



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“IDENTIFICACIÓN DEL GEN M MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL Y
FRECUENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA INFLUENZA A EN AVES
SILVESTRES ALBERGADAS EN DOS CENTROS DE REHABILITACIÓN DE
FAUNA EN EL ESTADO DE MÉXICO”.**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIO ZOOTECNISTA.**

PRESENTA:

ROCÍO DEL CARMEN LÓPEZ RAMÍREZ.

ASESOR:

M. EN MVZ. GERARDO LÓPEZ ISLAS.

COASESORES:

DRA. ELIZABETH LOZA RUBIO.

MVZ. FERNANDO CORTÉS VILLAVICENCIO.



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 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

**"IDENTIFICACIÓN DEL GEN M MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL Y FRECUENCIA DE ANTICUERPOS
CONTRA INFLUENZA A EN AVES SILVESTRES ALBERGADAS EN DOS CENTROS DE REHABILITACIÓN DE
FAUNA EN EL ESTADO DE MÉXICO."**

Que presenta el pasante: **ROCIO DEL CARMEN LÓPEZ RAMÍREZ**
Con número de cuenta: **30384101-0** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Mayo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.V.Z. Rodolfo Córdova Ponce	
VOCAL	M. en C. Ignacio Carlos Rangel Rodríguez	
SECRETARIO	M. en M.V.Z. Gerardo López Islas	
1er SUPLENTE	Dr. Hugo Ramírez Alvarez	
2do SUPLENTE	M.V.Z. Juan Omar Hernández Ramírez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/yrf

A Dios y a mis ángeles por estar a mi lado. Por la oportunidad de estar viva y seguir planteándome metas que deseo cumplir a lo largo de mi vida que beneficien a su vez la conservación de la fauna silvestre. Gracias por la paciencia y el apoyo para realizar y culminar este trabajo.

A mis padres Ignacio y Rocío, que siempre han estado a mi lado para alentarme a ponerle el doble de esfuerzo a las cosas que realizo, gracias por su apoyo, compañía y paciencia en este proyecto que hoy termino. A mis hermanos, Nacho y Marii que siempre se encargan de tener las palabras ideales para darme ánimo y motivarme para arriesgarme y cumplir metas, ustedes mi ejemplo.

A Edw, por su cariño, confianza, paciencia y apoyo que me has brindado desde el día que decidí realizar proyectos lejos de casa. A toda mi familia "L-R": Abue, a mis dos segundas madres* (Alicia y Monse), Elias, Sac, Mez, Citla, Nic, Dani, Lez, Alex, Alberto T. y los que me faltan... Incluyendo claro, a todos mis pequeños peludos que todos los días estuvieron muy cerca demostrándome su cariño. A René por sus buenos deseos y oraciones para que mi trabajo finalmente viera la "luz".

A la MVZ. Verónica Peña, a mis amigos de Chacahua, Oax., a los de la FES-C y al MVZ. Javier López por demostrarme su apoyo día a día.

A la Dra. Elizabeth Loza Rubio, Dra. Edith Rojas Anaya y a la M. en C. Catalina Tufiño Loza muchas gracias por brindarme su apoyo y conocimientos para realizar todo este trabajo, pero principalmente por creer en mí.

Al MVZ. Daniel, a Porfirio y a todo ese gran equipo de compañeros y amigos (Ofelia, Carlos, Daniel y Lucio), que me facilitaron muchísimo las cosas al compartir conmigo su experiencia y apoyo.

Al M. en MVZ. Gerardo López y al MVZ Fernando Cortés por su colaboración y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

➤ Al Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias - Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Laboratorio de Biotecnología en Salud Animal que me proporcionaron un lugar para la realización de esta tesis, bajo la tutoría de la Dra. Elizabeth Loza Rubio, Dra. Edith Rojas Anaya y la M. en C. Catalina Tufiño Loza.

➤ Al zoológico de Zacango y al Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS) “Los Reyes”, por brindarme la confianza para el manejo de las aves muestreadas para la realización del trabajo.

Resumen

El virus de Influenza aviar (IA) pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, su genoma es un ácido ribonucleico, dividido en 8 segmentos que codifican para 12 proteínas, los virus se clasifican en subtipos basados en la antigenicidad de sus moléculas de superficie (Tong *et al.*, 2013). Las especies de aves silvestres acuáticas son el reservorio natural de IA y se ha demostrado su participación como dispersoras del virus mediante sus migraciones (Morens *et al.*, 2012). La creciente tasa de contacto entre seres humanos- animales silvestres / domésticos aumenta la susceptibilidad a enfermedades emergentes y reemergentes (Saggese, 2007, García, 2008).

El objetivo de este estudio fue detectar la presencia del gen M del virus de influenza A, conocer la frecuencia serológica y la determinación de posibles factores de riesgo asociados a la exposición del virus de IA. Durante el período de los meses de Junio a Octubre del 2013, se muestreó un total de 81 aves de los ordenes filogenéticos Psittaciforme, Strigiforme y Falconiforme; de las cuales se estudiaron 79 muestras de suero sanguíneo, 48 muestras de hisopados orofaríngeos y 46 hisopados cloacales; las diferencias entre el número de muestras de sueros e hisopados se debió a la disponibilidad de ejemplares y a que se descartaron algunas aves muy pequeñas para evitar daño al manipularlas. Para determinar la frecuencia de anticuerpos se utilizó la técnica de inhibición de la hemoaglutinación, usando un virus de referencia de IA subtipo H5N2. Se obtuvo el total de 50 sueros positivos (63%) con títulos mayor o igual a 16, presentándose títulos hasta 1:512 (1 suero), siendo la mayor proporción en 1:64 (13 sueros). El 100% de los Psittaciformes fueron seropositivas (10 aves), 78.57% son Strigiformes (11 de 14 aves) y el 53.7% Falconiformes (29 de 55 aves) resultaron positivas.

La detección del gen M del virus de IA se realizó por RT-PCR en tiempo real, se obtuvo la frecuencia global del 84 % de muestras positivas: con Ct >35 de 48 hisopados orofaríngeos se obtuvieron 40 positivos (32 aves correspondían a los Falconiformes, 6 aves Strigiformes y 2 aves Psittaciformes); mientras que de 46

muestras de hisopados cloacales 39 resultaron positivas (32 aves Falconiformes, 5 Strigiformes y 2 Psittaciformes). El total de las muestras positivas (79 hisopados) se inocularon en embriones de pollo, donde dos líquidos alantoideos obtenidos del segundo pase, resultaron positivos a la prueba de hemoaglutinación y a la RT-PCR en tiempo real. Los aislamientos virales se realizaron a partir de muestras cloacales de un ejemplar de aguililla cola roja (*Buteo jamaicensis*) y de un aguililla de harris (*Parabuteo unicinctus*).

Finalmente los factores de riesgo asociados a la exposición a IA H5N2 encontrados como significativos (valores de $P < 0.05$ y $OR > 1$) fueron: el tipo de manejo que se le da a los Psittaciformes ($OR = 1.73$) y el tipo de alimento que se les proporciona (frutos / granos) ($OR = 1.58$).

En conclusión, en este estudio se observó la prevalencia del subtipo H5N2 de influenza A en aves silvestres de los ordenes filogenéticos Psittaciforme, Strigiforme y Falconiforme, indicando una circulación viral activa en los centros de rehabilitación de fauna silvestre muestreados, esto representa la primera notificación del virus de influenza Aviar en estas aves en México.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Definición de la enfermedad	1
1.2 Características del agente etiológico	1
1.2.1 Descripción molecular	1
1.2.2 Características del genoma viral.....	2
1.2.3 Ciclo de replicación del virus.....	4
1.2.4 Mutaciones y el origen de nuevas cepas virales	6
1.3 Ecología de los virus de Influenza	7
1.3.1 Ciclo de transmisión	7
1.3.2 Patogenicidad	8
1.4 Hospedadores.....	9
1.4.1 Hospedadores naturales.....	10
1.4.2 Hospedadores no convencionales.....	11
1.5 Distribución mundial del virus de Influenza A.....	12
1.6 Factores de Riesgo	17
1.7 DIAGNÓSTICO	19
1.7.1 Diagnóstico serológico	20
1.7.2 Diagnóstico virológico	21
1.7.3 Diagnóstico molecular	22
2 JUSTIFICACIÓN	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo general	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 MATERIAL Y MÉTODOS	27
4.1 Área de estudio	27
4.2 Muestras biológicas	27
4.3 Colección, preservación y transporte de muestras biológicas.....	28
4.3.1 Obtención y conservación del suero sanguíneo	28
4.3.2 Obtención y conservación de hisopados orofaríngeos y cloacales..	28
4.4 Procedimientos y técnicas utilizados para el análisis de muestras.	29
4.4.1 Detección del gen M del virus de Influenza A	29
Fase 1: Extracción de ARN	29
Fase 2: RT-PCR en tiempo real.....	29
4.4.2 Aislamiento Viral en embrión de pollo.....	31
Fase 1 Técnica de inoculación en cavidad alantoidea	31

CONTENIDO

	Pág.
Fase 2: Titulación y cuantificación viral absoluta	32
4.4.3 Serología	33
4.5 Metodología estadística	34
5 RESULTADOS	36
5.1 Diagnóstico del gen M de Influenza A	37
5.2 Aislamiento Viral	39
5.3 Serología	42
5.4 Determinación de factores de riesgo: análisis bivariado	43
6 DISCUSIÓN	45
7 CONCLUSIÓN	55
8 RECOMENDACIONES	55
9 REFERENCIAS	56
10 ANEXOS	65
10.1. Formato de registro de aves muestreadas	65
10.2 Protocolo para la RT – PCR en tiempo real.....	66
10.3 Notificación de resultados a SENASICA-SAGARPA	69

Lista de Figuras

- Figura 1. Diagrama estructural del virus de la Influenza.
- Figura 2. Esquema del ciclo de replicación del virus de la influenza.
- Figura 3. Ejemplo del reacomodo genético en el virus de la Influenza.
- Figura 4. Los diferentes subtipos del virus de Influenza A y sus hospedadores.
- Figura 5. Hipótesis del modelo de asociación entre los factores de riesgo para la presentación de enfermedades respiratorias.
- Figura 6. Ejemplares muestreados.
- Figura 7. Curva de amplificación estándar en RT-PCR en tiempo real con muestras positivas al aislamiento viral.

Lista de Cuadros

- Cuadro 1. Pandemias ocurridas a lo largo de la historia en humanos debido a diferentes subtipos de la Influenza (OIE 2013).
- Cuadro 2 Programa del termociclado
- Cuadro 3. Factores de riesgo obtenidos de la información de los sitios de muestreo y sus posibles categorías de estudio.
- Cuadro 4. Ejemplares muestreados
- Cuadro 5. Resultados de Ct de muestras de hisopados orales a la prueba de PCR en tiempo real por orden filogenético y tipo de especie muestreada.
- Cuadro 6. Resultados de muestras de hisopados cloacales a la prueba de PCR en tiempo real (Ct) por orden filogenético y tipo de especie muestreada.
- Cuadro 7. Cuantificación viral de las muestras positivas a aislamiento viral.
- Cuadro 8. Frecuencia de títulos serológicos
- Cuadro 9. Valores de Chi-cuadrada (χ^2) para los diferentes factores de riesgo por exposición al subtipo H5N2 de IA.

Abreviaturas y términos usados.

ADN:	Ácido desoxiribonucleico.
ARN:	Ácido ribonucleico.
Ave de presa:	Ave que caza presas para alimentarse, utilizando su pico y sus garras afiladas.
Cámara de muda:	Recinto oscuro que favorece la recuperación física y muda de plumas del ave.
CDC:	The Centers for Disease Control and Prevention.
<i>CENAVECE:</i>	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades.
Cetrería:	Modalidad de caza que emplea aves de presa adiestradas para capturar animales silvestres en su medio natural.
Cetreros:	Practicantes de la cetrería.
CFSPH:	The center for food security & public health.
CIVS:	Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre.
CONABIO:	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
CPA:	Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales.
Ct:	Cycle threshold ó ciclo umbral.
DGVS:	Dirección General de Vida Silvestre.
DINESA:	Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal.
DLEP 50%:	Dosis Letal en Embrión de pollo 50%.
E. U. A:	Estados Unidos de América.
ECTAD:	Centro de Emergencias para el Control de la Enfermedades Transfronterizas.

ELISA:	Ensayo inmuno-enzimático / Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay.
EP:	Embrión de pollo.
Falconiformes:	Orden de aves de presa diurnas.
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
FP:	Factor de protección.
FR:	Factor de riesgo.
HA:	Hemoaglutinina.
IA:	Influenza aviar.
IAAP:	Influenza aviar de alta patogenicidad.
IABP:	Influenza aviar de baja patogenicida.
IDGA:	Inmunodifusión en gel de agar.
IgA:	Inmunoglobulina A.
IgY	Inmunoglobulina Y.
IH:	Inhibición de la Hemaglutinación.
IMSS:	Instituto Mexicano del Seguro Social.
INIFAP:	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
IPIV:	Índice de patogenicidad intra-venoso.
LSB:	Laboratorio de bioseguridad.
NA:	Neuraminidasa.
NCBI:	Base de Datos del National Center for Biotechnology.
OIE:	Organización Mundial de Sanidad Animal.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OPS:	Organización Panamericana de la Salud.

