UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES PRUEBAS SEROLOGICAS: INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÒN, ELISA Y PRECIPITACIÓN EN AGAR GEL, PARA LA DETECCIÓN DE RESPUESTA INMUNE CONTRA INFLUENZA AVIAR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
FRANCISCO ALEJANDRO MORALES REYES

ASESOR: Msc. RAUL ARTURO MAR CRUZ
MVZ. MARCO ANTONIO MENDOZA SAAVEDRA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2004

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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 esta 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.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Estudio Comparativo de tres Pruebas Serológicas: Inhibición de la Hemoaglutinación, ELISA y Precipitación en Agar Gel, para la Detección de Respuesta Inmune contra Influenza Aviar

que presenta el pasante: Francisco Alejandro Morales Reyes
con número de cuenta: 09755039-7 para obtener el título de:
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 28 de JUNIO de 2004

PRESIDENTE M.V.Z. José E. Rojo Islas

VOCAL M.V.Z. Raúl Antonio Sánchez Cruz

SECRETARIO M.V.Z. Juan Manuel Cuevas Jiménez

PRIMER SUPLENTE M.V.Z. Ignacio A. Quintero Moreno

SEGUNDO SUPLENTE M.V.Z. [illegible]

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por haberme dado la vida y permitirme llegar hasta este momento y por haberme dado a estos padres y familiares que tengo.

A mis Padres:

Carolina García y Jesús Morales por todos los sacrificios y esfuerzos que hicieron para poder darme una educación y una carrera; a ellos por haberme apoyado con sus consejos y en todo memento; este trabajo no solo es mío sino de ellos sino que es un premio a su esfuerzo realizado.

GRACIAS

A mis Hermanos:

Felipe y Abraham por ser los mejores hermanos y amigos que tengo; por darme consejos cuando los he necesitado.

AGRADECIMIENTOS

A la MVZ Lilia Barro y a la MVZ Blanca Bautista las cuales por medio de los laboratorios donde trabajan proporcionaron parte del material del trabajo; permitiéndome trabajar con ellos.

Al MVZ Diodoro Batalla director de los laboratorios CENASA el cual permitió la realización de este proyecto en el centro y a la MVZ Marcela Mercado subdirectora del área de Patología y Diagnóstico por su apoyo.

Al personal técnico del área de virología la bióloga Margarita, al MVZ Raúl, a las técnicas Rosa María , Elfida, Esther, Lidia y demás personas por haberme ayudado en mi capacitación que realice durante la realización del servicio social y sobretodo por algo que no se puede comprar con nada y que ellos me dieron que fue su AMISTAD.

ÍNDICE

Agradecimientos 1
Titulo 1
Resumen 1
Introducción 2
  Definición de Influenza Aviar 2
  Nombre Oficial 2
  Sinonimias de la Enfermedad 2
  Antecedentes Históricos 3
  Distribución Geográfica 4
  Situación Nacional 5
  Especies Susceptibles 6
  Etiología (morfología, antígenos y serotipos) 7
  Nomenclatura 9
  Resistencia a la acción física y química 9
  Datos Clínicos (periodo de incubación, curso, morbilidad y letalidad) 9
  Cuadro Clínico (síndrome = signos * síntomas, cuadro clásico y cuadro atípico) 10
  Patología 11
    Lesiones macroscópicas 11
    Lesiones microscópicas 12
  Diagnóstico clínico 12
  Diagnóstico de laboratorio 13
  Diagnóstico diferencial 15
  Transmisión (mecanismos y reservorios) 15
  Prevención y control de la enfermedad 16
  Vacunas 18
  Problemas de salud publica 18
  Importancia del diagnóstico serológico 19
  Generalidades de la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación 20
  Generalidades de la prueba de Precipitación en Agar Gel 20
  Generalidades de la prueba ELISA 21
Objetivos 22
Hipótesis 22
Justificación 22
Material y Métodos 23
  Material 23
  Método 24
Resultados 28
Discusión 36
Conclusiones 38
Bibliografía 39

Anexos

Fig. 1 Situación del país desde 1995 hasta el 2004 6
Fig. 2 Estructura del virus de Influenza Aviar 7
Cuadro no. 1 Situación Actual de Influenza Aviar en México 5
Cuadro no. 2 Sueros Controles Positivos 28
Cuadro no. 3 Sueros Controles Negativos 28
Cuadro no. 4 Sueros Experimentales 32
Tabla no. 1 Sensibilidad y Especificidad de la Prueba de ELISA estableciendo una tabla de 2X2 en casos controles 29
Tabla no.2 Sensibilidad y Especificidad de la Prueba de PAG estableciendo una tabla de 2X2 en casos controles 30
Tabla no.3 Sensibilidad y Especificidad de la Prueba de ELISA estableciendo una tabla de 2X2 en casos experimentales 32
Tabla no.4 Sensibilidad y Especificidad de la Prueba de PAG estableciendo una tabla de 2X2 en casos experimentales 33
Tabla no.5 Valores de Concordancia 35

ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES PRUEBAS SEROLÓGICAS: INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN, ELISA Y PRECIPITACIÓN EN AGAR GEL, PARA LA DETECCIÓN DE RESPUESTA INMUNE CONTRA INFLUENZA AVIAR

RESUMEN

La enfermedad de Influenza Aviar es causada por un virus de la familia *Orthomixoviridae*, existiendo la de alta patogenicidad que llega a ocasionar una mortalidad hasta del 100% y la de baja patogenicidad la cual llega a causar una mortalidad baja de las aves infectadas, además de causar estragos económicos en la región donde se presenta un brote y una de las formas de poder prevenir o mantener zonas libres o en erradicación es un constante monitoreo a través de la detección de anticuerpos por medios serológicos dado por las pruebas de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI), ELISA y Precipitación en Agar Gel (PAG)

En el presente trabajo se analizaron 688 sueros por las pruebas de Inhibición de la Hemoaglutinación, ELISA y Precipitación en Agar Gel para determinar la sensibilidad y especificidad para de esta forma poder establecer una comparación y correlación entre estas pruebas; donde se considera como prueba tamiz o de oro a la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación.

Los resultados obtenidos nos indican que la prueba de ELISA tiene una sensibilidad del 86%, una especificidad del 93% y una correlación del 52%, la prueba de PAG nos da una sensibilidad del 45%, una especificidad del 96% y una concordancia del 13%; lo que nos da a notar que es más sensible la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación que ELISA; pero que ELISA es más sensible que Precipitación en Agar Gel.

Lo observado en este estudio dio la pauta para poder establecer que la primer prueba de elección para la detección de Influenza Aviar es la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación, seguida de la prueba de ELISA y que la prueba de Precipitación en Agar Gel nos serviría en casos extremos donde las dos primeras no se tengan.

INTRODUCCIÓN

Definición de Influenza Aviar

La influenza aviar es una enfermedad viral que afecta el sistema respiratorio, digestivo y/o nervioso de mucha especies de aves. Es una infección que puede ocurrir en la mayoria, si no en todas, las especies de aves domésticas y de vida libre. Estos virus varian ampliamente en su habilidad de causar enfermedad, por ir de una infección asintomática apacible a una aguda fatal y su habilidad de extenderse entre las aves. Las especies de aves de vida libre normalmente no desarrollan la enfermedad clínica, pero algunos virus de la influenza causan enfermedad severa o muerte en los pollos, pavos y aves de guinea. (17)

Es una enfermedad que esta dentro de la lista A de la Organización Internacional de Epizootias (OIE) para las medidas de control de emergencia de la enfermedad en casos de que se de un brote. (25)

Nombre Oficial

En el primer simposio internacional de Influenza Aviar se eliminó el término de "Peste Aviar" quedando nota como referencia histórica, quedan los criterios para definir a los virus de Influenza Aviar y se sugirió que cualquier virus de Influenza Aviar, independientemente de su designación hemoaglutinante que tenga caracteristicas de alta o baja virulencia en el laboratorio se designe virus de Influenza Aviar Altamente Patógeno (IAAP) o virus de Influenza Aviar de Baja Patogenicidad (IABP). (9,11,23,26,34,42)

Sinonimias de la Enfermedad

A esta enfermedad se le reconocen una gran variedad de sinonimias entre las cuales están:

- IA. (6,9,11,26,28,34)
- Peste aviar. (1)
- Plaga de las aves. (11,28,34)
- Gripe de los pollos (6, 28)

