aquellas empresas con problemas de I.A. es importante recordar que dentro de las campañas para el control y la erradicación de una enfermedad, en este caso I.A. es de suma importancia el muestreo serológico que es una herramienta para evaluar la incidencia o prevalencia de la infección dentro de -

las parvadas.

En los resultados obtenidos podemos observar que en -- las granjas donde las aves sufrieron la infección en forma natural los títulos de anticuerpos fueron variables con títulos que van de 1:10 a 1:160, e incluso aves negativas esto es lógico de entender, pues dentro de la población de aves no todas se infectan en el mismo momento sino que empiezan unas -- y paulatinamente se van infectando el resto de la población -- que por consecuencia nos dan títulos variables. (cuadro 2). Sin embargo no todos los animales van a responder con títulos de anticuerpos idénticos porque existen factores individuales que darán una respuesta inmunológicamente diferente y con estos títulos variables. En el muestreo de huevo también se encontró granjas con títulos de anticuerpos más homogéneos teniendo valores promedio de 1:80, estos resultados pueden deberse a dos posibles causas, una es que la infección se dió -- en forma natural y que existió una respuesta inmunológica, y en el momento de tomar las muestras, las gallinas ya habían -- controlado la infección y los títulos de anticuerpos fueron -- más homogéneos. Otra posibilidad es que estas aves recibie--ron una inmunización. Donde su sistema inmunológico va a sintetizar anticuerpos específicos para cada uno de los determinantes antigénicos y que si existe un virus mutante los anticuerpos estimulados por la vacuna no neutralizaran al virus -- mutante independientemente de que existan anticuerpos contra

algunos otros epítopes de este virus.

Al correr las pruebas I.H.A. para el virus de I.A. H₅ N₂ para su titulación se observó que este virus no eluye a eritrocitos de aves después de 48 horas mantenidos a una temperatura de 5 a 25 grados centígrados.

La prueba de I.H.A. se puede realizar en cualquier laboratorio de serología, lo único que se necesita son las muestras (huevos), lo más fresco posible con su identificación y seguir la técnica descrita en este trabajo que es la misma que recomienda la Norma Oficial Mexicana.

CONCLUSION

Se concluye que la técnica de laboratorio de inhibición de la hemoaglutinación es compatible y confiable para determinar la presencia de anticuerpos a partir de la yema de huevo - de gallinas con el virus de la Influenza Aviar H₅N₂.

LITERATURA CITADA

- 1) Allan, W.H., D.J., Alexander, B.S. Pomeroy, and G. Parsons, Use of virulence index tests for avian influenza viruses. Avian Dis. 21: 359-363. (1977).
- 2) Avi-mex. Departamento Técnico.: Presencia del virus de influenza aviar en México. Acontecer Avícola, 2 (8): 17 - 24 (1994).
- 3) Bahl, A.K. and B.S. Pomeroy. Isolation of two turkey influenza A viruses in Minnesota. Avian Dis. 19: 374 - 378. (1975).
- 4) Bahl, A.K., B.S. Pomeroy, B.C. Easterday, and S. Mangundimedjo. Isolation of type A influenza viruses from the migratory water fowls along the Mississippi flyway. J. Wild Dis. 11: 360 - 363. (1975).
- 5) Beard, C.W. y Easterday, B.C.: Influenza Aviar, Enfermedades Exóticas de los Animales su Prevención Diagnóstico y Control 4ta. ed: Comité de Enfermedades exóticas de la Asociación de Sanidad Animal de los Estados Unidos de Norteamérica, 245-251, Comisión México-Americana para la Prevención de la Fiebre Aftosa, México, D.F., 1986.

- 6) Beard, C.W. Avian Influenza. In: Isolation and Identification of Avian Pathogens. American Association of Avian Pathologists. p: 174-181. (1975).
- 7) Beard, C.W. Avian Influenza. In: Isolation and Identification of Avian Pathogens. 3 th. Edit. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pennsylvania, 1989.
- 8) Beard, C.W. and B.C. Easter-ay. A/Turkey/Oregon/71. An Avirulent influenza isolate with the hemmagglutinin of fowl plague. Avian Dis. 17: 171-181. (1973).
- 9) Borrego, J.L. y Soto, E.: Presentación clínica de influenza aviar (IA) en gallinas de postura en México, Memorias del - Sexto Curso de Actualización Avi-mex, Procesos Patológicos - que afecta la Productividad Avícola e Influenza Aviar. México, D.F. 1-94. Avi-mex. México, D.F. (1994).
- 10) Bread, W.CH.: Medidas de Control de Influenza Aviar. Memorias del curso de Actualización sobre Influenza Aviar. México, D.F. 1994. 1-6. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, México, D.F. (1994).
- 11) Brugh, M., C.W. Beard and H.D. Stone. Immunization of --- chickens and turkeys against avian influenza with monovalent oil emulsion vaccines. Memorias del Curso de Actualización sobre Influenza Aviar. México, D.F. 1994. 7-16. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, México, D.F. (1994).