OR:	Odds ratio ó razón de momios.
Orden filogenético:	Clasificación científica de las especies basada únicamente en las relaciones de proximidad evolutiva (filogénesis).
PANAFTOSA:	Centro Panamericano de Fiebre Aftosa-Salud pública veterinaria.
PGR:	Procuraduría General de la República.
PROFEPA:	Procuraduría Federal de Protección al Ambiente.
Psittaciformes:	Orden de aves que incluye loros y afines.
RNA _m :	Ácido ribonucleico mensajero.
Rpm	Revoluciones por minuto.
RR:	Riesgo relativo.
RT-PCR:	Retro transcripción - Reacción en cadena de la polimerasa.
SAGARPA:	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
SENASA:	Servicio Nacional de Salud Animal.
SENASICA:	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
SPF:	Libre de patógenos específicos (Specific Pathogens Free).
Strigiformes:	Orden de aves nocturnas: Búhos y afines.
TNF:	Factor de necrosis tumoral.
UEIDAPLE:	Unidad Especializada en Investigación de Delitos contra el Ambiente y Previstos en Leyes Especiales.
UHA:	Unidad hemoaglutinante.
χ^2 :	Chi-cuadrada.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de la enfermedad.

La Influenza Aviar (IA) también llamada Peste Aviar o Gripe Aviar, es una enfermedad infecto-contagiosa de etiología viral que varía entre una infección leve o asintomática hasta una enfermedad aguda y fatal, que afecta a la mayoría de las aves. Las aves acuáticas migratorias, constituyen el reservorio natural de los virus de IA, en cambio las aves de corral domésticas (en particular los pollos y los pavos) son especialmente vulnerables a las epidemias (García *et al.*, 2006; Taubenberger *et al.*, 2006).

La primera descripción de un padecimiento identificable como Influenza la realizó Hipócrates en el año 492 a.c. En América, la Influenza fue documentada en Texcoco en 1552 y se le denominó “pestilencia catarral”; en Italia se documentó en el año 1580 y se describió como la “influenza planetaria” por una asociación que hicieron con fenómenos astrales observados antes del brote, de donde se deriva el nombre actual de Influenza. El término “grippe”, proviene de Francia siendo más descriptivo ya que alude al “agarrotamiento” del pecho (CFSPH, 2010).

1.2 CARACTERÍSTICAS DEL AGENTE ETIOLÓGICO

1.2.1 Descripción molecular

Los virus de la Influenza pertenecen a la familia Orthomyxoviridae (del griego orthos, ‘correcto’, y myxo, ‘mucus’), comprende los géneros: Influenzavirus A, B, C (afectan animales vertebrados), Isavirus (afecta al salmón) y Thogotovirus (afecta mosquitos). Pertenecen al grupo de virus ARN de cadena simple, polaridad negativa y genoma segmentado. Son virus neumotrópicos con afinidad selectiva por las células epiteliales traqueobronquiales (Jiménez, 2012). La composición global de la partícula viral es 1% de ARN, 5-8% de carbohidratos, 20% de lípidos y

cerca de 70% de proteínas. Son virus esféricos o pleomórficos de hasta 120 nm de diámetro; la partícula viral tiene una masa de 250×10^6 Daltons (Talledo *et al.*, 2009).

La resistencia de los virus aviares en el medio ambiente es escasa, rayos ultravioletas los inactivan rápidamente, son sensibles al calor, solventes de lípidos, detergentes no iónicos, formaldehído, agentes oxidantes y a pH ácidos, y son relativamente estables sólo a pH comprendido en un rango de entre 6 y 8 (SENASA, 2014). Sin embargo, algunos virus de IA en su forma patógena pueden permanecer viables en las heces de las aves durante al menos 35 días a baja temperatura (4°C) y a temperaturas más altas (37°C), puede sobrevivir en muestras fecales durante 6 días (OIE, 2013).

Presentan una envoltura derivada de la célula huésped que alberga la hemoaglutinina (**HA**), la neuraminidasa (**NA**) y la proteína M. La HA se encuentra en una proporción de 4-5 a 1 con respecto a la NA, tiene de 4 a 6 nm de diámetro y se proyecta por encima de la envoltura hasta 10 a 14 nm. Hacia el interior de la partícula viral, existe una capa formada por la proteína de matriz (M) y más al interior, está la nucleocápside de simetría helicoidal, constituida por los complejos polimerasa y nucleoprotéico que incluye el genoma viral. (Talledo *et al.*, 2009).

1.2.2 Características del genoma viral.

El genoma completo tiene 13600 nucleótidos y está constituido por ARN de polaridad negativa dividido en ocho segmentos que codifican para once proteínas. Los tres primeros codifican el complejo polimerasa que tiene actividad endonucleasa; proteína básica (PB1 y PB2) y la proteína ácida (PA). Los segmentos cuatro y seis codifican glicoproteínas de superficie de envoltura; La hemoaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) que constituyen los antígenos virales mayores. El segmento cinco codifica para la nucleoproteína (NP), la cual se une al

ARN viral. El segmento siete o Gen M codifica dos proteínas que comparten una región corta: la proteína de matriz M1 que le da estructura a la cápside viral y la proteína de matriz M2 que funciona como un canal de iones. Finalmente, el segmento ocho codifica las proteínas NS1 y NEP que están vinculadas con el transporte, transcripción y empalme del ARN (Figura 1) (Furuse *et al.*, 2009; Jiménez, 2012).

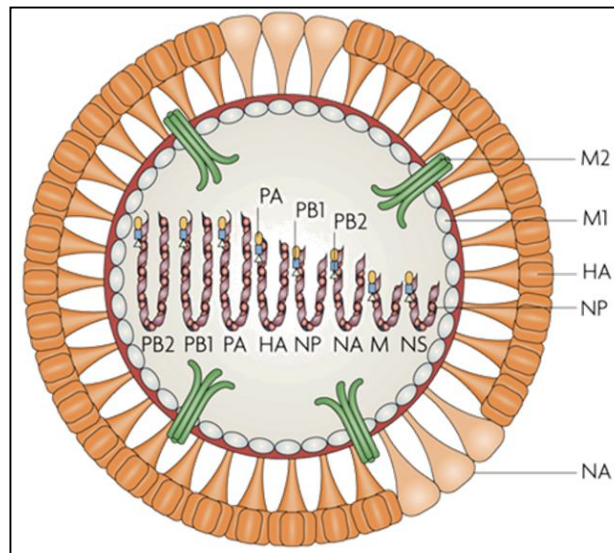


Figura 1. Diagrama estructural del virus de la Influenza. HA: hemoaglutinina; M: matriz; NA: neuraminidasa; NP: nucleoproteína; NS: proteína no estructural; PA: polimerasa ácida; PB1 y PB2: polimerasa básica (Noda *et al.*, 2007).

Los virus de la Influenza A se clasifican en subtipos basados en la antigenicidad de sus moléculas de superficie: 18 hemoaglutininas (subtipos: H1 a H18) y 11 neuraminidasas (subtipos: N1 a N11), incluidas las recientemente encontradas en murciélagos (Tong *et al.*, 2013).

Los subtipos de los virus de IA se clasifican en cepas, que se describen de acuerdo a su tipo, su huésped, el lugar del primer aislamiento, el número de cepa (si lo hubiera), el año de aislamiento y el subtipo antigénico; por ejemplo, un virus H5N1 aislado de los pollos en Hong Kong en 1997 es un A/pollo/Hong Kong/y385/97 (H5N1). En el caso de las cepas de humanos, el huésped generalmente se omite (Talledo *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010).

1.2.3 Ciclo de replicación del virus

La duración de cada ciclo de replicación es entre 4 y 6 horas, el virus por medio de la hemoaglutinina HA (HA), se une por endocitosis a los receptores de ácido siálico ubicados en la superficie de la célula hospedera, para ingresar por endocitosis, posteriormente la proteína M2 inicia el ciclo de replicación con el intercambio de protones entre el endosoma y el virus, induciendo su disminución de pH y generando cambios conformacionales en la HA. Una vez fusionada la membrana viral con la membrana del endosoma, la nucleocápside viral es liberada dentro del citoplasma y es transportada al núcleo de la célula hospedera. Allí, el ARN (-) es copiado por la ARN polimerasa viral a ARNm viral adquiriendo terminaciones cap 5' de los pre-ARNm del hospedero. Los ARNm son transportados al citoplasma y traducidos en proteínas virales tanto estructurales como reguladoras (Talledo *et al.*, 2009; Polo, 2009)

Los ARNm se traducen para generar las proteínas de la envoltura viral (HA, NA y M2) en los ribosomas unidos al retículo endoplásmico, ingresando a la vía secretora de la célula hospedera donde la HA y NA son glicosiladas. Los ARNm restantes son traducidos por ribosomas en el citoplasma y las proteínas PA, PB1, PB2 son importadas al núcleo, donde participan en la síntesis de cadenas positivas de ARN (+) que sirven de molde para las cadenas de ARN (-) viral; algunas de estas ingresan a la vía de la síntesis de ARNm, mientras que la proteína NP va a conformar las nucleocápsides. Las proteínas M1 y NS1 son transportadas al núcleo, esta unión a las nuevas cadenas de ARN (-) detiene la síntesis de ARNm viral y junto con la proteína NEP induce la exportación de la progenie de las nucleocápsides al citoplasma. Posteriormente, las nucleocápsides del virión asociadas con las proteínas M1 y NEP, son transportadas a la superficie celular junto con las proteínas HA, NA y M2, para que en la membrana plasmática se mantengan unidas. Finalmente, el empalme de los viriones se completa una vez que ocurre la gemación desde la membrana plasmática de la célula infectada (Polo, 2009; Jiménez, 2012).

El proceso de replicación y síntesis de proteínas no estructurales virales dispara los factores de transducción de señales que inducen a la expresión de los genes de citoquinas proinflamatorias, como por ejemplo el Factor de Necrosis Tumoral - alfa (TNF-alfa), iniciando la comúnmente llamada "tormenta de citoquinas" y la formación de anticuerpos en secreciones respiratorias (IgA) y en el suero (IgY en aves e IgG en mamíferos).

Los anticuerpos producidos en el hospedador desempeñan dos funciones principales: neutralización de la infección e interferencia en la liberación de nuevas partículas virales de la membrana de las células infectadas (García *et al.*, 1996; García *et al.*, 2006).

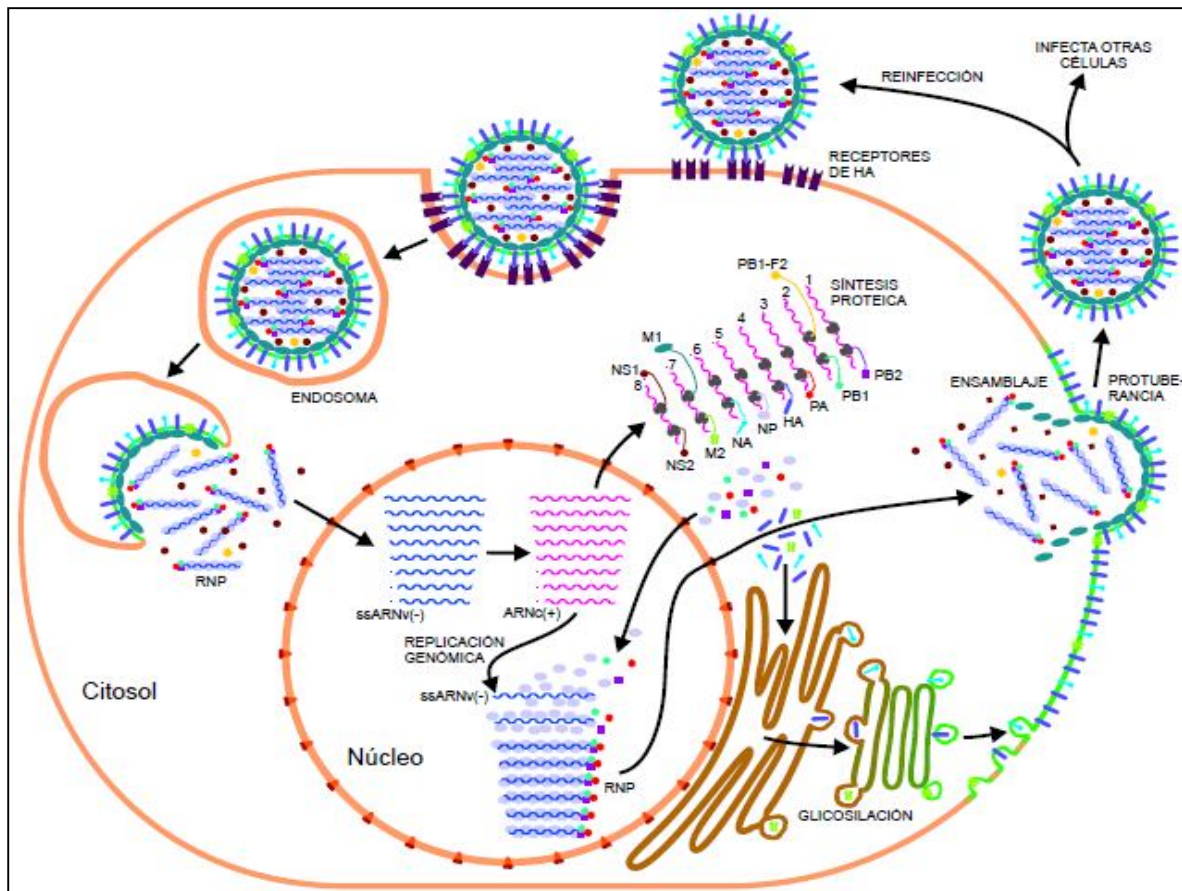


Figura 2. Esquema del ciclo de replicación del virus de la Influenza (Polo, 2009).