Antecedentes Históricos

- 1878 El italiano Perroncito descubre una enfermedad en pollos que no era causada por una bacteria y le denomina peste aviar. (5,9,11,17,34)
- 1901 Centanni y Savunozzi confirman que el padecimientos causado por un agente filtrable (virus). (32,34)
- 1924, 1925, 1929 Brote de Influenza Aviar altamente patógena en Estados Unidos (17)
- 1934 Propagación del virus en embriones de pollo. (34)
- 1955 Queda plenamente demostrado que la peste aviar es causada por un virus de Influenza tipo A. (5,7,9,34)
- 1957 Pandemia de gripe asiática. (34)
- 1959 Se encuentra por primera vez el virus H5 muy virulento en pollos (16)
- 1960 Influenza Aviar produjo pérdidas severas en pavos en Estados Unidos (16)
- 1971 Aislamiento del virus apatógeno del subtipo H7 en Oregon y se propuso el sistema de nomenclatura. (9,26,34)
- 1975 Brote en pollos en Alabama y Minnesota. (9,11)
- 1978 Epizootia en Minnesota. (6,34)
- 1981 Primer Simposio Internacional sobre Influenza Aviar. (23,34)
- 1983 Un virus H5 altamente virulento causó un severo brote en pollos, guajolotes y gallinas de Guinea en Pennsylvania, Estados Unidos. (5,7,9,11,17,23,25,42)
- 1984 Presencia de Influenza Aviar en Estados Unidos. (17,23,25,42)
- 1985 Brote de Influenza Aviar en pollos en Australia. (6)
- 1986 Segundo Simposio Internacional sobre Influenza Aviar. (34)
- 1992 Se da el Tercer Simposio Internacional sobre Influenza Aviar. (17,34,42)
- 1994 Brote de Influenza Aviar de baja patogenicidad en gallinas reproductoras en Pakistán y aislamiento en ponedoras en Puebla. (17,34)
- 1995 Aislamiento del subtipo H5N2 en ponedoras en Querétaro y Tehuacan de alta patogenicidad. (34)

- 1996 La Oficina Internacional de Epizootias (OIE) adopta las normas para clasificar los virus de Influenza Aviar de alta patogenicidad. Se da un brote de Influenza Aviar en Lancaster y condados del Líbano. (17,34)
- 1997 Cuarto Simposio Internacional sobre Influenza Aviar. Primera infección documentada en humanos con virus de Influenza Aviar ocurrido en Hong Kong y epidemia en pollos con el subtipo H5N1. (7,34,42)
- 1998 Brote de Influenza en Italia. (7)
- 1999-2001 Epidemias en Italia del subtipo H7N1. (42)
- 2002 Presencia de Influenza Aviar en Chile. (7)
- 2003 Brote del subtipo H5N1 en Hong Kong y erupción del subtipo H7N7 en Países Bajos y Bélgica. (7,25,42)
- 2004 Presencia de H5N1 de Influenza Aviar en humanos en el norte de Vietnam. (42)

Distribución Geográfica

Los virus de baja patogenicidad o de alta patogenicidad están presentes en todo el mundo. (1,25) Los virus de alta patogenicidad se han reportado en:

- África del sur. (11)
- Australia. (28)
- Bélgica. (25)
- Camboya. (7)
- Canadá. (32)
- Chile. (25)
- China. (7)
- Corea del sur. (7)
- Escosia. (11)
- Estados Unidos. (28)
- Francia. (17)
- Holanda. (42)
- Hong Kong. (7)
- Hungría. (1)
- Indonesia. (7)
- Inglaterra. (28)
- Irlanda. (28)
- Norte de Italia. (42)
- Japón. (7)
- Laos. (7)
- México. (28)
- Países Bajos. (25)
- Pakistán. (5)
- Thailandia. (7)
- Taiwán. (7)
- Vietnam. (7)

Situación Nacional

El objetivo de la Campaña Nacional contra la Influenza Aviar es la erradicación, prevención y control de la enfermedad en aves comerciales, de traspatio, de programas sociales, silvestres, canoras y de ornato en cautiverio, así como de aves de combate y avestruces, en el territorio nacional. Además la principal estrategia es la prevención de la introducción y diseminación de la Influenza Aviar de aves originadas o procedentes de regiones o países con la enfermedad, mediante el establecimiento de estrictos requisitos de importación. (36)

El país en este momento se encuentra dividido en 2 zonas, la zona libre que comprende 14 estados y la zona en proceso de erradicación que comprende 18 estados, los cuales se muestran en el cuadro no. 1; y en la fig.1 nos muestra el año en que se erradico la enfermedad de los diferentes estados.

Cuadro no.1 **Situación Actual de Influenza Aviar en México**(36)

ESTADOS LIBRES		ESTADOS EN PROCESO DE ERRADICACIÓN	
BAJA CALIFORNIA	NAYARIT	AGUASCALIENTES	MORELOS
BAJA CALIFORNIA SUR	NUEVO LEÓN	CHIAPAS	PUEBLA
CAMPECHE	QUINTANA ROO	DISTRITO FEDERAL	QUERÉTARO
COAHUILA	SINALOA	GUANAJUATO	SAN LUIS POTOSÍ
COLIMA	SONORA	GUERRERO	TABASCO
CHIHUAHUA	TAMAULIPAS	HIDALGO	TLAXCALA
DURANGO	YUCATÁN	JALISCO	VERACRUZ
		MÉXICO	ZACATECAS
		MICHOACÁN	

Fig. 1 **Situación del país desde 1995 al 2004** (36)

Especies Susceptibles

Todas las aves, cerdos caballos, visones, focas, ballenas y los humanos comparten el tipo común A del virus de la influenza. (3,5,28,34) Se piensa que todas las aves son susceptibles a la infección con influenza, aunque algunas especies son más resistentes a la infección que otras. (42)

Entre las aves afectadas se encuentran los pollos, pavos, patos, gallinas de Guinea, gansos domésticos, codornices, faisanes, perdices, estorninos asiáticos, paseritas, aves de playa, aves marinas, aves corredoras (avestruces, emúes, ñandúes), aves silvestres (patos, gansos, tringas, crocentias, voltea piedras, golondrinas de mar, cisnes, meahucas, garzas, alcas, frailecillos, gaviotas y halcones), aves de ornato y canoras (mirlos, periquitos australianos, pericos cacatúas, pinzones, tejedores y comunes), estorninos y palomas. (1,5,6,7,9,11,17,25,32,40)

Las aves acuáticas y silvestres constituyen el reservorio de los virus de baja patogenicidad. (10,36)

Etiología (morfología, antígenos y serotipos)

El agente causal de la enfermedad es un virus perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*, del genero Influenzavirus A, con genoma RNA en sentido negativo que puede ser filamentoso; son de tamaño mediano de 80-120 nm de diámetro, esféricos con simetría helicoidal. (1,3,5,6,7,9,10,11,14,17,24,25,28,32,34,37,40)

La superficie está cubierta con espigas o proyecciones especializadas con dos formas distintas las cuales son las hemaglutininas y las neuraminidasas. (6)

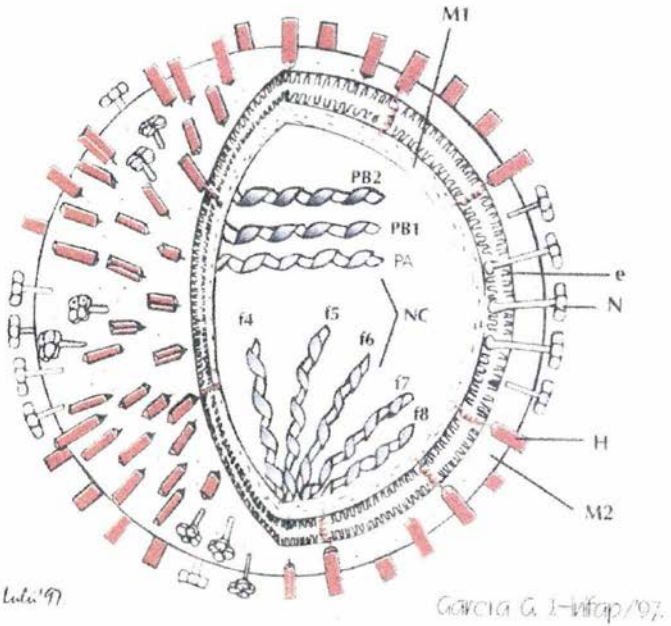

Fig. 2 **Estructura del virus de Influenza** (34)

Es un virión lisado, con envoltura lipídica, en el interior se encuentra la nucleocápside (NC), formada de ocho segmentos de RNA de cadena sencilla con sentido negativo, cubiertos de proteínas. Los tres fragmentos de RNA sintetizan enzimas indispensables en los procesos de replicación del virus, conocidas como polimerasas PB2, PB1 y PA. Los fragmentos en forma de abanico generan diversas proteínas virales, algunas de ellas estructurales. El fragmento cuatro (f4) genera la hemaglutinina, el fragmento cinco (f5) a la nucleoproteína, el fragmento seis (f6) a la neuraminidasa, el fragmento siete (f7) a la proteína de matriz (M1) y la proteína M2 y el fragmento ocho (f8) a dos proteínas no estructurales. En la envoltura se encuentran ancladas dos glicoproteínas en forma de espículas externas, la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N) en forma de parches, así como algunos poros formados de proteína M2. Debajo de la envoltura se encuentra la proteína M1 que le brinda cierta rigidez a la partícula. (3,6,7,20,25,34,40)