- 12) Brugh, M.: Historia de la influenza aviar y determinación de patogenicidad. Memorias del Curso de Actualización sobre Influenza Aviar. México, D.F. 1994. 7-16. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, México, D.F. (1994).
- 13) Ceniceros, R.M.: Influenza aviar en México, Proaves, 5(1): 1-2 (1994).
- 14) Comité de Enfermedades Exóticas de la Asociación de Sanidad Animal de los Estados Unidos de Norteamérica.: Enfermedades Exóticas de los Animales su Prevención Diagnóstico y Control. Comisión México-Americana para la Prevención de la Fiebre Aftosa, México, D.F., 1986.
- 15) Coordinación del operativo de Control y Erradicación de la Influenza Aviar SARH.: La influenza aviar en México. Tecnología Avipecuaria, 7 (79): 35-36 (1994).
- 16) Diario Oficial de la Federación. Miércoles 3 Agosto 1994. México, D.F. (1a. sección). Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.
- 17) Dirección General de Salud Animal, SARH.: Cronología de la IA en México, Acontecer Avícola, 2 (8): 26-30 (1994).
- 18) Dirección General de Salud Animal y Unión Nacional de Avicultores. Guía Preventiva Contra Influenza Aviar, Acontecer Avícola, 2 (8): 64-66 (1994).

- 19) Easterday, B.C. and Hinshaw, V.S.: Influenza In: Diseases of Poultry. 9th Edited by: Calnek B.W., Barnes J.K., Beard, C.W., Reid, W.M. and Yoder, H.W., 532-551, Iowa State University Press, Ames, Iowa. 1991.
- 20) Easterday, B.C. and B. Tumova. Avian Influenza. In: Diseases of Poultry. 7th. Ed. pp: 549-573. Iowa State University Press., Ames, Iowa. (1978).
- 21) Eckroade, R.J. y Davison, S.A.: Influenza aviar, epidemiologia e impacto sobre la industria mundial. Memorias del VI Seminario Internacional de Patología Aviar AMEVEA. -- Athens, Georgia. 1986. 261-274. Universidad de Georgia, Athens, Georgia. (1986).
- 22) Halvorson, D.A., D. Karunakaran, and J.A. Newman. Avian influenza in caged laying chickens. Case Report, Avian Dis. 24: 288-294. (1980).
- 23) Halvorson, D.A., D. Karunakaran, D.Senne, C. Kelleher, C. Bailey, A. Abraham, V. Hinshaw and J. Newman. Epizootiology of avian influenza-simultaneous monitoring of sentinel ducks and turkeys in Minnesota. Avian Dis. 27: 77-85. (1983).

- 24) Hinshaw, V.S., R.A. Bankowski, J.K. Rosenberger. Influenza viruses related to A/Sherwater/Australia/1/72 (Hav5 Nav5) in domestic fowl and feral birds. Avian Dis. 22: 24-31(1978).
- 25) Hinshaw, V.S. R.G. Webster, W.J. Bean and G. Sriram. The ecology of influenza viruses in ducks and analysis of influenza viruses with monoclonal antibodies. Comp.Inmu. Microb.Infect.Dis. 3: 155-165.(1980).
- 26) Gay,G.M., Soto, P.E. y Merino, B.J.: Aislamiento e identificación del virus de la influenza aviar en México. Memorias del Sexto Curso de Actualización Avi-mex, Procesos - Patológicos que Afectan la Productividad Avícola e Influenza Aviar. México, D.F. 1994. 77-84. Avi-mex, México, D.F. (1994).
- 27) Gay, G.M., Soto, P.E. y Merino, B.J.: Virus de influenza - aviar. Acontecer Avícola, 2 (8): 42-50 (1994).
- 28) Gerald, L.M., Gordon, D.R. and Bennett, J.E.: Infectious Diseases. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, 1985.
- 29) Johnson, D.C. and G.B. Maxfield. An occurrence of Avian influenza virus influenza virus infection in laying chickens. Avian Dis. 20: 422-424. (1976).