1.2.4 Mutaciones y el origen de nuevas cepas virales

Los virus de la IA se mantienen en las aves reservorio en estasis evolutivo, únicamente cuando el virus entra en contacto con aves susceptibles como los pollos o gallinas pueden modificar sus características genéticas mediante los siguientes procesos denominados:

1.-Drift antigénico o deriva antigénica: las mutaciones en el sitio antigénico de la proteína HA reduce o inhibe la unión de anticuerpos neutralizantes, formándose un nuevo subtipo. Las proteínas del virus (HA y NA) pueden tolerar mutaciones puntuales en su secuencia de aminoácidos sin afectar necesariamente la capacidad del virus para replicarse, es decir por errores en la replicación del ARN puede revertir una cepa de baja patogenicidad a una de alta patogenicidad (Talledo y Zumaeta, 2009; Polo, 2009).

2.-Shift antigénico o reacomodo genómico: ocurre cuando la célula es infectada por dos diferentes virus al mismo tiempo y sus segmentos genómicos son intercambiados durante la replicación. Debido a que este genoma es segmentado y habiendo dos cepas virales en proceso dentro de la misma célula, es relativamente frecuente que se introduzcan segmentos genómicos en la cápside del virus no correspondiente, lo que por lo general, genera partículas no viables. Aunque algunas veces el producto de esta recombinación, pueden aparecer cepas con características nuevas (Polo, 2009; SENASICA *et al.*, 2011).

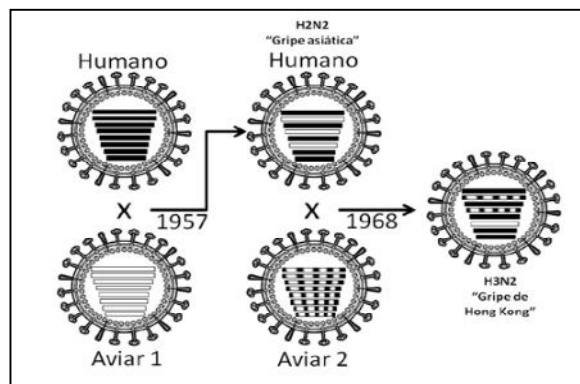


Figura 3. Ejemplo del reacomodo genético en el virus de la Influenza (Talledo *et al.*, 2009).

1.3 ECOLOGÍA[u1] DE LOS VIRUS DE INFLUENZA.

Los virus de Influenza A se describieron en 1933, afectan animales y al hombre; son factor causal de epidemias y pandemias. Los virus de Influenza B se identificaron en 1940, afectan a los humanos causando epidemias moderadas, incluso se han encontrado anticuerpos en focas. Los virus de Influenza C se describieron en 1950, infectan de manera limitada a humanos y existen evidencias serológicas de infección en cerdos y perros (García *et al.*, 2006; González *et al.*, 2012) e incluso recientemente se ha aislado un virus de Influenza C a partir de cerdos en el año 2013 (Hause *et al.*, 2013). [E2]

Las aves acuáticas migratorias tanto de lagos como costeras, son los reservorios naturales de toda la gama de virus de Influenza; en particular las especies del orden *Anseriforme* (patos), *Passeriforme* (golondrinas) y el orden *Charadriiforme* (gaviotas y golondrinas marinas, entre otras) (Taubenberger y Morens, 2006). Sin embargo, se ha reportado en *Psittaciformes* (loros, guacamayas), *Galliformes* (Faisanes, gallina de guinea) e inclusive ha sido documentada que afecta una gran variedad de especies de reptiles, mamíferos y al hombre. Todos los subtipos de HA, incluidos los identificados en los últimos 16 años (HAs 14, 15, y 16) se aislaron de patos y gaviotas, lo que demuestra que ocurrieron mayores cambios genéticos virales en estas aves (Morens *et al.*, 2012).

1.3.1 Ciclo de transmisión

Las aves acuáticas migratorias normalmente introducen el virus a una parvada, una vez dentro se disemina de una población a otra; en cambio las aves domésticas se consideran especies aberrantes, lo que origina mutaciones en los virus como un mecanismo de adaptación para una óptima replicación y transmisión en la nueva especie (García *et al.*, 2006; CENAVECE, 2013).

La transmisión y diseminación del virus se produce por el contacto directo entre aves afectadas y aves susceptibles. Las aves se infectan fácilmente por instilación

del virus hacia el saco conjuntival, narinas o la tráquea (CENAVECE, 2013). Las

1.3 ECOLOGÍA DE LOS VIRUS DE INFLUENZA.

Los virus de A se describieron en 1933, afectan animales y al hombre; son factor causal de epidemias y pandemias. Los virus de B se identificaron en 1940, afectan a los humanos causando epidemias moderadas, incluso se han encontrado anticuerpos en focas. Los virus de C se describieron en 1950, infectan de manera limitada a humanos y existen evidencias serológicas de infección en cerdos y perros (García y Ramos, 2006; González *et al.*, 2012; PANAFTOSA *et al.*, 2010)

Las aves silvestres acuáticas migratorias tanto de lagos como costeras, son los reservorios naturales de toda la gama de virus de : en particular las especies del orden *Anseriforme* (patos), *Passeriforme* (gansos) y el orden *Charadriiforme* (gaviotas y golondrinas marinas, entre otras) (Taubenberger y Morens, 2006); Sin embargo se ha reportado en *Psittaciformes* (Loros, guacamayas), *Galliformes* (Faisanes, gallina de guinea), inclusive ha sido documentada que afecta una gran variedad de especies de reptiles, mamíferos, y al hombre. Todos los subtipos de HA, incluidos los identificados en los últimos 16 años (HAs 14, 15, y 16) se aislaron de patos y gaviotas, lo que demuestra que ocurrieron mayores cambios genéticos virales en estas aves (Morens y Taubenberger, 2012).

1.3.1 Ciclo de transmisión

En las aves acuáticas migratorias generalmente introducen el virus en una parvada, una vez dentro se disemina de una población a otra; En cambio las aves domésticas se consideran especies aberrantes, lo que origina mutaciones en los virus como un mecanismo de adaptación para una óptima replicación y transmisión en la nueva especie (CENAVECE, 2013; García y Ramos, 2006).

La transmisión y diseminación del virus se produce por el contacto directo entre aves afectadas y aves susceptibles. Las aves se infectan fácilmente por instilación del virus hacia el saco conjuntival, narinas o la tráquea (CENAVECE, 2013). Las

aves afectadas eliminan el virus mediante los aerosoles y secreciones corporales, especialmente por las heces, las cuales son la principal fuente de diseminación de cepas entéricas avirulentas, llegando así a contaminar el agua de bebida y otros fómites (García *et al.*, 2006; PANAFTOSA *et al.*, 2010; Loza-Rubio *et al.*, 2012). En los patos silvestres los virus se replican primero en las células del tracto intestinal y se excretan por las heces en altas concentraciones (hasta $10^{8.7}$ dosis infectante en embrión de pollo 50% (DIEP 50%/g) (Webster *et al.*, 1992).

1.3.2-Patogenicidad

Los términos utilizados para describir a los virus de IA, comúnmente se definen sobre la base de su patogenicidad, virulencia y letalidad (Cox *et al.*, 1999; Cárdenas, 2006). El período de incubación de la enfermedad depende de la especie, edad del ave y la cepa del virus, sin embargo el período es generalmente de 3 a 7 días, no obstante puede prolongarse hasta 21 días (SENASICA *et al.*, 2011).

Los virus de IA se dividen en virus de alta patogenicidad (IAAP) y de baja patogenicidad (IABP) (OIE, 2013; SENASA, 2014). Los signos clínicos asociados varían dependiendo el subtipo, siendo la mayoría completamente asintomáticos (Soriano 2009; Hénaux *et al.*, 2011).

A) Influenza Aviar de baja patogenicidad (IABP)

Han sido identificados en aves y su replicación se limita a células de los tractos respiratorio y digestivo. La infección por el virus de Influenza en su fase primaria causa una enfermedad respiratoria febril con signos clínicos leves o imperceptibles (OIE, 2013).

Las infecciones bacterianas por *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus Influezae* son causas secundarias de neumonía, empiema, absceso pulmonar, choque tóxico, meningitis y sepsis, incluso llegan a aumentar el número de muertes (PANAFTOSA *et al.*, 2010). La infección combinada de virus y bacterias produce efectos

fisiopatológicos determinantes en la neumonía viral-bacteriana que conduce a la muerte en individuos que se hallan en grupos de riesgo; estos efectos incluyen barreras físicas destruidas o dañadas, adherencia incrementada (mediada por anticuerpos neutralizantes, actividad mucociliar disminuida, disfunción de células del sistema inmune, desregulación del sistema inmune y hasta expresión génica sobre regulada (Talledo *et al.*, 2009; Jiménez, 2012;)).

B) Influenza Aviar de alta patogenicidad (IAAP)

Los virus IAAP para casos sobreagudos y agudos presentan tasas de morbilidad y mortalidad cercanas al 100%, ocurriendo después de la expresión de signos clínicos iniciales de la enfermedad (entre los 2 y 12 días) y frecuentemente en las siguientes 48 horas (Martin *et al.*, 2007).

En su forma grave el virus adquiere la capacidad de causar infecciones sistémicas, incluso producir hemorragia interna masiva. Las aves se observan marcadamente deprimidas, con una disminución en el consumo de alimento y agua; plumas erizadas; presencia de sinusitis, lagrimeo, cianosis en la cabeza, la cresta y la barbilla; edema en la cabeza y diarrea verde blancuzca; enfermedades neurológicas, disminución en la producción de huevos, pérdida en la pigmentación de los huevos y huevos deformes o sin cáscara (CFSP, 2010; OIE, 2013).

1.4 HOSPEDADORES

Los virus de Influenza tienen un rango de hospederos limitado a individuos de la misma especie, lo que hace que ni siquiera pueda infectar a las aves de otras especies, menos aún a miembros de otras clases. Por lo tanto, el virus tiene que pasar obligadamente por un proceso de mutación progresiva antes de dar el salto a los humanos (Talledo *et al.*, 2009).

1.4.1 Hospedadores naturales

El huésped natural de los virus de Influenza A (subtipos: H1-H16, N1-N9) son las aves acuáticas silvestres y especialmente a las aves del orden *Anseniformes* y *Caradriformes*, la infección ocurre a nivel del intestino donde causa una infección subclínica y el virus es evolutivamente estable (Talledo *et al.*, 2009; SENASA, 2014). En las aves terrestres: gallinas, pollos y pavos tanto de tipo aviar (Siaα2-3 Gal) y de tipo humano (Siaα2-6Gal) los receptores se detectan en las células epiteliales de la tráquea (Suzuki, 2013).

La migración es una estrategia común para las aves que ocupan hábitats estacionales y pueden extenderse desde desplazamientos cortos hasta intercontinentales, las aves migratorias se mantienen como portadoras de patógenos que particularmente no afectan su estado de salud ni interfieren con su traslado; ésta actividad conecta muchas poblaciones de aves en espacio y tiempo, tanto en las áreas de crianza comunes como en las de alimentación. Consecuentemente las aves infectadas con el virus pueden transmitir sus patógenos a otras poblaciones que puedan traer posteriormente los virus a nuevas áreas (Simonsen, 1999; Soriano, 2009; Ventocilla *et al.*, 2011).

Las aves domésticas que entran en contacto con aves migratorias o sus deposiciones son el enlace mediante el cual el virus pasa de generar una infección intestinal subclínica a una infección avirulenta del tracto respiratorio (Talledo *et al.*, 2009). Los pollos son las especies de aves más susceptibles, en menor frecuencia otras especies de aves domésticas: como codornices, faisanes, patos, gansos y las palomas (García *et al.*, 2006; Taubenberger *et al.*, 2006).

Las cepas de virus poco virulentas y los virus vacunales inactivados generan una inmunidad que protege sólo contra el mismo subtipo. Las aves inmunizadas pueden enfermarse, sin embargo los signos y lesiones que desarrollan son menos graves así como también es menor la cantidad de virus que excretan y diseminan en el medio ambiente (SENASA, 2014).