Los antígenos de tipo específico de los virus de influenza son categorizados como A, B y C. Esta designación de los tipos está basada en el carácter antigénico de la proteína M1 (matriz) que recubre el virus y la nucleoproteína que está dentro de éste, las cuales están íntimamente asociados con el RNA. (5,9,23,25,32)

La glicoproteína que está sobre el virus nos da la pauta para la subdivisión dándonos los antígenos de superficie que son las hemaglutininas (HA) y las neuraminidasas (NA). (17,28,32,37) La hemaglutinina es trimerita de forma triangular y la neuraminidasa es tetramerita en forma de hongo. (20)

La hemaglutinina su nombre deriva del papel en la aglutinación de glóbulos rojo y es causante de la fijación del virión a los receptores de la superficie celular (inician la infección); la neuraminidasa se le da este nombre por su acción en el ácido neuramínico en los receptores y está libera nuevos virus de la célula (facilitan la descarga de virus en la célula). (6,20,37)

Se reconocen en la actualidad 15 subtipos de HA y 9 subtipos de NA, las cuales se han identificado en varias combinaciones en aislamientos aviares. Los subtipos altamente virulentos para pollos de engorda y gallinas de postura son el H5 y H7; sin embargo, no todos los subtipos son patógenos. (5,6,7,17,20,23,28,32,34,37,40,42)

Nomenclatura

Se categorizan los virus de influenza en los tipos A, B o C en base al antígeno de su nucleoproteína y proteína M1. La influenza A se subdivide a subtipos en base a las diferencias del antígeno HA y NA. Los sistemas de nomenclatura recomendados por la OMS incluyen el tipo del virus, abreviatura en idioma inglés del huésped de origen, el origen geográfico, número de cepa (si existe), año de aislamiento y finalmente la descripción del antígeno de HA y NA que van entre paréntesis; ejemplo A/Ck/Pue/14585-622/94 (H5N2). (20,34)

Resistencia a la acción física y química

Los virus de influenza A son virus con envoltura, y por tanto, son relativamente sensibles a la inactivación por solventes de lípidos, tales como detergentes. La infectividad se destruye rápidamente con formalina, β propiolactona, agentes oxidantes, ácidos diluidos, éter, desoxilato de sodio, hidroxilamina, dodecilsulfato de sodio, iones de amonio, amoniaco, desinfectantes fenólicos o hipoclorito de sodio y compuestos de yodo. (1,6,7,25,29,34,37)

Son relativamente estables a pH 7-8 pero son inestables en el rango del pH ácido, algunos sobreviven por 6 horas a 56°C. (1,7,25,40)

En condiciones de campo las partículas virales en las heces se pueden destruir enterrándolas o humedeciéndolas y cubriéndolas con plástico, a fin de elevar la temperatura interior en ellas hasta 56°C durante 24 horas. (34)

Puede sobrevivir 4 días en agua a 22°C y sobre 30 días a 0°C; pero puede inactivarse por calor y por desecado. (7,25,34)

Datos Clínicos (periodo de incubación, curso, morbilidad y letalidad)

El periodo de incubación varía desde unas cuantas horas hasta 3-7 días en aves individuales y hasta 14 días en la parvada; se dice que el periodo de incubación en la influenza aviar de alta patogenicidad es de 21 días. (1,5,6,8,9,11,25,28,32,34,40) Este periodo de incubación depende de la dosis del virus, la vía de exposición, especie expuesta, la edad de las aves y el medio ambiente. (5,6,9,11,28,34)

Las infecciones entre aves domésticas o confinadas se han vinculado con una diversidad de síndromes patológicos y que van desde una enfermedad subclínica o respiratoria superior leve a la perdida de producción de huevo, a la enfermedad generalizada aguda, muy contagiosa fatal que produce las epidemias severas. (6,42) Las aves de vuelo libre no experimentan típicamente problemas significativos de enfermedad a causa de virus de influenza. (6)

La patogenia de la enfermedad no está totalmente esclarecida. Se sabe que es diferente a la de los mamíferos ya que los virus se replican en el tracto intestinal así como en el respiratorio. En infecciones con cepas virulentas de influenza ocurre viremia, la cual deriva en una infección generalizada. La influenza es frecuentemente complicada por infecciones bacterianas o virales oportunistas. (28)

Los índices de morbilidad y mortalidad son tan variables como los signos y dependen de la especie y el virus, así como de la edad, ambiente e infecciones concurrentes. Lo observado es una alta morbilidad y una baja mortalidad en un virus de baja patogenicidad; por otra parte, en el caso de virus de alta patogenicidad la morbilidad y la mortalidad pueden alcanzar hasta el 100%. (5,6,14,34)

Cuadro Clínico (síndrome = signos, cuadro clásico y cuadro atípico)

Los signos de enfermedad son extremadamente variables, pueden ser evidentes los respiratorios, entéricos, los del sistema nervioso o reproductivos, y pueden variar con el virus, la especie, la edad, sexo, infecciones intercurrentes, ambiente y estado inmunitario del huésped. (3,6,28,34)

Los signos que se dan con mayor frecuencia comprenden notablemente depresión, disminución de la actividad locomotriz, baja la ingestión de alimentos, emaciación, sed excesiva, aumento de cloquera en las gallinas y baja de la producción de huevo; signos respiratorios de grado leve a intenso que comprenden tos, estornudos, estertores y lagrimeo excesivo; acurrucamiento, plumas erizadas, edema de la cabeza, y cara; cianosis de la piel donde no se encuentran plumas, trastornos nerviosos como pueden ser tortícolis y ataxia y diarrea la cual al principio es acuosa, de color verde brillante pasando a ser totalmente blanca. (3,5,6,7,9,11,14,17,25,28,32,34,40) Los huevos puestos después de iniciado un

brote están frecuentemente sin cascaron. La muerte puede ocurrir dentro de las primeras 24-48 horas después de presentada la enfermedad. (5,7,9,11)

En las aves silvestres, las infecciones han sido generalmente inaparentes sin presentación de síntomas de la enfermedad. (5,17,34) En algunos casos la enfermedad es rápidamente fulminante y solo se encuentra a las aves muertas sin signos previos. (3,6,17,28,32)

Cada uno de estos síntomas puede presentarse por sí solo o en muy diferentes combinaciones. (7,25)

Patología

Lesiones macroscópicas

Las lesiones leves se pueden observar en los senos, caracterizadas como inflamación catarral, fibrinosa, serofibrinosa, mucopurulenta o caseosa. Puede haber edema de la mucosa traqueal con un exudado que varía de seroso a caseoso, puede también haber hasta hemorragias como en laringotraqueitis infecciosa. Los sacos aéreos pueden estar engrosados y pueden tener un exudado fibrinoso o caseoso. Puede observarse peritonitis catarral a fibrinosa y "peritonitis por huevo". La enteritis catarral o fibrinosa se puede manifestar en el ciego o intestino o ambos sitios. Pueden encontrarse exudados en el oviducto de aves ponedoras. Es también común encontrar hemorragias petequiales en la parte interna de la quilla, también petequias en la grasa abdominal, superficies serosas y peritoneo. Los riñones se encuentran muy congestionados y en ocasiones los túbulos están obstruidos con depósitos blancos de uratos. La mucosa de la molleja se desprende fácilmente y frecuentemente se observan erosiones y hemorragias debajo de esta área. La mucosa intestinal puede tener áreas hemorrágicas principalmente en los nódulos linfáticos, así como en las tonsilas cecales. (1,5,6,7,9,11,17,25,32,34,40)

Se han descrito lesiones en los casos de virus altamente patógenos, los cuales consisten en cambios congestivos y necróticos. Inicialmente, estos cambios consisten en: edema de la cabeza con hinchazón de senos, barbillas y crestas cianóticas, congestionadas y hemorrágicas; congestión y hemorragia en las piernas y tarsos; focos necróticos en hígado bazo, riñones y pulmones. (6,28) Edema periorbitario, hemorragias petequiales en particular en la superficie mucosa del proventrículo cerca de la unión con el ventrículo, en

el páncreas manchas amarillo brillantes y áreas rojo obscuras a todo lo largo. Necrosis severa del tejido linfoide, apariencia moteada del bazo. (5,6,25,28,34)

Las aves que mueren en forma sobreaguda presentan únicamente deshidratación y severa congestión de la musculatura o no llegan a desarrollar ninguna lesión evidente. (5,6,7,9,11,34,40)

Lesiones microscópicas

En los pollos las lesiones que se han observado son edema, hiperemia, hemorragias y focos de infiltrado linfocitario perivascular, principalmente en el miocardio, bazo, pulmones, encéfalo, barbillas y en menor grado en hígado y riñón. (6,28) Degeneración y necrosis parenquimatosa en el bazo, hígado y riñón. (6,9,11,32)