- 30) Johnson, D.C., B.G. Maxfield and J.I. Moulthrop.
Epidemiologic studies of the 1975 outbreak of avian
influenza in chickens in Alabama. Avian Dis. 21: 167-177.
(1977).
- 31) Karunakaran, D., V. Hinshaw, P. Pass, J. Newman and D.
Halvorson. Influenza outbreaks in Minnesota turkey due to
a subtype H10 N7 and possible transmission by waterfowl.
Avian Dis. 27: 357-365.
- 32) Mateos, A.: Presencia de virus de influenza aviar en México.
Memorias del Curso de Actualización sobre Influenza Aviar.
México, D.F. 1994. 17-22. Asociación Nacional de Especialis-
tas en Ciencias Avícolas, México, D.F. (1994).
- 33) Merck y Co.: El Manual Merck de Veterinaria. 2a. ed., Rahway,
New Jersey, 1981.
- 34) Mohan, R., Y.M. Saif, G.A. Erickson, G.A. Gustafson and -
B.C. Easterday. Serologic and epidemiologic evidence of
infection in turkeys with an agent related to the swine -
influenza virus. Avian Dis. 25: 11-16.
- 35) Mohanty, S.B. y Dutta, S.K.: Virología Veterinaria. Nueva
Editorial Interamericana, México, D.F., 1983.

- 36) Mosqueda, T.A. y Lucio M.B.: Enfermedades Comunes de las Aves Domésticas. Sistema de Universidad Abierta, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1985.
- 37.) Organización Panamericana de la Salud.: Cuarentena Animal. Vol. 1 Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud, Banco Interamericano de Desarrollo, Washington, D.C., 1986.
- 38) Pearson, E.J.: Criterio para la caracterización del virus de influenza aviar para toma de acciones reguladoras. Memorias del Curso de Actualización sobre Influenza Aviar - México, D.F. 1994. 29-34. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, México; D.F. (1994).
- 39) Rivera, C.E.: Medidas oficiales de control de influenza - aviar en México. Memorias del Curso de Actualización sobre Influenza Aviar. México, D.F. 1994. 35-37. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, México, D. F. (1994).
- 40) Rodríguez, H.G.: Medidas preventivas adoptadas por la Dirección General de Salud Animal. Memorias del Seminario sobre Influenza Aviar. México, D.F. 1984. 25-33. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, México, D.F. (1984).

- 41) Rosales, A.G.: La influenza aviar. Memorias del Seminario sobre Influenza Aviar. México, D.F. 1984. 7-17 Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, México, D.F. (1984).
- 42) Rosales, A.G. y Lucio, M.B.: Influenza aviar, características del agente etiológico. Memorias del Seminario sobre Influenza Av. Ar. México, D.F. 1984. 1-6. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, México, D.F. (1984).
- 43) Sánchez, W.C.: Movilización de las aves durante los procesos de comercialización en el control de influenza aviar. - Memorias del Curso de Actualización sobre Influenza Aviar. México, D.F. 1994. 38-47. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, México, D.F. (1994).
- 44) Senne, D.A., J.E. Pearson, L.D. Miller and G.A. Gustafson. Virus isolations from pet birds submitted for importation - into the United States. Avian Dis. 27: 731-744. (1983)
- 45) Shane, S.M.: La Influenza aviar (IA). Tecnología Avípecuaria, 7 (79): 37 (1994).
- 46) Slemmons, R.D., D.C. Johnson and T.G. Malone. Influenza - - type A isolated from exotic birds. Avian Dis. 17: 458-459. (1973)
- 47) Soto, P.E.: Influenza aviar. Memorias del Sexto Curso de - Actualización Avi-mex, Procesos Patológicos que Afectan la Productividad Avícola e Influenza Aviar. México, D.F.