1.4.2 Hospedadores no convencionales.

Los virus de IA experimentan un proceso de reordenamiento génico mediado por mutaciones que les permite adaptarse al hospedero y a las condiciones del ambiente, lo cual se conoce como presión selectiva o evolución obligada. Las mutaciones que ocurren en la región de unión de la HA parecen determinar la capacidad para que los virus de Influenza crucen la barrera de especie de aves a los mamíferos (Cox *et al.*, 1999; García *et al.*, 2006; Talledo *et al.*, 2009).

Se han encontrado anticuerpos en diferentes especies de mamíferos de manera directa o a través de aves domésticas: mamíferos marinos como focas y ballenas, mamíferos terrestres como cerdos, caballos, visones, tigres, leopardos, hurones e incluso perros han sido algunos de los animales que han presentado seropositividad a IA (Figura 4) (García *et al.*, 2006; Hénaux, 2011).

Desde el año 1997 se conoce que a partir de los virus de alta patogenicidad, en aves, los subtipos H5N1, H7N7, H7N9 se han transmitido de aves domésticas a los seres humanos, y los virus H9N2 se transmitieron de codornices a los seres humanos (Suzuki, 2013). El hombre desempeña un papel importante como transmisor directo o indirecto del virus, ya sea por transporte mecánico a través de la ropa, equipos o vehículos contaminados, o bien, por el contrabando de aves silvestres, de ornato, de pelea y comerciales (Simonsen, 1999; Viesca, 2001; Claas, 2002). Receptores de tipo Aviar y humano también se han detectado en el tracto respiratorio del cerdo (Suzuki, 2013).

Para llegar a infectarse una persona debe tener contacto directo y estrecho con aves enfermas o sus secreciones. En la mayoría de los casos la infección en personas con los virus de Influenza Aviar de alta patogenicidad provoca una conjuntivitis sin afectación general. Sin embargo, aunque se ha mostrado que algunas veces las cepas altamente patógenas de este virus pueden infectar al hombre, esta enfermedad no debe confundirse con la gripe humana estacional (causada generalmente por los virus H1 y H3) (Dennis, 2000; Valdez, 2002; García *et al.*, 2006; OIE, 2013).

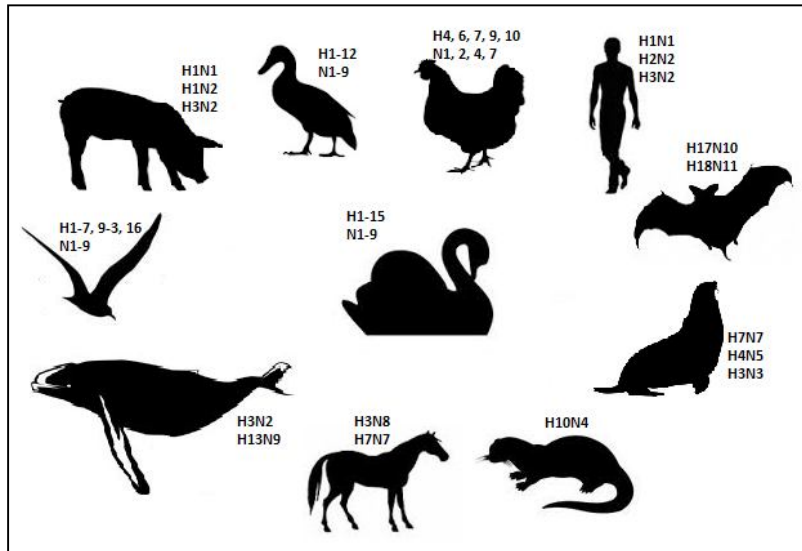


Figura 4. Los diferentes subtipos del virus de Influenza A y sus hospedadores, incluidos los recientemente encontrados en murciélagos.

1.5 DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DEL VIRUS DE INFLUENZA A

Durante la historia se han registrado los siguientes eventos donde algunos subtipos de Influenza han afectado gravemente a la humanidad., Cuadro 1.

Cuadro 1. Pandemias en humanos registradas a lo largo de la historia			
Año	Nombre Común	Descripción	Subtipo de IA
1918	“Gripe española”	Pandemia de origen porcino.	H1N1
1947	“Gripe italiana”s/n	Origen aviar. Pseudopandemia, variación antigénica subtípica. extrema	H1N1
1957	“Influenza asiática”	Pandemia de origen aviar.	H2N2
1968	“Influenza de Hong Kong”	Pandemia de origen aviar.	H3N2

Año	Nombre Común	Descripción	Subtipo de IA
1976	Sin nombre	Pandemia potencial abortiva, epidemia de virus de Influenza porcina.	H1N1
1977	“Gripe rusa”	Pandemia restringida a la edad juvenil, retorno del H1N1 humano.	H1N1
2009	Influenza A/H1N1” “Influenza humana de origen porcino”	Pandemia de origen porcino.	H1N1

Cuadro 1. Pandemias en humanos causadas por diferentes subtipos de Influenza, que se han registrado a lo largo de la historia (Basado en información de la OIE, 2013).

La mayoría de los casos en humanos se han detectado en áreas rurales y semi-rurales donde se mantenía un pequeño número de aves, pero curiosamente, entre el personal sometido a riesgo alto, como veterinarios, personal de rastros, trabajadores de mercados de aves vivas o sanitarios al cuidado de pacientes, se han producido muy pocos casos. Actualmente los subtipos que están circulando en humanos corresponde a H1 y H3, los cuales siguen experimentando cambios antigénicos (OIE, 2013). Después de complejas investigaciones hoy se conoce el genoma del virus que causó la gripe española en 1918-1919, contenía el mismo ácido nucleico proveniente de los porcinos, aves y del humano (Talledo *et al.*, 2009; SENASA 2014).

Algunos de los subtipos que se han registrado en aves y mamíferos de todo el mundo, a continuación se describen brevemente.

Europa: en octubre de 2005 se confirmó el primer caso de H5N1 en la Unión Europea, el virus fue aislado de un loro de procedencia ilegal a Siria. procedente de Surinam, que se encontraba en cuarentena al ser un ejemplar de procedencia ilegal. Días posteriores otro caso del virus de IA volvió a detectarse, esta vez en Croacia cuando fueron examinados doce cisnes hallados muertos hallados en un estanque de peces; consecuentemente el personal del Instituto Friedrich Loeffler,

en Francia, aisló un virus de IA en un hurón vivo con síntomas evidentes de enfermedad respiratoria (EFE, 2005).

En Alemania, año 2006, se detectaron casos positivos a H5N1 IAAP, donde una proporción significativa del número de aves silvestres fueron infectadas, inclusive se confirmó el aislamiento viral en un gato (Mettenleiter, 2006).

Asia: desde el año 2003, en Corea, han sucedido cuatro brotes de IAAP H5N1 causados por diferentes genotipos del virus IA, donde un gran número de aves domésticas comerciales, pollos y patos fueron sacrificados y destruidos para detener los brotes. Posteriormente, el incidente ocurrido durante la temporada de invierno del 2010 y 2011, causado igualmente por el virus de IAAP H5N1 presentó altas tasas de infección y mortalidad causadas por el virus IAAP H5N1 en , especies de aves silvestres acuáticas: patos mandarín (*Aix galericulata*), ánade real (*Anas platyrhynchos*) y cercetas del Baikal (*Anas formosa*) y las aves de presa: búho (*Bubo bubo*), gavián (*Accipiter nisus*) y el cernícalo (*Falco tinnunculus*), fueron las más afectadas .(Kim *et al.*, 2012; Choi *et. al.*, 2013).

EAI sur de China, en el año 2005 al sur de China,, el subtipo de IA H5N1 fue aislado por primera vez de un loro enfermo, al ser analizado el genoma completo de esta cepa reveló que, los 8 segmentos de genes de las secuencias de nucleótidos del virus tenían el 99% de homología con A/chicken/Henan/12/2004 (H5N1); es decir, el virus filogenéticamente pertenecía al linaje eurasiático (Cao *et al.*, 2012).

América: [u3]a principios de 2006 los países de la región de América Latina y el Caribe solicitaron a la FAO el apoyo técnico para la prevención y el control ante el eventual ingreso de IAAP. En Mayo de ese mismo año el Director General de la FAO aprobó el establecimiento de cuatro proyectos subregionales bajo la coordinación del Centro de Emergencias para el Control de la Enfermedades Transfronterizas (ECTAD), en la sede de la Oficina Regional de América Latina y el Caribe de la FAO (OIE, 2013).

En marzo del 2006 en el parque nacional de Inagua, una isla del sur del archipiélago de Bahamas, se notificó la muerte de 10 flamencos rosados (*Phoenicopterus ruber*), 5 espátulas rosadas (*Platalea ajaja*) y algunos cormoranes (*Phalacrocorax carbo*), éste pudo ser el primer caso de H5N1 en América pero no fue confirmado por las autoridades correspondientes. En el mismo año se detectó un brote en aves de corral en zonas rurales del Estado Mexicano de Chiapas, la cepa fue aislada (H5) y se determinó como “no transmisible a los humanos” (Soriano, 2009).

En el mismo año (año 2006) fueron aislados del medio ambiente nueve virus de IA, subtipos de hemoaglutinina H3, H4, H10, y H13, de entre 2405 muestras fecales que fueron recogidas en bandadas de aves acuáticas a lo largo de la costa central de Perú, en especies de aves como: vuelvepiedra (*Arenaria interpres*), ostrero americano (*Haematopus palliatus*), pelícano peruano (*Pelecanus occidentalis thagus*), zarapito trinador (*Numenius phaeopus*), gaviota (*Larus dominicanus*), patos rojizos (*Anas bahamensis*) y pato colorado (*Anas cyanoptera*) (Gherzi et al., 2009[u4]).

En República Dominicana (2008), se anunció la aparición de la cepa de gripe aviar H5N1 de baja patogenicidad, los casos se descubrieron cuando unos productores avícolas solicitaron permiso oficial para exportar gallos de pelea a Colombia (Pannwitz et al., 2009).

En 2006, E. U. A. dio el primer reporte de ingreso de IA subtipo H5N2, cuando se aisló el virus de un ejemplar de loro cachetes amarillos (*Amazona autumnalis*), de 3 meses de edad, de un ejemplar de Loro cachetes amarillos (*Amazona autumnalis*) producto del tráfico ilegal de especies. El ave ingresó al hospital veterinario con signos clínicos de letargo, al realizarse estudios de serología (inhibición de la hemoaglutinación), RT-PCR y aislamiento en embrión de pollo, los resultados fueron positivos,. EL virus aislado fue secuenciado y se determinó que estaba estrechamente relacionado con un linaje de virus (subtipo H5N2) que solamente ólo había sido registrado en México y América Central. El ave se recuperó favorablemente en cuarentena a las 9 semanas (Hawkins, 2006).

En 2012, las autoridades de salud animal de México confirmaron la presencia de la IAAP subtipo H7N3 en tres granjas avícolas comerciales de los municipios de Tepatitlán y Acatic, en el Estado de Jalisco, murieron por la IA aprox. 200 mil aves y se sacrificaron 600 mil más para el control de la enfermedad (FAO, 2014).

En 1994, en granjas comerciales del centro de México se detectó por primera vez el virus de IABP subtipo H5N2, que posteriormente se convirtió en IAAP, desde entonces se continúa con un programa de acción contra IA. Actualmente el territorio Mexicano se encuentra libre del virus de Influenza Aviar de alta patogenicidad desde junio de 1995.

El Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal (DINESA), de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), participan en la vigilancia de la Influenza Aviar y en las acciones de control-erradicación., ya que desde 1994, en granjas comerciales del centro de México se detectó por primera vez el virus de IABP subtipo H5N2, que posteriormente se convirtió en IAAP. El brote fue rápidamente controlado y el virus de la IAAP fue erradicado en junio de 1995. En el mismo año se creó la NOM-044-ZOO-1995: Campaña Nacional contra la Influenza aAviar, que estuvo vigente hasta el 21 de junio de 2011 (SENASICA, 2014).

En el año 2012 las autoridades de salud animal confirmaron la presencia de IAAP subtipo H7N3 en tres granjas avícolas comerciales de los municipios de Tepatitlán y Acatic, en el Estado de Jalisco (principal productor de huevo a nivel nacional), las aves presentaron sinología clínica de carácter agudo y muerte, entre las 32 y 94 semanas de edad, murieron cerca de 200 mil aves; el brote en poco tiempo fue controlado por el DINESA (FAO, 2014). De acuerdo a estimaciones de la OMS y de la OIE, el país se encuentra catalogado como de bajo o moderado riesgo de infección con IA (FAO, 2014). México actualmente tienen clasificadas como libres a 15 entidades mexicanas; los Estados de Coahuila y Durango, así como la

Región Lagunera se encuentran suspendidos en su reconocimiento de fase libre; las 17 entidades restantes se encuentran en fase de erradicación de esta campaña contra la IA. La población avícola en la zona libre representa aproximadamente un 27%, la cual produce el 38% y 30% de la carne de pollo y huevo del total nacional (SAGARPA, 2014).