Lesiones encefálicas comprenden focos de necrosis, necrosis de neuronas, infiltrado linfocitario perivasculares, gliosis, proliferación vascular y alteraciones neurales. (6,11,28) Focos de necrosis e infiltración linfoide en ojos, músculos oculares, cresta y músculo esquelético; miocarditis intensa con áreas focales de músculo necrótico y depresión de los centros linfoides. (5,7,28,34)

En pavos hay pancreatitis con necrosis extensa de células acinosas; alteraciones degenerativas y necróticas en hígado, encéfalo y meninges; miocardio y tejido cutáneo. Encefalitis difusa no supurativa y miositis necrótica en los músculos esqueléticos. (6,28)

Diagnóstico clínico

En el diagnóstico de campo se sospecha en cualquier parvada cuando las muertes son repentinas y sigue una depresión severa, inapetencia y baja drástica de la producción de huevo. La presencia de edema en la cabeza, cresta y las barbillas inflamadas y cianóticas con hemorragias petequiales indican la posibilidad de que la enfermedad la esté causando un virus de Influenza Aviar. (1,5,9,11,26)

La realización de necropsias de rutina, tomando muestras de sangre y de órganos que se encuentran involucrados en la enfermedad. Las muestras para el laboratorio deberán acompañarse de la historia clínica y descripción de las lesiones observadas a la necropsia, incluyendo información de nuevas adquisiciones en la parvada, además de informar si ya antes habían tenido problemas con la enfermedad. (3,7,9,11,19)

El diagnóstico definitivo es dependiente del aislamiento o identificación del virus, ya que los signos clínicos pueden variar dramáticamente, por lo que el diagnóstico clínico es considerado presuntivo. (28,34,40)

Diagnóstico de laboratorio

Las pruebas para apoyar el diagnóstico son el aislamiento en embrión de pollo, el cual se comprueba la replicación viral mediante la prueba de hemoaglutinación; una vez aislado e identificado el virus se prosigue a clasificar su subtipo y determinar su patogenicidad. Para la detección de anticuerpos en las aves se utilizan las pruebas serológicas. Las muestras requeridas para el aislamiento viral son: (7,9,11,26,32)

- aves enfermas o muertas
- pulmones
- sacos aéreos
- tráquea
- cerebro
- páncreas
- bazo
- hisopos cloacales
- hisopos traqueales

y las muestras requeridas para realizar serología son: (7,9,11,26,32)

- suero
- papel filtro impregnado con sangre
- huevo fértil

Aislamiento viral

El aislamiento se realiza en embrión de pollo de 9-11 días de edad libres de agentes patógenos, inoculados vía cavidad alantoidea con 0.2ml de la muestra. (1,5,6,7,9,11,17,19,26,28,32,33,34,37,38,40) La replicación viral se comprueba por medio de la actividad hemoaglutinante sobre eritrocitos de pollo. (9,11,26,33,38,40)

Identificación

Para la identificación del agente causal se puede correr cualquiera de estas pruebas:

- Inhibición de la Hemoaglutinación (1,11,14,23,33,34,38,40)
- Inmunodifusión en agar gel (1,11,14,23,33,34,38,40)
- Inmunodifusión doble (1,11,14,23,33,34,38,40)
- Inmunohistoquímica (1,11,14,23,33,34,38,40)
- Tinción de inmunoperoxidasa (1,11,14,23,32,33,34,38,40)
- RT-PCR (1,5,7,23)

Un método directo es observar al *Orthomyxovirus* a través del microscopio electrónico. (33) Un diagnóstico rápido se da por inmunofluorescencia y ELISA. (23)

Clasificación del subtipo

El subtipo se puede identificar mediante:

- Inhibición de la Hemoaglutinación (9,11,19,24,33,38,40)
- Inhibición de la Neuraminidasa (9,11,19,24,33,38,40)
- Determinación de los aminoácidos de la hemaglutinina (9,1119,38,40)
- RT-PCR (19,33,38,40)

Determinación de la patogenicidad

La patogenicidad del virus de influenza se puede estimar mediante las pruebas siguientes:

- Inoculación intravenosa de pollo de 4-8 semanas de edad o cultivos celulares primarios en mono capa de fibroblastos de embrión de pollo, o en cultivo celular VERO, NDBK sin tripsina. (1,32)

Serología

De las pruebas serológicas empleadas están:

- Inhibición de la hemoaglutinación (6,9,11,19,26,33,34,37,38,40)
- Hemoaglutinación (6,9,11,19,26,33,34,38,40)
- Inmunodifusión en agar gel (6,9,11,19,26,33,34,37,38,40)

- Hemólisis radial simple (3,25)
- Neutralización viral (1,7)
- Fijación del complemento (3,25)
- ELISA (1,3,7,25)

El diagnóstico a través de la histopatología no es selectivo, donde las lesiones de esta enfermedad no son patognomónicas. (19)

Diagnóstico diferencial

La enfermedad de influenza aviar puede ser fácilmente confundida con las enfermedades de Newcastle; clamidiasis, micoplasmosis, cólera aviar, erisipela, laringotraqueitis infecciosa, bronquitis infecciosa y colibacilosis. (1,5,6,7,9,11,17,19,25,26,32,33)

En casos de baja patogenicidad semejan cuadros clínicos causados por coriza infecciosa, pasterelosis o irritación por amoniaco. (7,19)

Transmisión (mecanismos y reservorios)

Las aves infectadas excretan virus de las vías respiratorias, conjuntival y heces; por tanto las formas probables de transmisión incluyen tanto contacto directo entre aves infectadas y susceptibles; como contacto indirecto, abarcando aerosoles o exposición a fomites contaminados con virus. También las aves infectadas excretan el virus en concentraciones elevadas en sus heces, la propagación se logra con facilidad mediante prácticamente cualquier material contaminado con material fecal, por ejemplo: aves y mamíferos; alimentos, agua, equipo, abastos, jaulas, ropa, vehículos de entrega, insectos, roedores, etc. De acuerdo con Dennis J. Alexander las fuentes de introducción primaria de la infección a las granjas avícolas son: otras especies de aves domésticas, aves exóticas en cautiverio, aves silvestres y finalmente otros animales; por lo tanto, los virus se transportan con facilidad a otras zonas por medio de personas y equipo compartido por servicios de apoyo, aves en jaulas en venta en mercados de subasta o en mercados de aves vivas. (1,3,5,6,7,9,15,17,25,28,32,34,42)

Hay una amplia evidencia de transmisión horizontal, pero poca evidencia de que los virus se puedan transmitir verticalmente. (6)

El virus se puede recuperar de la yema y albúmina de huevos puestos por gallinas en plenitud de la enfermedad; también se a recuperado del agua y material orgánico de lagos y estanques. (5,9,11,17) Los huevos rotos contaminados pueden infectar a los pollitos en la planta incubadora. (1,7,25)

La entrada del agente puede ser por vía oral, conjuntival o respiratoria. (7) Rutas experimentales para la infección incluyen administración en aerosol, intranasal, intrasinusal, intratraqueal, oral, conjuntival, intramuscular, intraperitoneal, sacos aéreos caudales, intravenoso, cloacal e intracraneana. (28)

Prevención y control de la enfermedad

Un aspecto crítico para lograr este objetivo de prevención y control es la educación de la industria avícola referente a como se introducen los virus, como se propagan y como pueden prevenirse estos sucesos. (6,11,26,34) La bioseguridad debe ser la primera línea de defensa. (5,6,34)

Los pasos más importantes para prevenir varios brotes de influenza altamente patógena son la prevención y el control de los brotes de influenza leves. (6,17) Se debe eliminar o reducir el contacto entre aves silvestres y domésticas; y evitar el tránsito humano. (1,5,9,11,34)

No debe haber contacto con aves recuperadas. (6,17) Cuando los brotes son causados por virus de baja o mediana patogenicidad, los esfuerzos se enfocan a contener el problema en su forma original; si el problema es causado por un virus altamente patógeno, el enfoque debe estar dirigido a la erradicación, para lo cual los procedimientos deben ser: la cuarentena, el sacrificio, la despoblación y la limpieza de las instalaciones; en los términos que indique la secretaría (SAGARPA). (9,11,17,26,34,42) La centinelización con aves susceptibles es necesaria en todas aquellas áreas donde se llevó a cabo la despoblación, limpieza y desinfección. (9) Las zonas en cuarentena son esenciales para evitar la diseminación del virus. La vigilancia e investigación epizootiológica pasiva con personal calificado, tanto en condiciones de campo como de laboratorio, es fundamental para la detección y contención de nuevos brotes; la cual consiste en la notificación , reporte

y denuncia de focos sospechosos y confirmados por el laboratorio. (10,11,15,23,25,26,34,42)

Se deben establecer cordones zoosanitarios; además de tener un control de movilización de aves y otros animales que puedan representar un riesgo para la avicultura. (11,26) La retención y disposición de aves, sus productos y subproductos, así como de productos biológicos, químicos, farmacéuticos, y alimentos, para uso en aves o consumo por éstas, que pueden ocasionar un brote de Influenza Aviar. (19) Así mismo se debe mantener anualmente actualizados los censos de granjas avícolas y predios de traspatio. (26)