1994. 69-76. Avi-mex, México, D.F. (1994).
- 48) Soto, P.E.: Consideraciones prácticas sobre influenza - aviar. Acontecer Avícola, 2 (8): 31-39 (1994).
- 49) Soto, P.E.: Influenza aviar. Boletín Técnico Avi-mex No. 11. Avi-mex, México, D.F. (1994).
- 50) Téllez, I.G. y Mateos, P.A.: Propiedades biológicas de - la patogenicidad del virus de la influenza aviar. Proaves 5 (1): 4-5 (1994).
- 51) Tizard R. IAN
Inmunología Veterinaria, 3ra. ed. (1989). Interamericana.
- 52) Trock, S.: Epidemiología de la influenza aviar. Memorias del Curso de Actualización sobre Influenza Aviar. México, D.F. 1994. 48-49. Asociación Nacional de Especialistas - en Ciencias Avícolas, México, D.F. (1994).
- 53) Valladares, J.C. y Téllez, G.: Influenza aviar en México. Acontecer Avícola. 2 (8): 55-61 (1994).
- 54) Webster, R.G., M. Morita, C. Pridgen et. al.: Ortho and paramyxoviruses from migrating feral ducks. Characterization of a new group of influenza viruses. J. Gen. Virol. 32: 217-225. (1976).

- 55) Whiteman, C.E. and Bickford, A.A.: Manual de Enfermedades de las Aves. 2a. ed. Asociación Americana de Patólogos - Aviares, Kennett Square, Pennsylvania, 1983.
- 56) World Health Organization Committee. A revised system of nomenclature for influenza viruses. Bull. WHO 45: 119-124. (1971).

APENDICE

1.- Solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) pH 7.3

Solución A

| | | |
|--|--------|---------|
| Na ₂ HPO ₄ Anhidro | 0.15 M | 21.30 g |
| Na Cl | | 8.50 g |
| Agua destilada c.b.p. | | 1000 ml |

Solución B

| | | |
|---|--------|---------|
| Na H ₂ PO ₄ Anhidro | 0.15 M | 19.00 g |
| Na Cl | | 8.50 g |
| Agua destilada c.b.p. | | 1000 ml |

Solución de trabajo

| | |
|--------|----------|
| Sol. A | 80.00 ml |
| Sol. B | 20.00 ml |

La mezcla de las soluciones A y B tendrá un pH 7.3 a esta solución deberá agregarse 0.02 g ■ de albúmina serica bovina. (Cuando se diluya el virus).

2.- Anticoagulante de Alseaver:

| | |
|------------------|---------|
| Dextrosa | 20.5 gr |
| Citrato de sodio | 8.0 g |

| | |
|------------------|---------|
| Acido cítrico | 0.55 g |
| Cloruro de sodio | 4.2 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Esterilizar en autoclave 100° C, 15 minutos.

CUADRO No. 1

FRECUENCIA Y PORCENTAJE DE MUESTRAS DE SUERO SANGUINEO Y YEMA DE HUEVO DE AVES INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL VIRUS -- H_5N_2 (LOTE TESTIGO POSITIVO) EVALUADOS POR LA PRUEBA DE IHA EXPRESADA EN TITULOS

| N° DE MUESTRAS POSITIVOS DE SUERO Y % | TITULOS OBSERVADOS. |
|---------------------------------------|---------------------|
| 12 (60%) | 1/40 |
| <u>8 (40%)</u> | 1/80 |
| TOTAL 20 (100%) | |

N° DE MUESTRAS POSITIVOS DE YEMA Y %

| | |
|-----------------|-------|
| 12 (60%) | 1/40 |
| 5 (25%) | 1/80 |
| <u>3 (15%)</u> | 1/160 |
| TOTAL 20 (100%) | |

CUADRO No. 2

NUMERO DE MUESTRAS (HUEVOS) CON TITULOS DE ANTICUERPOS
A LA PRUEBA DE LA INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION.

| LOTE | NEGATIVO | 1/10 | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | TOTAL MUESTRAS |
|---------------------|----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-------------------|
| Morelos | | 6(10%) | 7(11.6%) | 10(16.6%) | 17(28.3%) | 20(33.3%) | 60 |
| Edo. de México | 1(1.6%) | 3(5%) | 3(5%) | 5(8.3%) | 22(36.6%) | 26(43.3%) | 60 |
| Jalisco | 6(10%) | 10(16.6%) | 7(11.6%) | 5(8.3%) | 10(16.6%) | 22(36.6%) | 60 |
| Guanajuato | | | 8(13.3%) | 14(23.3%) | 10(31.6%) | 9(31.6%) | 60 |
| Puebla | | 8(13.3%) | 12(20%) | 21(35%) | 10(16.6%) | 9(15%) | <u>60</u> |
| TOTAL DE MUESTRAS = | | | | | | | 300 |

Títulos mayores 1: 10 se considera positivas según la norma de sanidad animal. (16).