Actualmente para las regulaciones relacionadas con el control y erradicación de la Influenza Aviar existe:

1.-Campaña Nacional contra la Influenza Aviar: campaña y las medidas zoonosanitarias que deberán aplicarse para el diagnóstico, prevención, control y erradicación de la IA.

2.- NOM-056-ZOO-1995. Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria (SENASICA, 2014).

[u5]

1[u6].6 FACTORES DE RIESGO[u7]

En México, son pocos los estudios que han investigado los factores involucrados en la propagación del virus de Influenza entre aves silvestres.

La presencia de enfermedades respiratorias no solo está influenciada por la presencia de microorganismos específicos, sino por la compleja interacción entre los factores relacionados al agente, al hospedador y al ambiente. Las aves vivas rsobrepresentan el mayor riesgo para la transmisión de la IA, pero algunos elementos como por ejemplo: los cadáveres con plumas de aves infectadas, huevos de gallinas infectadas, desperdicios de aves de corral u otros fómites son contaminados con excremento, convirtiéndolos en fuentes importantes de infección (Figura 5) (Saavedra, 2010).

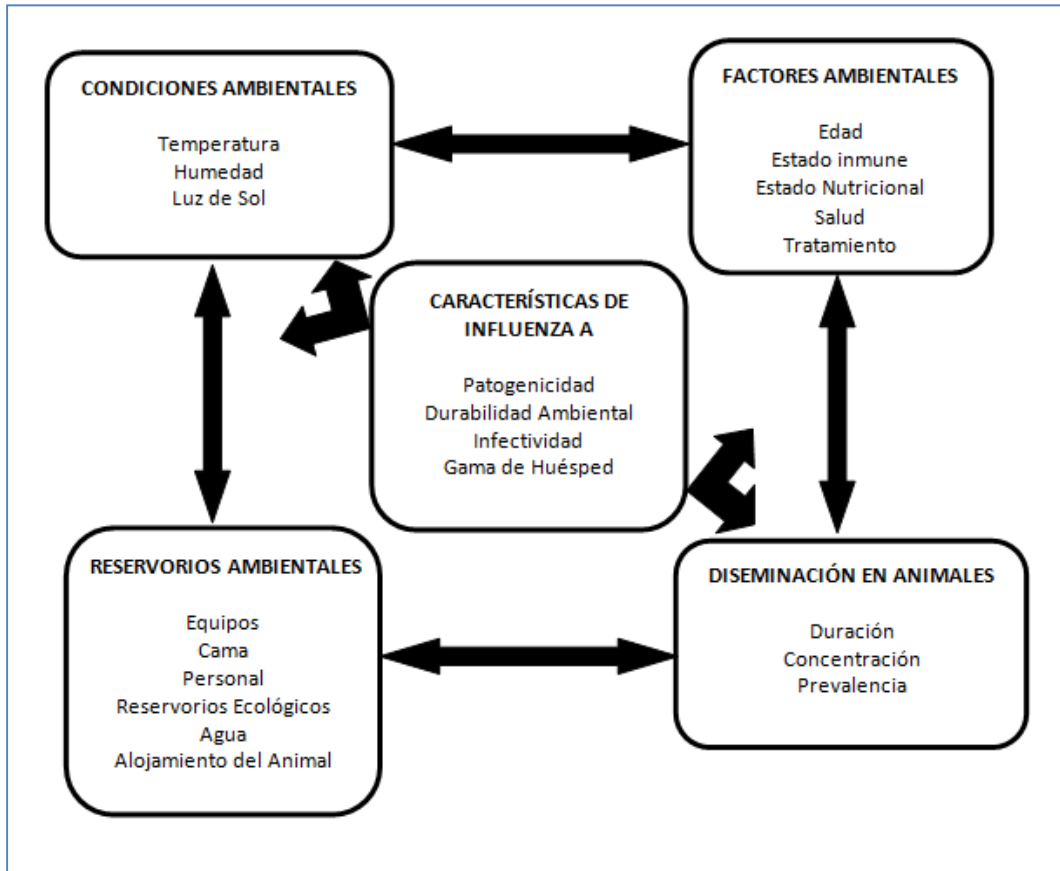


Figura 5. Hipótesis del modelo de asociación entre los factores de riesgo para la presentación de la enfermedad de Influenza Aviar (Basado en Stärk, 2000).

El conocimiento de estos factores es esencial para el control y prevención de las enfermedades, para ello para ello es muy importante primero determinar matemáticamente los factores de riesgo (FR) potenciales (medio-ambientales y de manejo), posteriormente se calcula la relación de estas dos variables, es decir, qué tanto cuando se presenta una variable también se presenta la otra, en este caso se estará estableciendo la fuerza de asociación, la cual puede obtenerse mediante procedimientos denominados medidas de asociación (Stärk, 2000).

Se llama factor de riesgo a una variable que se "cree que está relacionada" con la probabilidad de que se desarrolle la enfermedad en un grupo de individuos expuestos con relación a el grupo de no expuestos. Las medidas de asociación nos indican la fuerza de asociación entre dos variables, tales como la exposición y la enfermedad (Jaramillo *et al.*, 2010).

Las dos medidas de asociación para respuestas categóricas que se usan frecuentemente son: el riesgo relativo (RR) y la razón de momios ó Odds ratio (OR) (Thrusfield, 1991; De Irala *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 2006).

El OR es importante en epidemiología, porque representa una estimación del riesgo relativo en un estudio de casos y controles.

La RR y la OR se interpreta de la siguiente manera (Anderson *et al.*, 2006):

- a) Cuando la RR u OR = 1: la exposición no tiene asociación con la enfermedad.
- b) Cuando la RR u OR > 1: la exposición puede estar positivamente asociada a la enfermedad.
- c) Cuando la RR u OR < 1: la exposición puede estar negativamente asociada a la enfermedad y ser de hecho, un factor de prevención.

1.7 DIAGNÓSTICO

Debido a la variabilidad de los signos clínicos, el diagnóstico clínico sólo puede ser considerado presuntivo. El diagnóstico definitivo del virus de Influenza puede estar dado por métodos virológicos y serológicos, siendo positivo cuando se realiza el aislamiento e identificación viral (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

Todas las pruebas oficiales de diagnóstico deberán realizarse en los laboratorios oficiales, Laboratorio de bioseguridad 3 (LSB-3) de la CPA (Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales, SENASA (Servicio Nacional de Salud Animal) y en los laboratorios Regionales de CPA y LSB-2 de la CPA (SENASICA *et al.*, 2011).

- Diagnóstico serológico: inhibición de la hemoaglutinación, inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y ensayo inmuno-enzimático (ELISA).
- Diagnóstico virológico: aislamiento viral en embrión de pollo. Índice de patogenicidad intravenoso (IPIV).

- Diagnóstico molecular: RT-PCRB (Retrotranscripción - reacción en cadena de la polimerasa) y secuenciación (PANAFTOSA *et al.*, 2010, SENASICA *et al.*, 2011).

*Todas las pruebas oficiales de diagnóstico deberán realizarse en los laboratorios oficiales LSB-3 (Laboratorio de bioseguridad 3) de la CPA (Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales), SENASA (Servicio Nacional de Salud Animal), y en los laboratorios Regionales de CPA y LSB-2 de la CPA (SENASICA *et al.*, 2011)*

1.7.1 Diagnóstico serológico.

El diagnóstico se basa en la detección y medida de niveles de anticuerpos en suero, el resultado demuestra solamente la exposición del individuo a la enfermedad.

a) Técnicas de inmunodifusión en gel de agar (IDGA). La técnica de IDGA se basa en la migración del antígeno y el anticuerpo uno hacia el otro, en un medio de agar. El medio tiene una alta concentración de sales de facilita la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo. Para la realización de la técnica se perforan pocillos sobre el agar de unos 5 mm de diámetro separados entre sí (2.5 mm), a. A uno de los pocillos se les añade el antígeno de referencia (nucleocápside) y al resto, las muestras de suero problema; se incuban 24-48 hrs. y se observan las líneas de confluencia formadas. Un resultado es positivo cuando una línea de precipitación se forma entre el antígeno positivo y la muestra de suero contiguos (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

b) ELISA (Ensayo inmuno-enzimático / Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Es la técnica en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima, capaz de generar un producto detectable como cambio de color. La mayoría de los estuches comerciales usan un anticuerpo monoclonal contra la nucleoproteína (NP) y pueden realizarse sin equipo especial

de laboratorio y los resultados están disponibles de 15 a 20 minutos. Las desventajas es la falta de sensibilidad y el que aún no han sido validados para todas las aves y mamíferos (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

c) Inhibición de la hemoaglutinación (IH). Se basa en la pérdida de la capacidad hemoaglutinante de un virus al formarse el complejo antígeno-anticuerpo. Cuando se enfrentan anticuerpos conocidos a un virus problema, estos se unen impidiendo la hemoaglutinación viral (provocando la IH). Esta técnica determina los niveles de anticuerpos específicos (IgG) para diferentes subtipos específicos de Influenza A. Los títulos iguales o superiores a 16 son considerados positivos (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

1.7.2 Diagnóstico virológico

Basados en la detección del agente viral por aislamiento en cultivos celulares o huevos embrionados, detección de antígeno y amplificación parcial del genoma viral.

- Aislamiento en embriones de gallinas libres de patógenos específicos (SPF: Specific Pathogens Free). Los virus solamente pueden cultivarse en células vivas, ésta necesidad puede satisfacerse disponiendo de células que actúan como hospedadoras. El embrión de pollo (EP) fue utilizado por primera vez en 1911 por Rous y Murphy para la propagación de un virus oncogénico de las aves, en la actualidad se sigue utilizando por la buena cantidad de virus que se cosechan en el líquido alantoideo, por ejemplo para la producción de vacunas y la propagación de antígenos experimentalmente para diagnóstico.

La técnica se basa en obtener muestras de hisopados cloacales y/o traqueales, materia fecal y/o el pool de órganos (bazo, hígado, pulmón, cerebro, etc.) que posteriormente son procesados e inoculados en la cavidad alantoidea de al menos tres huevos embrionados de gallina SPF de 9 a 11 días de edad; luego de su incubación y pasajes ciegos, los fluidos alantoideos/amnióticos se someten a la

prueba de hemoaglutinación (HA) para evaluar el crecimiento viral, siendo positivo cuando ocurre la HA, es decir, se observan gránulos finos de glóbulos rojos aglutinados (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

- Índice de patogenicidad intravenoso (IPIV): los subtipos de Influenza Aviar producen infecciones asintomáticas o muy leves en aves silvestres y/o domesticas. Sólo algunas cepas de virus de Influenza que contienen los subtipos H5 o H7 han demostrado alta virulencia causando una alta morbilidad y mortalidad en aves. La caracterización de la patogenicidad se realiza mediante la inoculación del líquido alantoideo estéril de los embriones inoculados, por vía intravenosa en aves SPF de 4 a 6 semanas de edad (0.2 ml de virus, título 1:16 y diluído 1:10). Se considerará una cepa de alta patogenicidad aquella que cause letalidad mayor al 75% o un índice de patogenicidad igual o superior a 1.2 dentro de los 10 días post-inoculación. Este criterio es apoyado con el aislamiento de virus de Influenza A y el análisis genómico para identificar cambios en la secuencia de AA en el sitio de escisión proteolítica de la HA (PANAFTOSA *et al.*, 2010; OIE, 2013; SENASA, 2014).

1.7.3 Diagnóstico molecular

Los métodos moleculares permiten detectar el virus directamente en la muestra clínica así como su caracterización genética, el protocolo de manipulación requieren contención biológica nivel 2 utilizando normas de seguridad nivel 3.

- RT-PCR (Retrotranscripción - Reacción en cadena de la polimerasa). La RT-PCR se diferencia de la PCR sólo por la adición de un paso preliminar, la conversión inicial por una polimerasa de ARN en ADN (transcriptasa inversa) (Bustin *et al.*, 2005). La detección cualitativa de virus de Influenza A H5 y H7 de alta patogenicidad en especímenes del tracto respiratorio de humanos, aves domesticas y cultivos celulares utilizando RT-PCR en tiempo real fue diseñado por Spackman *et al.* (2002); ha sido optimizada utilizando un panel específico de

oligonucleótidos partidores, sondas de hidrólisis y el estuche de QIAGEN OneStep RT-PCR (Bustin *et al.*, 2005). En la RT-PCR OneStep (de 1 paso), se puede realizar la transcripción reversa y la PCR en un solo sistema de tampón; la reacción se realiza sin necesidad de añadir reactivos entre los pasos de RT y PCR. Éste método es cómodo ya que existen kits comerciales que contienen todos los reactivos necesarios, incluyendo la enzima transcriptasa reversa, por lo que solamente se necesita la preparación de un tubo para la amplificación de RT. La única desventaja es que tiene una reducida o no sensibilidad para la detección de nuevos subtipos o variantes debido a la alta variabilidad genética especialmente en los genes de la HA y NA (Spackman *et al.*, 2002; Bustin *et al.*, 2005).