También se deben realizar prácticas de saneamiento, desinfección, desinfestación, esterilización, el uso de germicidas y plaguicidas en animales, locales y transportes para evitar la transmisión de la enfermedad. (11,26)

Permitir solamente la entrada del personal esencial a la granja y controlar sus movimientos. No permitir la entrada a visitantes ocasionales. Proporcionar ropa apropiada y medios para limpieza y desinfección a todas las personas que entren a la granja. Evitar traspaso de alimento de granja a granja; además de practicar el método "todo dentro todo fuera" (1,9,11,26)

Se considera a la superficie geográfica que requiere una acción sanitaria que evita la difusión de la enfermedad según el estado de infección y por razones administrativas conviene dividir el área afectada en: área infectada o foco, zona de cuarentena o área perifocal y zona de protección o área tapón. (9,11) En casos internacionales se considera país libre de IAAP cuando consta que la enfermedad no se ha presentado en el mismo desde hace por lo menos 3 años. Este plazo se reducirá a 6 meses después de haberse sacrificado al último animal afectado para los países que apliquen el sacrificio sanitario, asociado o no a la vacunación contra IAAP. Se considera zona infectada de IAAP cuando esta infectada por IAAP hasta que hayan transcurrido 221 días por lo menos, desde la confirmación del último caso y la conclusión de las operaciones de sacrificio sanitario y desinfección; 6 meses desde el reestablecimiento clínico o la muerte del último animal afectado. (8)

Puede existir la inmunización, previa autorización expresa de la secretaría, para proteger y evitar la diseminación de la enfermedad. (5,11)

Vacunas

Hay varios tipos de vacunas disponibles que son:

- Vacunas inactivadas con coadyuvantes (aceite-emulsión); éstas pueden ser monoclonales o polivalentes, que son inactivadas con β propiolactona y emulsionadas con aceite mineral; se han aplicado en una gran variedad de especies, tienen la capacidad de proteger contra la mortalidad, morbilidad y baja de postura. Esta vacuna reduce la severidad de la enfermedad y la diseminación del virus en la situación de campo, pero el virus no se elimina de la población avícola. Además está vacuna es la utilizada en México en la zona de erradicación. (5,6,7,9,11,23,27,32,34)
- Vacunas con virus naturales atenuados; es más económico el uso de éstas vacunas preparadas con cepas de campo avirulentas o atenuadas, pero tienen la desventaja de que pueden originar la recombinación de diferentes cepas del virus con características indeseables. (5,7,11,23,26,32)
- Vacunas recombinantes de viruela aviar; en esta vacuna se aplica la ingeniería genética para aislar genes HA, en particular H5 y H7 y colocarlos en vectores virales como el virus de la viruela aviar, virus vaccini a, baculovirus y retrovirus. (5,6,7,32,34)

El inconveniente con el uso de la vacuna, es por el gran número de subtipos HA que provocan la enfermedad, debido a que no existe protección cruzada entre los diferente subtipos existentes del virus. (5,7,9,11,23,32)

Problemas de salud publica

Las aves son los hospedadores naturales de los virus de la influenza y los virus de la influenza que afectan a los humanos probablemente derivaron de los depósitos de aves. (37) la redistribución genética entre virus humanos y aviares pueden ser un mecanismo mediante el cual se originan nuevas cepas pandémicas humanas; donde los virus aviares pueden tener una función en los virus de influenza en personas al aportar genes a las cepas humanas. (5,6,7,11,42) También los virus que atacan a las aves y humanos circulan en el cerdo en periodos largos y posiblemente se transmiten a los humanos por esta ruta. (37)

En general no se produce transmisión directa de virus entre aves y seres humanos; hay evidencia sugestiva de que virus H1N1 presentes en cerdos y patos, pueden estar implicados en la transmisión entre especies, de tal modo que puede concebirse que una conexión porcina-aviar-humana tenga importancia en la salud pública. (6,42)

En los últimos años, se ha puesto en claro que virus de IAAP pueden infectar a los humanos. (7,32)

Importancia del diagnóstico serológico

Se utiliza para demostrar la presencia de anticuerpos a partir de los 7-10 días después de la infección viral; también para vigilancia rutinaria en aves individuales o en parvadas para la evidencia serológica de infección de Influenza Aviar, además es importante para el descubrimiento temprano y la vigilancia regular. (28,40)

Pruebas oficiales

El diagnostico serológico debe ser realizado mediante las pruebas de Inhibición de la Hemoaglutinación e Inmunodifusión en Gel de Agar según la norma. (26)

Pruebas comerciales

La prueba comercial es ELISA; esta es una prueba que se puede implementar en México, la cual es utilizada en los Estados Unidos de Norteamérica.

Si consideramos que los valores registrados por diversos autores y registrados en la literatura científica internacional nos comentan que:

- Sensibilidad: es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo; es decir, es la capacidad de un método para detectar positivos frente a una determinada enfermedad. (12,13)
- Especificidad: es la probabilidad de clasificar correctamente un individuo sano; es decir, es la capacidad de un método para diferenciar positivos de negativos en una determinada enfermedad. (12,13)

- Valor Predictivo Positivo: indica la proporción de los animales positivos a la prueba que están realmente infectados (I+) o la probabilidad de que un resultado positivo sea correcto.(12,139
- Valor Predictivo Negativo: es la probabilidad de que un resultado negativo sea correcto. (12,13)
- Prueba de Kappa: determina el grado de concordancia entre dos pruebas. (12,13)

Podríamos mencionar que las diversas pruebas serológicas no tendrán resultados homogéneos y por lo tanto es necesario tomar una prueba de referencia (prueba de oro o tamiz) para diferenciar lo títulos o valores encontrados en nuestros ensayos.

La prueba de oro es la prueba de referencia cuya aptitud para medir las características de otras pruebas a estudiadas ya se ha establecido con la práctica. (12)

Generalidades de la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (Prueba de oro)

La Inhibición de la Hemoaglutinación, es la interacción de anticuerpos específicos con la hemaglutinina homóloga del virus de influenza aviar evitando la aglutinación de los eritrocitos de pollo. La detección de anticuerpos contra el virus de influenza aviar en las aves, es un indicador confiable de que las aves han sido expuestas a antígenos propios del virus, ya sea mediante el proceso de infección natural o por medios artificiales a través de la vacunación. La técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación permite detectar la presencia anticuerpos contra el virus de influenza aviar en el suero de las aves expuestas y se debe realizar con 4 unidades hemoaglutinantes (4 UHA) del antígeno viral, utilizando exclusivamente las técnicas y los reactivos de diagnóstico autorizados por la secretaria (SAGAR). La sensibilidad es la detección de 0.005 proteínas µm/ml. (18,21,23,24,26,3,38,40)

Generalidades de la prueba de Precipitación en Agar Gel

La Precipitación en Agar Gel también conocida como inmunodifusión doble, es la migración concurrente de un antígeno y un anticuerpo a través de una matriz de gel de agar. Cuando el antígeno y el anticuerpo entran en contacto, se combinan formando una línea de precipitación visible entre los sitios donde se colocaron el antígeno y el suero. En la prueba

los sueros deben ser procesados sin diluir. En ésta prueba no se pueden trabajar muestras de sangre completa embebida en papel filtro. Es una prueba cualitativa y el resultado se expresa como positivo o negativo a la presencia de anticuerpos contra el virus de influenza aviar tipo A. La sensibilidad es la detección de 30 µm/ml. (18,22,23,2633,38,40)

Generalidades de la prueba ELISA

La prueba de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) o más conocida como ELISA, tiene variantes que son la prueba directa, la indirecta y la de sándwich o de captura. En la prueba de ELISA directa el antígeno se fija a una superficie, ya sea un contenedor de una placa de microtitulación o una partícula de plástico. Se aplica el material a analizar y se deja incubar, se agrega un anticuerpo específico que forma un complejo con los antígenos virales; después de eliminar por lavado el material no adherido, se añade un conjugado que se une a los complejos de los anticuerpos. El conjugado no unido se elimina con un lavado, y se agrega un sustrato enzimático. La lectura de las placas se hace a simple vista o con un colorímetro a la longitud de onda apropiada según el producto final coloreado; la cantidad de anticuerpos que contiene la muestra problema, se calcula a partir de la cantidad de producto coloreado que se forma mediante la medida de densidad óptica. El cambio de color resultante está directamente relacionado con la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra. Estos ensayos son rápidos, sencillos y fáciles de adaptar a analizadores automáticos, pero requieren de reactivos muy purificados. El uso de mAbr y antígenos recombinantes ha facilitado y ampliado sustancialmente las aplicaciones del método ELISA. Su sensibilidad es la detección de 0.0005 µm/ml. (16,18,29,30,31,33,35,37)

OBJETIVOS

1. Comparar tres pruebas serológicas (Inhibición de la Hemoaglutinación, ELISA y Precipitación en Agar Gel) para la detección de anticuerpos contra el virus de Influenza Aviar.
2. Indicar cuál de estas pruebas serológicas es más sensible y específica para la detección de Influenza Aviar.
3. Valorar un kit comercial de ELISA para la detección de Influenza Aviar.