La prueba consiste en la amplificación de un segmento específico del genoma del virus, único y característico para cada tipo de microorganismo que se quiera diagnosticar, Permite visualizar de forma inmediata cada ciclo de amplificación a través de la aparición de una señal de fluorescencia, mediada por SYBR Green o sondas marcadas, que determina la concentración de ADN o concentración de un gen presente en una muestra mediante el valor Ct (cycle threshold ó Ciclo umbral). Lo que significa que una alta concentración de ADN tendrá un valor Ct menor que se expresa y visualiza en un ciclo de amplificación temprano (señal de fluorescencia) (SENASA, 2014; FAO, 2014).

La eficiencia de una reacción de RT-PCR se determina con una curva de calibración con diluciones seriadas de una concentración de ADN conocida y sus valores de Ct. La cuantificación de ADN puede ser absoluta o relativa; en la cuantificación absoluta, la curva de calibración es utilizada para determinar la concentración de ADN en una muestra, puesto que dicha concentración se infiere según el valor de Ct encontrado. En la cuantificación relativa, la concentración de ADN de un gen o de un microorganismo de interés se halla en relación con un gen de referencia. En este tipo de cuantificación se usa la curva de calibración como control de calidad, entonces la concentración de ADN en una muestra se determina calculando un valor de DCt, el cual corresponde a la diferencia entre los valores de Ct del grupo de interés y el de referencia (Phandanouvong *et al.*, 2010).

- Secuenciación. Es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN. En 1977, se reportaron dos protocolos para la secuenciación de ADN; en ambos métodos se obtiene una autoradiografía y la diferencia está en la secuencia de la molécula que se determina por diferencias en los tamaños de los fragmentos generados.

-Método Maxam y Gilbert ó secuenciación química: determina la secuencia de una molécula de ADN, utilizando químicos que cortan en posiciones específicas fragmentos marcados en sus extremos 5´.

-Método Sanger (utiliza dideoxynucleotidos), mediante un templado de ADN de cadena sencilla sintetiza la hebra complementaria, la cual se termina en posiciones específicas fragmentos de polinucleótidos que traslapan el punto de corte en la primera serie (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

La estrategia básica de la secuenciación de ácidos nucléicos involucra: 1.- La degradación específica y el fraccionamiento de los polinucleótidos de interés a fragmentos suficientemente pequeños para ser secuenciados; 2.- La secuenciación de los fragmentos pequeños; 3.- El ordenamiento de los fragmentos a través de la repetición de los pasos anteriores, usando un procedimiento de degradación que produce una serie de fragmentos de polinucleótidos que traslapan el punto de corte en la primera serie (Spackman *et al.* 2002; PANAFTOSA *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICACIÓN

El ecosistema consiste en múltiples formas de flora y fauna, siendo las aves una de las especies más prolíficas e importantes en el hábitat, juegan un papel importante en la relación depredador - presa en el ecosistema forestal. Las aves silvestres han sido admiradas por su plumaje, su capacidad de caza y los diversos mitos que en torno a ellas han surgido; estas mismas razones han causado que sean constantemente perseguidas, capturadas y vendidas como aves de ornato o mascotas. El resultado de ello pone a muchas especies en alguna categoría de riesgo (CONABIO, 2014). Sumado a esto, los cambios de origen humano en los ambientes naturales, el constante aumento de la población humana y la creciente tasa de contacto entre seres humanos - animales silvestres / domésticos, aumenta la susceptibilidad a enfermedades emergentes y reemergentes de macroparásitos (helmintos y artrópodos) y microparásitos (bacterias, virus y , protozoos) (Saggese, 2007, García, 2008). Las enfermedades de tipo emergentes son predominantemente virales (virus ARN 37%), seguidos por las bacterias (Dabanch, 2003).

El virus de Influenza Aviar actualmente sigue presente en múltiples países, esto es interpretado por organismos sanitarios internacionales como evidencia de la debilidad de los sistemas de vigilancia para advertir el peligro de introducción y difusión de la enfermedad (Zamora, 2008).

Las especies de aves silvestres acuáticas son reservorio natural del virus, por lo que una gran cantidad de estudios han demostrado su participación como dispersoras del virus a nuevas regiones geográficas, esto mediante sus migraciones (Morens *et al.*, 2012). En el presente estudio se buscó analizar especies de aves silvestres albergadas en centros de conservación y rehabilitación, para conocer la prevalencia de Influenza A subtipo H5N2.

3. OBJETIVOS:

3.1 Objetivo general:

- Identificar una región del gen M mediante RT-PCR en tiempo real a partir de hisopados orofaríngeos y cloacales, así como establecer la frecuencia de anticuerpos contra Influenza A en suero de aves silvestres albergadas en dos centros de rehabilitación de fauna en el Estado de México.

3.2 Objetivos específicos:

- Identificar una región el gen M específico para el virus de Influenza Aviar H5N2 mediante la técnica RT-PCR en tiempo real, a partir de muestras de hisopados orofaríngeos y cloacales.
- Intentar el aislamiento viral en embrión de pollo, mediante la inoculación con muestras de hisopados elegidos en base al resultado de RT-PCR en tiempo real.
- Conocer si existe evidencia serológica del virus de Influenza Aviar H5N2 mediante la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación.
- Determinar los parámetros epidemiológicos que pudieran existir, usando la información obtenida de ambos centros de rehabilitación de fauna.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio

Para el presente estudio se muestrearon dos sitios de rehabilitación de fauna del Estado de México, importantes en manejo, rehabilitación (física, clínica y conductual), reubicación y liberación de aves silvestres.

Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS) “Los Reyes”, ubicado en el Municipio La Paz del Estado de México; es una zona semiárida, registra temperaturas en invierno de 21°C - 4.3 °C con menos de 5% de lluvia. En verano la T° es de 28.1°C - 10°C (CONAGUA, 2014).

El zoológico de Zacango está ubicado en el municipio de Calimaya de Díaz González a 14 km de la Ciudad de Toluca, Estado de México, en una zona rural apartada de la civilización. El clima es templado y semiseco de altura, con una temperatura media anual de 13.5 °C y humedad anual relativa es de 63 %. En primavera se alcanzan las temperaturas más altas de hasta 27 °C, mientras que las más frías se dan entre diciembre y febrero, presentándose heladas durante el invierno pero siendo raras las temperaturas mínimas por debajo de -3°C (CONAGUA, 2014).

4.2 Muestras biológicas

Para la selección de los ejemplares se optó por un estudio transversal no probabilístico (muestreo de ejemplares disponibles). El tamaño de muestra se basó en el número total de aves silvestres ingresadas al programa de recuperación, rehabilitación y conservación de especies clave o en riesgo; es decir, se tomó en cuenta ejemplares que son producto de rescate, entregas voluntarias o aseguramientos federales.

Las aves muestreadas se dividieron en tres grupos de acuerdo al orden filogenético del ejemplar: Falconiforme, Strigiforme o y Psittaciforme; por cada individuo muestreado se reportaron datos para establecer antecedentes conocidos y las características de manejo del ejemplar en el centro de albergue (Anexo 1).

4.3 Colección, preservación y transporte de muestras biológicas.

Al ser tomadas las siguientes muestras biológicas se transportaron en cadena en frío al Laboratorio del departamento de Biotecnología en Salud Animal del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias del INIFAP, para su conservación y utilización posterior.

4.3.1 Obtención y conservación del suero sanguíneo

La extracción de sangre (1% de su peso vivo) se realizó por la técnica de punción en vena braquial, o yugular de las aves, se utilizaron jeringas hipodérmicas de 1 mL, 3 mL o 5 mL, con agujas calibre variado (30G x 13mm, 25G x 16mm, 23G x 25mm, 21G x 32 mm), dependiendo el tamaño del ejemplar a muestrear. El procedimiento se llevó a cabo en tubos vacutainer sin anticoagulante que se conservaron a temperatura ambiente hasta la extracción del suero. Para la obtención del mismo se centrifugó la sangre a 1500 rpm 10 min. a 4 °C y se transfirió el suero (sobrenadante) a un vial estéril previamente rotulado con el número de identificación del animal. Se almacenaron a una temperatura de -20°C, para su posterior uso.

4.3.2 Obtención y conservación de hisopados orofaríngeos y cloacales

Se tomaron muestras de mucosa orofaríngea y mucosa cloacal, que se colocaron en 3 mL de medio Leibovitz (In vitro, México) con albúmina sérica bovina al 0.5% y antibiótico-antimicótico 1x (Penicilina 1000 UI/ Estreptomocina 1000 ucg / Amfotericina B 0.25 µg/mL en solución de NaCl al 0.85% 100X, *in vitro*,

México). Posteriormente en el laboratorio, los viales con hisopos fueron homogenizados en vortex por 30 segundos para desprender los viriones, se retiró el hisopo y se centrifugaron los tubos a 1500 rpm por 15 min., el sobrenadante se recolectó con una jeringa para ser filtrado con membranas Corning® (0.45µm de diámetro del poro) a un vial estéril, la conservación de la muestra fue a una temperatura de -70 °C.

4.4 Procedimientos y técnicas utilizados para el análisis de muestras:

4.4.1 Detección del Gen M del virus Influenza A.

-Fase 1: Extracción de ARN

Para la extracción de ARN a partir del hisopado orofaríngeo y cloacal se utilizaron 200 µl de la muestra, a las cuales se les agregó 750 µl de Trizol (Reagent Invitrogen, USA.), el procedimiento de extracción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN extraído fue almacenado a -70°C hasta su utilización.

- Fase 2: RT-PCR en tiempo real (One-step).

Para detectar una región del gen M del virus de Influenza, se utilizó la técnica RT-PCR en tiempo real en muestras de hisopados orofaríngeo y cloacal (ARN), respectivamente. El protocolo utilizado fue el reportado por Spackman et al., (2002), adaptado a las condiciones de laboratorio por el personal de la FAO y la OIE (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

La amplificación se llevó a cabo utilizando un termociclador Light Cycler 480 II (Roche, España), con iniciadores específicos para el gen M y el subtipo H5 de IA. Se utilizó una gradilla para termociclador Light Cycler de 96 pozos, en cada pozo se colocaron 8.5 µl de la mezcla de reactivos del Kit Ag Path-ID™ One-step. Consecuentemente se agregaron 4 µl de ARN de las muestras (una muestra

distinta por pozo). Una vez cargada la placa se cubrió con una mica adhesiva Light Cycler 480 y se introduce al termociclador (Anexo 2).

El programa utilizado para el termociclado fue: 48°C, 30 min.; 95° 10 min., 40 ciclos: 95°C 15 seg., 60°C 1 min.

Es importante mencionar que el Kit Ag Path-ID™ One-step que se utilizó contiene una mezcla de enzimas, la retrotranscriptasa y la polimerasa, esta última es termoestable y por lo tanto no se desnaturaliza durante el primer ciclo del programa, ya que tiene actividad de “hot start” que ocurre a más de 80°C, por lo que empieza a polimerizar cuando inicia el alineamiento de los iniciadores a 60°C.

Cuadro 2. Programa del termociclado			
T°	Tiempo	Etapas	Descripción
48°C	30 min.	Transcripción reversa	Genera una copia de la hebra de RNA, pero esta copia es ADNc: Unión del primer a la secuencia del ARNm. La transcriptasa reversa copia la primera cadena de ADNc; posteriormente remueve el ARNm y copia la segunda cadena de ADNc.
95°C	10 min	Inactivación Rtas	El templado, ADNc, comienza el proceso de PCR: 1.-DES NATURALIZACIÓN: Se separan las dos cadenas de ADNc por ruptura de enlaces de hidrógeno.
95°C 60°C	15 seg. } 40 } 1 ciclo } min.	Amplificación del DNA	2.-HIBRIDACIÓN: Los primers se alinean al extremo 3' y 5' del templado (Ocurre a 60°C). *La sonda hibrida junto con la secuencia de interés.
72°C	7 min.	Paso extra de elongación	EXTENSIÓN: La polimerasa actúa en el complejo primers-templado y empieza su función catalítica, para crear cadenas complementarias, la extensión va del extremo 5' a 3'. *La polimerasa corta al fotocromo del resto de la sonda, permitiendo la emisión de señal fluorescente

4.4.2 Aislamiento viral en embrión de pollo

-Fase 1: Inoculación de embrión de pollo: técnica de inoculación en cavidad alantoidea.

El procedimiento de la técnica se basó en lo descrito por el Manual de Diagnóstico de virus de Influenza en mamíferos y aves de la PANAFOTSA *et al.*, 2010.

Los embriones de pollo SPF (libre de patógenos específicos), de 9-11 días de edad (procedentes de industrias ALPES 7, Puebla, Méx.), se inocularon vía cavidad alantoidea (0.2 mL), 3 EP por cada muestra de hisopados cloacal y orofaríngea determinada previamente positiva a la RT-PCR en tiempo real (PANAFOTSA *et al.*, 2010).

Los embriones se incubaron a una temperatura de 37.7 °C y 55% de humedad relativa (Incubadora Jamesway), fueron ovoscopiados diariamente para determinar la viabilidad y notificar cambios o muerte. Los embriones muertos a las primeras 24 hrs. posteriores a la inoculación fueron eliminados.

Se recolectó con una jeringa de 10 mL el líquido alantoideo de los embriones muertos a las 48 hrs y vivos a las 72 hrs., transfiriendo 1 mL a un vial estéril (alícuota) y el resto a un tubo de 10 mL, para su conservación a una T° de -70°C. Al momento de la extracción del líquido alantoideo se realizó la evaluación del crecimiento viral usando la prueba de hemoaglutinación (HA), de la manera siguiente:

Sobre una placa de acrílico, con una pipeta se deposita una gota de líquido alantoideo y una gota de glóbulos rojos al 1%, se mezclaron con un palillo haciendo movimientos circulares. La lectura se hizo en un máximo de 3 minutos (NOM-044-ZOO-1995; NOM-056-ZOO-1995).

Interpretación:

Reacción positiva (+): la hemoaglutinación consiste en la formación de gránulos finos de glóbulos rojos aglutinados.

Reacción negativa (-): la mezcla permanece sin cambios.

Posteriormente a la recolección del líquido alantoideo, se siguieron nuevamente los pasos ya descritos para realizar la prueba de RT – PCR en tiempo real y determinar las muestras positivas ($Ct \leq 35$) y la posterior inoculación (un segundo pase) en embrión de pollo SFP (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

-Fase 2 Titulación y cuantificación viral absoluta

Para valorar la infectividad del virus aislado primero se prepararon diluciones logarítmicas decimales (décuples seriadas) en medio PBS con el virus de referencia: IABP subtipo H5N2.

Por cada dilución (10^0 hasta 10^{-10}) se realizó la inoculación de 5 embriones de pollo SFP, cada uno con el volumen de 0.2 mL siguiendo la técnica de inoculación en cavidad alantoidea. Los embriones fueron incubados hasta 72 hrs. a 37.7°C , se revisaron cada día y se descartaron los que murieron durante las primeras 24 hrs. post- inoculación (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

Se anotaron y tabularon los resultados de mortalidad y sobrevivencia de los embriones por cada dilución, tomando como positivos aquellos que fueron positivos a la prueba de Hemoaglutinación en placa (NOM-044-ZOO-1995; NOM-056-ZOO-1995).

Para determinar la Dosis Letal en Embrión de Pollo 50% (DLEP 50%) se utilizaron los datos tabulados de los resultados de la inoculación en EP, para desarrollar el método de Reed y Muench (NOM-044-ZOO-1995).

a) DP= Distancia proporcional.

$$DP = \frac{\% \text{ mayor al } 50\% - 50\%}{\% \text{ mayor al } 50\% - \% \text{ menor al } 50\%}$$

b) Corrección del logaritmo de dilución de base 10= Suma de los exponentes:
(%mayor al 50%) + (DP) =DLEP 50%/mL.

Posteriormente en el programa de LighCycler 480® se realizó una curva de calibración o curva estándar, para determinar el Ct y la cuantificación viral absoluta (escala logarítmica) de las muestras positivas al aislamiento viral.

4.5 Serología

La identificación de los anticuerpos en el suero se realizó mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH), se empleó el antígeno de referencia del virus de Influenza Aviar subtipo H5N2 con 4 unidades hemoaglutinantes y 25 µl de suero problema de cada ave (FAO, 2014; PANAFTOSA *et al.*, 2010).

Para realizar la prueba se utilizó una microplaca de 96 pozos de fondo “U”, a todos los pozos se les agregó 25 µl de PBS (solución de fosfatos con pH de 7.2), posteriormente en el primer pozo de cada fila se colocaron 25 µl de suero problema, considerando dos pozos más, para colocar los controles positivo y negativo. Se pipeteó 7 veces cada pozo y se diluyó 25 µl de la 1er columna a la última, al final se eliminaron 25 µl. Posteriormente se agregaron 25 µl de antígeno con 4 UHA en cada pozo; se cubrió la placa con un trozo de papel aluminio y se incubó durante 30 minutos a T° ambiente. Consecuentemente se colocan 25 µl de PBS y posteriormente 25 µl de eritrocitos de ave al 1% en toda la placa. Posteriormente, se volvió a cubrir la placa y se incubó por 60min. Finalmente se hizo la lectura.

Control Positivo: Hay una unión antígeno anticuerpo por lo que se observa sedimentación de eritrocitos (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

Control Negativo: No hay anticuerpos por lo que el antígeno se une a los eritrocitos observándose hemaglutinación.

Interpretación: Se consideraron como muestras seropositivas si la reacción de IH se observaba a una dilución $\geq 1:16$; es decir, cuando ocurre la reacción antígeno/anticuerpo, la hemoaglutinación de los glóbulos rojos es inhibida. El

anticuerpo impide que el antígeno adsorba al glóbulo rojo (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

4.6 Metodología estadística

Los datos por orden filogenético (Falconiformes, Strigiformes y Psittaciformes) e individual por cada especie fueron analizados, para determinar las frecuencias y posibles factores de riesgo asociados.

Para los resultados de RT-PCR en tiempo real, se elaboraron tablas de contingencia y medidas de tendencia central por cada tipo de muestra (hisopado orofaríngeo e hisopado cloacal) y su valor de Ct (ciclo umbral).

Se utilizó un análisis bivariado para el análisis de los resultados del estudio serológico; la determinación de posibles factores de riesgo asociados a la exposición del virus, se realizó por medio de pruebas de homogeneidad de proporciones por Chi-Cuadrada (χ^2) y el procedimiento de medida de asociación para determinar el factor de riesgo relativo, mayor a 1 ($OR > 1$) con una significancia del 0.05. Los análisis se realizaron con el programa de cómputo Epi Info™ (Versión 2007).

La determinación de las variables independientes o posibles factores de riesgo fueron obtenidos de información recopilada por el personal que labora y maneja las aves en los centros muestreados (Cuadro 3). Las variables dependientes son el resultado del estudio serológico (estado positivo/negativo a la enfermedad).

Cuadro 3. Factores de riesgo obtenidos de la información de los sitios de muestreo y sus posibles categorías de estudio.

Factor de Riesgo	Descripción	Categoría
1.- TIPO DE MANEJO (ORDEN FILOGENÉTICO)	Manejo y procedimientos de rehabilitación enfocados al grupo taxonómico al que pertenece	<u>PSITTACIFORME*</u>
		STRIGIFORME
		FALCONIFORME
2.- ALBERGUE	Lugar donde son albergadas las aves	ZOOLOGICO ZACANGO
		<u>CIVS "LOS REYES"</u> **
3.- PROCEDENCIA	Tipo de procedimiento para el ingreso del ave. Sí procede del rescate del tráfico ilegal de aves o es entregado voluntariamente por particulares	<u>RESCATE /ASEGURAMIENTO*</u>
		ENTREGA VOLUNTARIA
4.- RECINTO	Tipo de instalación en el que se alberga al ave	CAJA/JAULA*
		RECINTO DE CEMENTO
5.- ESPECIES VECINAS	Albergue relacionado con otras especies contiguas	<u>SI*</u>
		NO
6.- CONDICION DE ALBERGUE	Albergue único para un ejemplar o es compartido con otras aves.	<u>ÚNICO / PERCHA INDIVIDUAL</u>
		GRUPO
7.- MANEJO	Frecuencia de contacto cercano con el ser humano	POCO / NULO
		<u>MANEJO DIARIO*</u>
8.- CONDICIONES DE INSTALACIÓN	La mayor parte del día el ave se encuentra confinada en una instalación o por lo contrario la mayor parte del tiempo está en condiciones de exposición al ambiente	CONFINADO
		EXPUESTA AL AMBIENTE*
9.-ALIMENTACIÓN	Tipo de alimento y manejo previo de éste antes de ser proporcionado al ejemplar	<u>FRUGÍVOROS / GRANÍVOROS*</u>
		CARNÍVOROS / INSECTÍVOROS

(*) Ejemplo de la información obtenida sobre el manejo de cada ejemplar muestreado.

5. RESULTADOS

Durante el período comprendido entre los meses de Junio a Octubre del 2013, se muestrearon un total de 79 aves del orden filogenético Psittaciforme, Strigiforme y Falconiforme albergadas en dos centros de rehabilitación de fauna en el Estado de México (Figura 6 y Cuadro 4); a 48 se les tomó muestras de hisopados orofaríngeo y 46 muestras de hisopados cloacales.

Es importante mencionar que las diferencias entre el número de muestras de sueros e hisopados orofaríngeos / cloacales, se debió a la disponibilidad de ejemplares proporcionados por los centros de captura, aunado a ello se descartaron algunas aves muy pequeñas para evitar daño al manipularlas.

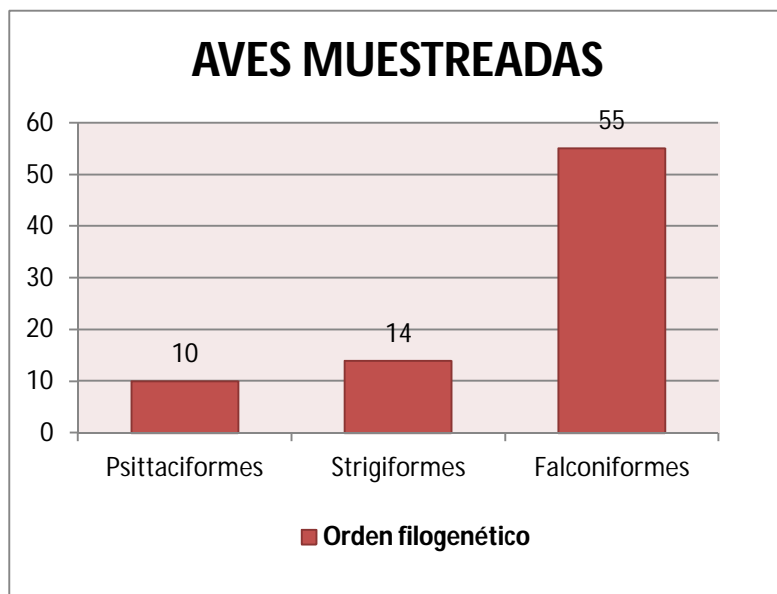


Figura 6. Número de ejemplares muestreados por orden filogenético muestreadas en dos centros de rehabilitación de fauna en el Estado de México.

Cuadro 4. Ejemplares muestreados		
Orden Filogenético	Especie	Nombre Común
Psittaciformes	<i>Ara macao</i>	guacamaya roja
	<i>Ara militaris</i>	guacamaya verde
	<i>Amazona finschi</i>	loro occidental
	<i>Amazona albifrons</i>	loro frente blanca
	<i>Amazona autumnalis</i>	loro cachetes amarillos
Strigiformes	<i>Tyto alba</i>	lechuza de campanario
	<i>Bubo virginianus</i>	búho real
	<i>Megascops asio</i>	tecolote oriental
	<i>Megascops trichopsis</i>	tecolote rítmico
Falconiformes	<i>Buteo jamaicensis</i>	aguililla cola roja
	<i>Parabuteo unicinctus</i>	aguililla de harris
	Caracara cheriway	caracara
	<i>Aquila chrysaetos</i>	águila real
	<i>Buteogallus anthracinus</i>	aguililla negra
	<i>Falco peregrinus</i>	halcón peregrino

Cuadro 4. Orden filogenético, Especie y nombre común de los ejemplares estudiados.

5.1 Detección de una región del Gen M de Influenza A

Para la detección del virus de Influenza por RT-PCR en tiempo real se obtuvo una frecuencia de muestras positivas de: 40 de hisopados orofaríngeos (83%) y 36 hisopados cloacales (78%) con Ct >35.

a) Hisopados orofaríngeos: De 48 muestras se obtuvieron 40 de ellas positivas (83%), de las cuales 32 de 38 aves correspondían a los Falconiformes, 6 de 8 aves fueron Strigiformes y las 2 aves Psittaciformes lo fueron (Cuadro 5).

Cuadro 5. Prueba de PCR en tiempo real: Resultados de Ct de muestras de hisopados orofaríngeos.								
Orden Filogenético	Género	Especie	N. de hisopados Orofaríngeos	CT				
				NEGATIVO		POSITIVOS		
				(-)	35	34	33	32
Psittacidos	<i>Ara</i>	<i>A. macao</i>	1				1	
	<i>Amazona</i>	<i>A. autumnalis</i>	1			1		
Strigiformes	<i>Bubo</i>	<i>B. virginianus</i>	6	1	1	2	1	1
	<i>Megascops</i>	<i>M. asio</i>	1				1	
		<i>M. trichopsis</i>	1				1	
Falconiformes	<i>Buteo</i>	<i>B. Jamaicensis</i>	13			5	6	2
	<i>Parabuteo</i>	<i>P. unicinctus</i>	12		3	2	7	0
	<i>Caracara</i>	<i>C. cheriway</i>	8	1		3	4	
	<i>Aquila</i>	<i>A. chrysaetos</i>	3		2		1	
	<i>Buteogallus</i>	<i>B. anthracinus</i>	1				1	
	<i>Falco</i>	<i>F. peregrinus</i>	1					1

Medidas de tendencia central de valores de Ct	MEDIA	MEDIANA	MODA
		Ct 32	Ct 33

Ct =Ciclo umbral

b) Hisopados cloacales: de 46 muestras 39 resultaron positivas, donde 32 de ellas (69.5%) corresponden a el orden filogenético de los Falconiformes, 5 aves (10.87%) fueron Strigiformes y 2 aves (4.347%) Psittaciformes (Cuadro 6).