HIPÓTESIS

La prueba serológica de Inhibición de la Hemoaglutinación es más específica y sensible que las pruebas de ELISA y de Precipitación en Agar Gel para detectar respuesta inmune contra el virus de Influenza Aviar, por lo tanto es más confiable para encontrar títulos mínimos de anticuerpos para esta enfermedad

JUSTIFICACIÓN

Las pruebas serológicas reúnen ciertas características de proceso que son necesarias para obtener resultados confiables. Sin embargo la tendencia moderna es facilitar y acelerar el mecanismo de diagnóstico a un nivel práctico y de aplicación inmediata.

Así que técnicas tradicionales han demostrado que a pesar de su elaboración compleja son necesarias para tomarlas de referencia para evaluar otros métodos de obtención de un diagnostico acertado. Por lo mismo el tomar una prueba comprobada como es la de Inhibición de la Hemoaglutinación como una prueba de referencia es sumamente útil para comparar otras pruebas aplicables para el diagnóstico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Sueros provenientes de 688 aves proporcionados por los laboratorios de Tehuacán Puebla (IASA) y el Centro Nacional de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA, Tecamac); los cuales se dividen de la siguiente manera; 50 sueros controles positivos, 184 sueros controles negativos y 454 sueros experimentales (provenientes de reproductoras vacunadas 10 y 40 semanas post vacunación, de aves infectadas a nivel de campo y de pollo de engorda vacunados).

Equipo e instrumentos

- Agitador para microplacas
- Lector para microplacas
- Contenedores para reactivos
- Jeringa de 10 ml
- Microplacas con fondo plano y en "U" de 96 pozos
- Puntas para micropipeta
- Micropipeta unicanal y multicanal
- Centrífuga refrigerada
- Toallas de papel
- Placa de vidrio de 5.6 x 27 cm
- Rejilla metálica
- Caja de plástico hermética (caja húmeda)
- Base plana con brújula de burbuja
- Sacabocados o dado perforador de gel con 6 pozos periféricos y un pozo central.
- Bomba de vacío
- Lámpara de observación de fondo oscuro
- Baño María
- Lector de placas para ELISA

Reactivos y material biológico

- Agua destilada
- Solución salina fosfatada (PBS)
- Solución de trabajo adicionada con 0.02% de albúmina sérica bovina
- Anticoagulante Alseaver
- Glóbulos rojos de ave
- Suero testigo positivo contra e subtipo H5N2 del virus de Influenza Aviar
- Antígeno viral (H5N2) inactivado
- Gel de agar al 1%
- Antígeno específico para el subtipo A
- Antisuero positivo especifico contra el virus de la Influenza Aviar tipo A
- Kit comercial de ELISA FlockChek* IA IDEXX para la detección de anticuerpos contra el virus de Influenza Aviar que incluye:
- Placas recubiertas con antígeno IA
- Control positivo IA-Anti IA de pollo diluido
- Control negativo-Suero de pollo diluido
- Conjugado anti-pollo (cabra)/anti.pavo (cabra): peroxidasa de rábano
- Diluyente para la muestra tampón
- Sustrato TMB (Sustrato cromógeno 3, 3', 5, 5' tetrametil benzodina)
- Solución de interrupción

Método

I. A todos los sueros se les correrán las pruebas de HI, ELISA y PAG

II. Realización de la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación según la Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar. (26)

III. Realización de la prueba de Precipitación en Agar Gel:

1. Disolver en Baño María el gel de agar.

2. Calibrar la base plana en donde se colocarán las placas de vidrio, de tal manera que la burbuja de la brújula quede centrada.
3. Colocar una placa de vidrio en la base plana.
4. Vaciar manualmente el gel de agar licuado sobre la superficie de la placa de vidrio.
5. Dejar gelificar a temperatura ambiente.
6. Utilizar una plantilla y perforar el gel de agar con el sacabocados.
7. Retirar el gel de cada uno de los orificios marcados, succionando con una punta de plástico conectada a la bomba de vacío.
8. Adicionar 25µl de cada uno de los sueros problema con la micropipeta unicanal en cada uno de los pocillos, de acuerdo a las manecillas del reloj, sin tomar en cuenta el pocillo superior y el central.
9. Agregar 25µl de antígeno específico en el pocillo central y 25µl de antísuero positivo en el pocillo superior.
10. Colocar la placa de vidrio en la rejilla metálica.
11. Colocar en el fondo de la cámara de humedad una toalla de papel humedecida con agua destilada.
12. introducir la rejilla metálica en la cámara de humedad, colocarle la tapa e incubar a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas, después de las cuales se efectúa la lectura. La lectura se realiza con la ayuda de la lámpara de fondo oscuro, para observar por contraste las bandas de precipitación.
13. En el caso de los positivos la línea de precipitación entre al antísuero específico (control +) y el antígeno se une a las bandas de los sueros problema formando una línea continua.
14. En el caso de los negativos únicamente se forma la línea de precipitación entre el antísuero específico (control +) y el antígeno correspondiente.

IV. Realización de la prueba de ELISA:

1. Dilución de la muestra 1:500.
2. Los reactivos deben dejarse equilibrar a temperatura ambiente y luego agitarse por inversión y con un movimiento circular.

3. Verter 100µl del control negativo en los pozos A1 y A2.
4. Verter 100µl del control positivo en los pozos A3 y A4.
5. Verter 100µl de la muestra diluida en los pozos correspondientes.
6. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Lavar los pozos de tres a cinco veces con unos 350µl de agua destilada.
8. Verter 100µl de conjugado anti-pollo/anti-pavo: peroxidasa de rábano a cada pozo.
9. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Repetir el paso 6.
11. Verter 100µl de la solución de substrato TMB en cada pozo.
12. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
13. Verter 100µl de solución de frenado en cada pozo para terminar la reacción.
14. Calibrar el lector en blanco con aire.
15. Medir y anotar los valores de absorbancia a 650 nm, A (650).

V. Colección y registro de los resultados obtenidos de las pruebas realizadas.

VI. El análisis se realizara tabulando; y los cuadros mostraran cualitativamente los resultados.

VII. Los resultados obtenidos en la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación serán tomados como de referencia o control que servirán para indicar comparativamente los resultados obtenidos en las otras dos pruebas. La lectura comparativa de los títulos de anticuerpos será tomando en cuenta lo siguiente:

a) Prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación positivos los que den desde un título 1:10
b) Prueba de Precipitación en Agar Gel positivos los que den líneas de precipitación clara y/o definida.
c) Prueba de ELISA positivos por medio de la medición en un lector y con escalas de referencia registrando los valores de absorbancia.

VIII. Los datos se analizaran por medio de un cuadro de dos por dos; sacando la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, y el valor de kappa, el cual nos indicara la concordancia que existe entre las pruebas.

IX. Los resultados nos ayudaran a valorar la utilidad del kit comercial (FlockChek* IA) para detectar cualitativamente la presencia de anticuerpos contra Influenza Aviar.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los sueros controles positivo (50 sueros) son 50 sueros positivos por prueba de HI, 6 sueros positivo y 44 negativos por prueba de PAG; y 26 positivos y 24 negativos por prueba de ELISA (cuadro no. 2).

En el caso de los controles negativos (184 sueros) los resultados obtenidos son 184 sueros negativos por prueba de HI y PAG; y 183 sueros negativos y un falso positivo por ELISA (cuadro no. 3).

En los sueros experimentales (454 sueros) los resultados obtenidos son los siguientes: 408 sueros positivos y 46 negativos por prueba de HI; 186 sueros positivos, 224 sueros falsos negativos, 44 sueros negativos y 2 falsos positivos por prueba de PAG; y 350 sueros positivos, 58 sueros falsos negativos, 43 negativos y 3 falsos positivos por ELISA (cuadro no. 4).

Cuadro no. 2 **Sueros Controles Positivos**

	HI	ELISA	PAG
Positivos	50	26	6
Falsos Negativos		24	44

Cuadro no. 3 **Sueros Controles Negativos**

	HI	ELISA	PAG
Negativos	184	183	184
Falsos Positivos		1	

Considerando los datos anteriores se estableció una tabla de 2X2 para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA en los sueros controles, los cuales se muestran en la tabla no. 1

Tabla no. 1 **Sensibilidad y Especificidad de la Prueba de ELISA estableciendo una tabla de 2X2 en casos controles**

		HI		
		Positivo	Negativo	
ELISA	Positivo	26 (A)	1 (B)	27 (A+B)
	Negativo	24 (C)	183 (D)	207 (C+D)
	Totales	50 (A+C)	184 (B+D)	234 (Total)

A = Verdaderos positivos

B = Falsos positivos

C = Falsos negativos

D = Verdaderos negativos

SENSIBILIDAD = (A/ (A+C)) X 100

(26/ (26+24)) X 100 = 52%

ESPECIFICIDAD = (D/ (D+B)) X 100

(183/ (183+1)) X 100 = 99%

VALOR PREDICTIVO POSITIVO =

(A/ (A+B)) X 100

(26/ (26+1)) X 100 = 96%

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO =

(D/ (D+C)) X 100

(183/ (183+24)) X 100 = 89%

Kappa = No. de acuerdos encontrados – No. de acuerdos por azar

100% - No. de acuerdos por azar

En donde:

No. de acuerdos encontrados = $\frac{A + D}{A + B + C + D}$

No. de acuerdos a azar = encontrados en A + encontrados en D

A + B + C + D

Encontrados en A = (A + B) X (A + C)

A + B + C + D

Encontrados en D = (C + D) X (B +D)

A + B + C +D

KAPPA = 0.63 de concordancia

Considerando los datos anteriores se estableció una tabla de 2X2 para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba de PAG en los sueros controles, los cuales se describen en la tabla no.2

Tabla no.2 **Sensibilidad y Especificidad de la Prueba de PAG estableciendo una tabla de 2X2 en casos controles**

		HI		
		Positivo	Negativo	
PAG	Positivo	6 (A)	0 (B)	6 (A+B)
	Negativo	44 (C)	184 (D)	228 (C+D)
	Totales	50 (A+C)	184 (B+D)	234 (Total)

A = Verdaderos positivos

B = Falsos positivos

C = Falsos negativos

D = Verdaderos negativos

SENSIBILIDAD = (A/ (A+C)) X 100

(6/ (6+44)) X 100 = 12%

ESPECIFICIDAD = (D/ (D+B)) X 100

(184/ (184+0)) X 100 = 100%

VALOR PREDICTIVO POSITIVO =

(A/ (A+B)) X 100

(6/ (6+0)) X 100 = 100%

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO =

(D/ (D+C)) X 100

(184/ (184+44)) X 100 = 81%

Kappa = No. de acuerdos encontrados – No. de acuerdos por azar

100% - No. de acuerdos por azar

En donde:

No. de acuerdos encontrados = $\frac{A + D}{A + B + C + D}$

No. de acuerdos a azar = encontrados en A + encontrados en D

A + B + C + D

Encontrados en A = $\frac{(A + B) \times (A + C)}{A + B + C + D}$

Encontrados en D = $\frac{(C + D) \times (B + D)}{A + B + C + D}$

KAPPA = 0.18 de concordancia

Cuadro no.4 **Sueros Experimentales**

	HI	ELISA	PAG
Positivo	408	350	184
Falsos Negativos		58	224
Negativo	46	43	44
Falsos Positivos		3	2

Considerando los datos anteriores se estableció una tabla de 2X2 para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA en los sueros experimentales, los cuales se describen en la tabla no.3

Tabla no.3 **Sensibilidad y Especificidad de la Prueba de ELISA estableciendo una tabla de 2X2 en casos experimentales**

		HI		
		Positivo	Negativo	
ELISA	Positivo	350 (A)	3 (B)	353 (A+B)
	Negativo	58 (C)	43 (D)	101 (C+D)
	Totales	408 (A+C)	46 (B+D)	454 (Total)

SENSIBILIDAD = (A/ (A+C)) X 100

(350/ (350+58)) X 100 = 86%

ESPECIFICIDAD = (D/ (D+B)) X 100

(43/ (43+3)) X 100 = 93%

VALOR PREDICTIVO POSITIVO =

(A/ (A+B)) X 100

(350/ (350+3)) X 100 = 99%

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO =

(D/ (D+C)) X 100

(43/ (43+58)) X 100 = 46%

Kappa = No. de acuerdos encontrados – No. de acuerdos por azar

100% - No. de acuerdos por azar

En donde:

No. de acuerdos encontrados = $\frac{A + D}{A + B + C + D}$

No. de acuerdos a azar = $\frac{\text{encontrados en A + encontrados en D}}{A + B + C + D}$

Encontrados en A = $\frac{(A + B) \times (A + C)}{A + B + C + D}$

Encontrados en D = $\frac{(C + D) \times (B + D)}{A + B + C + D}$

KAPPA = 0.52 de concordancia

Considerando los datos anteriores se estableció una tabla de 2X2 para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba de PAG en los sueros controles y experimentales, los cuales se describen en la tabla no.4

Tabla no.4 **Sensibilidad y Especificidad de la Prueba de PAG estableciendo una tabla de 2X2 en casos experimentales**

		HI		
		Positivo	Negativo	
PAG	Positivo	184 (A)	2 (B)	186 (A+B)
	Negativo	224 (C)	44 (D)	268 (C+D)
	Totales	408 (A+C)	46 (B+D)	454 (Total)

SENSIBILIDAD = (A/ (A+C)) X 100

(184/ (184+224)) X 100 = 45%

ESPECIFICIDAD = (D/ (D+B)) X 100

(44/ (44+2)) X 100 = 96%

VALOR PREDICTIVO POSITIVO =

(A/ (A+B)) X 100

(184/ (184+2)) X 100 = 99%

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO =

(D/ (D+C)) X 100

(184/ (184+224)) X 100 = 16%

Kappa = No. de acuerdos encontrados – No. de acuerdos por azar

100% - No. de acuerdos por azar

En donde:

No. de acuerdos encontrados = $\frac{A + D}{A + B + C + D}$

No. de acuerdos a azar = encontrados en A + encontrados en D

A + B + C + D

Encontrados en A = $\frac{(A + B) X (A + C)}{A + B + C + D}$

Encontrados en D = $\frac{(C + D) X (B + D)}{A + B + C + D}$

KAPPA = 0.13 de concordancia

Tabla no.5 **Valores de Concordancia** (12, 18)

Valor de Kappa	**Acuerdo**
Menos de 0	Ninguno
0.00-0.20	Minimo
0.21-0.40	Regular
0.41-0.60	Bueno
0.61-0.80	excelente
0.81-1.00	Casi perfecto

DISCUSIÓN

Las pruebas serológicas consideradas en este estudio muestran diferentes resultados a la efectividad de los ensayos, esto es debido a que la sensibilidad y especificidad para cada prueba son diferentes.

Por ejemplo la sensibilidad para la prueba de HI es la detección de 0.005 proteínas µm/ml, para la prueba de ELISA es de 0.0005 proteínas µm/ml y de la de PAG es de 30 proteínas µm/ml. (18)

Por lo tanto existen pruebas que son capaces de detectar cantidades más pequeñas de inmunoglobulinas y en esos casos los títulos de anticuerpos serían diferentes de acuerdo con la técnica empleada.

Los resultados obtenidos en las pruebas de Inhibición de la Hemoaglutinación (prueba de oro) fueron tomadas como unidades de referencia para comparar las evaluaciones logradas con las pruebas de ELISA y Precipitación en Agar Gel.

De acuerdo con los resultados mostrados podemos observar en primer lugar los cuadros controles donde el resultado de la prueba de HI concuerda con la prueba de ELISA en 62%; que nos dice la tabla no.5 que tienen una concordancia excelente; pero no con los datos obtenidos por los laboratorios IDEXX (14), donde se indica una concordancia del 98.6%; la sensibilidad obtenida es del 52%, la especificidad del 99%, donde la sensibilidad es baja; posiblemente esto sea debido a que nuestros sueros provinieron de un muestreo sérico a los 7 días y todavía los títulos de anticuerpos no estaban altos y que la gran mayoría de estos títulos registrados por HI van desde un título 1:10 hasta 1:80 y por lo tanto requirieran de títulos mayores para poder ser detectados por el kit comercial.

En el caso de la prueba de PAG frente a la prueba de HI tenemos una concordancia del 18% que nos indica la tabla no.5 que es mínima; también la sensibilidad la cual es del 12% es muy baja no siendo así la especificidad la cual es del 100%; esto podría llegar a ser porque esta prueba como dicen la literatura solo detecta a nivel de tipo.

En el caso de los resultados experimentales podemos observar que la prueba de HI tiene una concordancia del 53% con la prueba de ELISA lo que nos indica la tabla no.5 que es buena, la especificidad es del 93% y la sensibilidad del 86%, lo que demuestra que en

condiciones de campo la efectividad de esta prueba es mayor; concordando en gran parte con los resultados obtenidos por los laboratorios IDEXX.

En el caso de la prueba de PAG frente a la prueba HI tenemos una concordancia en los sueros experimentales del 13% que nos indica la tabla no.5 que es mínima; también la sensibilidad la cual es del 45% es muy baja no siendo así la especificidad la cual es del 96%; lo cual no indica que sigue siendo muy baja pero que al igual que ELISA resulta un poco más efectiva a nivel de campo.

Finalmente en el caso de los resultados obtenidos con las prueba de PAG se hace mención que estos ensayos fueron complementarios a análisis comparativo de las dos pruebas base, y se nota que los resultados son aun menores en los porcentajes de detección de positividad tanto para casos control como para experimentales y no se recomendaría utilizar la técnica para estudios de evaluación o comparación, teniendo una concordancia frente a la prueba de HI muy baja.

La sensibilidad y especificidad encontradas en la prueba de ELISA son más bajas en comparación con la prueba de HI lo que no concuerda con la literatura por ser bajas y esto pudo haber sido por títulos bajos que no detecto ELISA, manejo del Kit de ELISA, temperatura a la que se trabajo y a la diversidad antigénica que tiene ELISA.

Por lo tanto podemos concluir que en este caso los kits comerciales de ELISA para la detección de antígenos externos del virus de Influenza Aviar no son tan específicos como debieran ser y posiblemente fuera mejor tener kits con un rango restringido de serotipos para evitar lecturas falsas.

CONCLUSIONES

Por medio de este estudio se ha notado que la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación es más sensible y especifica que la prueba de ELISA y la prueba de Precipitación en Agar Gel; pero queda visto que la prueba de ELISA es más sensible que la prueba de Precipitación en Agar Gel.

Cabe mencionar que la prueba de ELISA no es muy sensible y especifica por contener 16 subtipos diferentes en el kit, lo cual en los casos de diagnosticar casos positivos se tendría que correr la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación para verificar que subtipo es el que se detecto por la prueba de ELISA, con el inconveniente que no hay antisueros específicos contra los demás subtipos que en este se detectan, por no encontrarse en México.

Entonces la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación queda como primera elección debido a su alta sensibilidad y especificidad; y la prueba de ELISA en un segundo término, con la excepción de cuando se trabajen gran cantidad de sueros provenientes de una misma parvada donde el tiempo seria un factor crítico.

En el caso de la prueba de PAG al ser una prueba que nos proporciona resultados menos confiables y por ser una prueba más laboriosa, solo se emplearía cuando las dos pruebas primarias (HI y ELISA) no estuvieran disponibles.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFÍA

1. A150-Influenza Aviar Altamente Patógena (peste aviar), http://www.oie.int/esp/maladies/fiches/e_a150.htm
2. Anda Vargas Margarita, 2003; Tesis: Implementación y validación de la prueba de microseroneutralización ligada a la enzima peroxidasa para detección de anticuerpos contra Fiebre Porcina Clásica y su comparación con dos pruebas inmunoenzimaticas (inmunoperoxidasa y ELISA); FES Iztacala.
3. Avian Influenza, http.www.avianbiotech.com/Diseases/influenza.htm
4. Avimex, Folleto de Vacuna oleosa contra la Influenza Aviar
5. C.W. Beard, D.V.M., USDA, ARS. Southeast Poultry Research Laboratory, Athens, GA. AVIAN INFLUENZA PART IV FOREIGN ANIMAL DISEASES. AVIAN INFLUENZA. (Fowl Plague), http://www.vet.uga.edu/vpp/gray_book/FAD/AVI.htm
6. Calnek B. W. 2000; Enfermedades de las Aves; 2ª edición, Editorial Manual Moderno. pp. 597-614
7. Center for Infectious Disease Research & Policy (CIDRAP) 2004 , Highly Pathogenic Avian Influenza (Fowl Plague), http://www.cidrap.umn.edu/ cidrap/ content/ biosecurity/ ag-biosec/ anim-disease/ avianflu.html; Academic Health Center -- University of Minnesota
8. Código Sanitario para los Animales Terrestres - 2003, Organización Internacional de Epizootias (OIE) http://www.oie.int/esp/normes/mcode/e_00043.htm
9. CPA, 1995; Manual de Procedimientos: Control y Erradicación de la Influenza Aviar Altamente Virulenta (IAAV) en México
10. D.E. Swayne & D.L. Suarez, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2000, 19 (2), Influenza aviar altamente patógena; http://www.oie.int/esp/publicat/rt/som
11. DINESA, SAGARPA; 1995, Influenza Aviar; Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal (CPA)
12. Diosdado Vargas Fernando, 2004; Curso de capacitación y actualización en el diagnóstico de Fiebre Porcina Clásica y Enfermedad de Aujeszky: Sensibilidad, especificidad y validación de pruebas.

13. Fernández S. Pita, Díaz S. Pértegas; 2003, Pruebas Diagnósticas; Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario-Universitario Juan Canalejo; A Coruña; http://.fiesta.com/mbe/investiga/pruebas_dignosticas/pruebas_diagnosticas.htm
14. IDEXX Poultry Diagostic Products, www.idexx.com/production/poultry/
15. Influenza aviar de baja patogenicidad en EE.UU.: Aclaración - 5 de diciembre de 2001, http://www.oie.int/esp/info/divers/es_usa051201.htm
16. Instructivo del kit FlockChek* IDEXX
17. J. P. Jacob, G.D. Butcher, F. B. Mather, and R.D. Miles, Avian Influenza in Poultry; University of Florida, Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences
18. Jacobson R., 1996; Validation of diagnostic assays for infectious disease in Office International of Epizooties (OIE), Manual Amendment.
19. Jane Meedes Lillian, 1995; Influenza Aviar en México: Estudio Recapitulación. UNAM
20. Lennete Edwin H., Smith Thomas F.1999, Laboratory Diagnosis of Viral Infections, Editorial Mercel Dekker. pp. 589-591
21. Manual de Calidad del Laboratorio CENASA, Procedimientos Técnicos
22. Manual de Calidad del Laboratorio IASA, Procedimientos Técnicos
23. PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA SUMMARY Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 4th edition, 2000 Manual of standards Diagnostic Tests and Vaccines 2000 PART 2 ..« ».. SECTION 2.1. ».. Chapter 2.1.14. ..« »» Contents ? - Index CHAPTER 2.1.14. HIGHLY
24. Martínez Rodríguez Alejandro, Aida Javier Antonieta; Manual de Prácticas de Virología Veterinaria; FES Cuautitlán UNAM, Sección de Microbiología.
25. McMullin Paul, Fowl Plague; Poultry Health Services, http://www.poultry-health.com/fora/fowlplag.htm
26. Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar

27. Norma Oficial Mexicana NOM-055-200-1995, Requisitos mínimos para la elaboración de vacunas emulsionadas inactivadas contra la Influenza Aviar subtipo H5N2
28. Padilla Noriega Roberto, 1997; Maestría en Ciencias Veterinarias, Influenza Aviar; Diagnóstico por PCR e Histopatología en aves infectadas experimentalmente
29. Parslow Tristram G:, Stitles Daniel P., Terr Abbal I., Imboden John B.,2002; Inmunología Básica; 10a edición, Editorial Manual Moderno. pp. 254-256
30. Pérez Rosales Víctor Manuel, mayo del 2004;Enfermedades Infecciosas I, Gpo. 1702; I, FES-Cuautitlán UNAM,.
31. Ponce Sánchez Eréndida y Gonzáles Cortes Ivonne, mayo del 2004; Enfermedades Infecciosas I, Gpo. 1702; FES-Cuautitlán UNAM.
32. Posted, Bangkok, 2004; Avian Influenza; http://www.aphca.org/paper/avian_influenza_article.html
33. Rose Noel R., Everly Conway de Macario, Folds James D., Clifford Lane, Nakamura Robert M; 1997, Manual of Clinical Laboratory Inmmunology; 5th Edition, Ed. American Society for Microbiology. pp.13-29
34. SAGAR, CONASA, 1997; La Influenza Aviar en México, Memorias
35. Schmitdt Nathalie J., Ph. D, Emmons Richard W., MD, 1989; Diagnostic Procedures for Viral Rickettsial and Chlamydial Infections, 6a edition, Editorial APHA. pp. 153-167
36. SENASICA, 2004; Campaña Nacional Contra la Influenza Aviar, Situación Actual; SAGARPA. http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/Doc463/
37. Specter Steven, Hodinka Ricard L., Young Stephen A. 2000, Clinical Virology Manual; 3a edition, Editorial ASM Press. pp. 93-101 y 236-239
38. Swayne David E., Glison Chairman John, Jackwood Mark W., Pearson James E., Reed Willine M.; 2002, A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 4th Edition; American Association of Avian Pathlogistic; Ed. Committee.
39. Swayne David E., Glisson John R., Jackwood Mark W., Pearson James E.; 2002, A Laboratory for the Isolation and Identification of Avian Pathogens; forth Edition, Editorial Committe.

40. Swayne David E., Senne Dennos A., Beard Charles W.; Isolation and Identification at Avian Pathogens. forth edition.

41. Wayne W., 1991, Bioestadistica: base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Noriega. pp. 25-35

42. WHO: Avian influenza - fact sheet, http://www.who.int/entity/csr/don/2004_01_15/en