Cuadro 6. Prueba de PCR en tiempo real: Resultados de Ct de muestras de hisopados cloacales.								
Orden Filogenético	Género	Especie	N. de hisopados cloacales	CT				
				Negativo		Positivo		
				(-)	35	34	33	32
Psittaciformes	<i>Ara</i>	<i>A. macao</i>	1			1		
	<i>Amazona</i>	<i>A. autumnalis</i>	1			1		
Strigiformes	<i>Bubo</i>	<i>B. Virginianus</i>	6	1		2	1	2
Falconiformes	<i>Buteo</i>	<i>B. Jamaicensis</i>	13			1	9	3
	<i>Parabuteo</i>	<i>P. unicintus</i>	12		3	2	6	1
	<i>Caracara</i>	<i>C. cheriway</i>	8		1	3	3	1
	<i>Aquila</i>	<i>A. chrysaetos</i>	3	1	1	1		
	<i>Buteogallus</i>	<i>B. anthracinus</i>	1			1		
	<i>Falco</i>	<i>F. peregrinus</i>	1				1	

Medidas de tendencia central de valores de Ct	MEDIA	MEDIANA	MODA
	Ct 32	Ct 35	Ct 33

Ct =Ciclo umbral

5.2 Aislamiento viral

Un total de 79 hisopados positivos obtenidos en RT-PCR en tiempo real se inocularon en embriones de pollo (SPF), posteriormente se recolectó el líquido alantoideo de los embriones de pollo y se realizó nuevamente la prueba de RT-PCR en tiempo real, donde solamente resultaron dos muestras positivas. Con el propósito de verificar los resultados, se realizó un segundo pase en embrión de pollo (EP).

Los líquidos alantoideos del primer pase positivos a RT-PCR en tiempo real se inocularon nuevamente en EP, donde fue posible el aislamiento viral. Los líquidos alantoideos obtenidos del segundo pase en EP dieron resultados positivos a la prueba de hemoaglutinación y a la técnica de RT-PCR en tiempo real. Los aislamientos fueron realizados a partir de muestras cloacales, correspondieron a ejemplares albergados en el CIVS “Los Reyes”: 1) aguililla cola roja (*Buteo jamaicensis*) y 2) aguililla de harris (*Parabuteo unicintus*), ambos especímenes resultaron seropositivos a la prueba de IH con títulos de 1:64.

Con el propósito de calcular la concentración viral de las muestras, primero se realizó la titulación viral absoluta en EP de un virus de Influenza Aviar de baja patogenicidad (IABP) subtipo H5N2, el resultado obtenido fue $10^{11.7}$ DLEP₅₀/mL. Posteriormente se realizó una curva estándar para la cuantificación viral, y los dos aislamientos positivos en EP se sometieron nuevamente a la prueba de RT-PCR en tiempo real para determinar los valores de Ct y la cuantificación de las dosis letales (Cuadro 7).

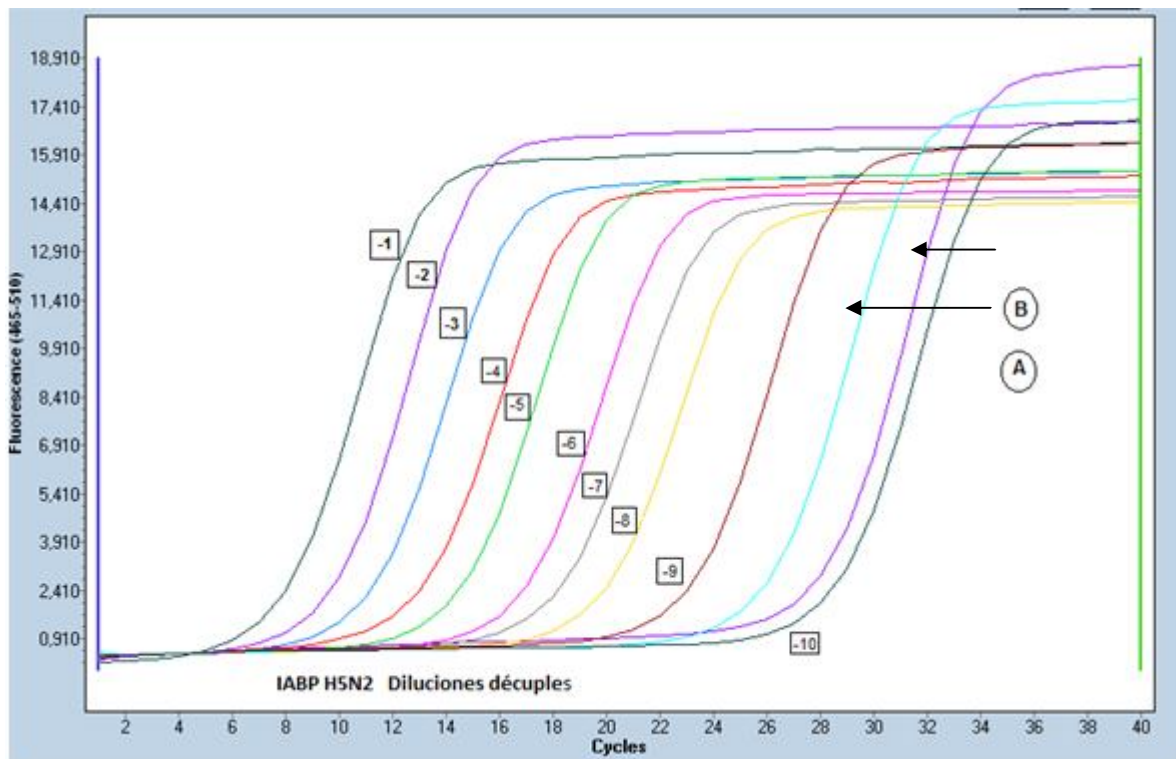
En la Figura [u8]7 se puede observar la amplificación de los genes controles (Diluciones logarítmicas del virus IA) en ciclos muy tempranos, en comparación a la amplificación del aislamiento viral de las muestras de las aves.

Especie	Tipo de muestra inicial	Valor de Ct	DLEP ₅₀ /mL
<i>Parabuteo unicintus</i>	Muestra de hisopado cloacal	23,27	$4.7 \times 10^{4.7}$
<i>Buteo jamaicensis</i>	Muestra de hisopado cloacal	18,63	$4.24 \times 10^{4.7}$

Ct = ciclo umbral.

DLEP₅₀/mL = Dosis letales en embrión de Pollo 50%

Figura 7. Curva de amplificación estándar en RT-PCR en tiempo real con muestras positivas al aislamiento viral.



A= Corresponde a muestra de aguililla cola roja (*Buteo jamaicensis*).

B= Corresponde a muestra de aguililla de harris (*Parabuteo unicintus*).

-1 a -10 = Corresponde a la amplificación de las diluciones decuplas del virus de IABP H5N2 (10^{-1} a 10^{-10}).

5.3 Serología

De las 79 aves muestreadas, 50 resultaron seropositivas para el subtipo H5N2 de IA, es decir, el 63.2% de los sueros presentaron títulos ≥ 16 (Cuadro 8). Por centro de procedencia: en el CIVS “Los Reyes” el 69% es decir 36 de las 52 aves fueron seropositivas al subtipo H5N2 de la IA; mientras que en el zoológico de Zacango el 51%, es decir 14 de 27 aves positivas.

Cuadro 8. Frecuencias Serológicas											
Orden Filogenético	Especie	Título serológico									
		Negativo				Positivo					
		(-)	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	<u>1:64</u>	1:128	1:256	1:512
Psittaciformes	<i>A. macao</i>								1		
	<i>A. militaris</i>							1			
	<i>A. finschi</i>							1			
	<i>A. albifrons</i>						1				
	<i>A. autumnalis</i>						1	5			
Strigiformes	<i>T. alba</i>				1	2					
	<i>B. Virginianus</i>				2	3		1	4	1	
Falconiformes	<i>B. Jamaicensis</i>	2	2		5	1	4	1	1	2	
	<i>P. unicinctus</i>	6	1		3	2	3	2		2	
	<i>C. cheriway</i>	3			1	1	1	2	3	1	1
	<i>A. chrysaetos</i>			1	2						
	<i>B. anthracinus</i>									1	
	<i>F. peregrinus</i>								1		
Total de muestras		11	3	1	14	9	10	<u>13</u>	10	7	1

Como se observó en el Cuadro 8, la mayor frecuencia serológica se presentó en el título de 1:64 (13 sueros) y el título más alto se observó sólo en 1 suero en la dilución 1:512. Para el orden filogenético de Psittaciformes el 100% de las aves fueron seropositivas (10 aves), los Strigiformes el 78.57% (11 de 14 aves) y para los Falconiformes el 52.7% (29 de 55 aves resultaron positivas).

Es importante mencionar que el CENID Microbiología notificó a la SAGARPA-SENASICA los hallazgos y aislamientos; acatando lo establecido por la legislación en la Norma Oficial Mexicana NOM-056-ZOO-1995. Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria (SENASICA, 2014).

5.4.-Determinación de factores de riesgo: Análisis Bivariado.

Los factores de riesgo significativos encontrados que pueden estar asociados a la exposición a IA H5N2 en las aves muestreadas, las cuales presentaron una $P < 0.05$ y un $OR > 1$ fueron: tipo de manejo que se le da a los Psittaciformes ($OR = 1.73$) y el tipo de alimento que se les proporciona (Frutos / Granos) ($OR = 1.58$).

Por el contrario, el factor de protección que se encontró significativo ($P < 0.05$) con un $OR < 1$ fue: el tipo de manejo de los Falconiformes ($OR = 0.6$) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Valores de Chi-cuadrada para los diferentes factores de riesgo por exposición al subtipo H5N2 de IA

FACTOR DE RIESGO	CATEGORÍA	No. TOTAL DE AVES	No. DE SERO-POSITIVAS	OR (ODDS RADIO)	χ^2	P
1.- TIPO DE MANEJO (ORDEN FILOGENÉTICO)	<u>PSITTACIFORMES</u>	10	10	<u>1.73 (FR)</u>	<u>6.64</u>	<u>0.01</u>
	STRIGIFORMES	14	11	1.31	1.71	0.19
	<u>FALCONIFORMES</u>	55	29	<u>0.6 (FP)</u>	<u>8.7</u>	<u>0.00</u>
2.- ALBERGUE	ZOOLÓGICO ZACANGO	27	14	0.48	2.31	0.13
	CIVS "LOS REYES"	52	36	2.09		
3.- PROCEDENCIA	RESCATE	40	28	1.8	1.57	0.21
	ENTREGA VOLUNTARIA	39	22	0.55		
4.- RECINTO	CAJA/JAULA INDIV.	42	26	0.88	0.07	0.79
	RECINTO DE CEMENTO	37	24	1.14		
5.- ESPECIES VECINAS	SI	71	47	3.26	2.55	0.11
	NO	8	3	0.31		
6.- CONDICIONES DE ALBERGUE	ÚNICO / PERCHA INDIVIDUAL	21	16	2.26	2.0485	0.15
	GRUPO	58	34	1.4		
7.- MANEJO	POCO / NULO	46	30	1.22	0.18	0.67
	MANEJO DIARIO	33	20	0.82		
8.- CONDICIONES DE INSTALACIÓN	CONFINADO	47	30	1.06	0.0145	0.55
	EXPUESTA AL AMBIENTE	27	20	0.5		
9.- HÁBITOS ALIMENTICIOS	<u>FRUGÍVORO / GRANÍVORO</u>	<u>10</u>	<u>10</u>	<u>1.58 (FR)</u>	<u>5.53</u>	<u>0.02</u>
	<u>CARNÍVOROS / INSECTÍVOROS</u>	<u>69</u>	<u>40</u>	<u>0</u>		

FR= Factor de riesgo

FP =Factor de protección

OR= Razón de momios

 χ^2 = Chi cuadrada

6. DISCUSIÓN

México es uno de los países con mayor diversidad de aves, pero tiene el inconveniente del tráfico ilegal de especies, este simboliza el segundo negocio ilegal más redituable en el mundo (después del narcotráfico), siendo las aves y sus productos las más comercializables, lo que representa un alto riesgo para la transmisión de enfermedades a nivel mundial (Zamora *et al.*, 2008).

La explosiva y casi simultánea aparición de Influenza Aviar (IA) en múltiples países, ha sido interpretada por organismos sanitarios internacionales como evidencia de la debilidad de los sistemas de vigilancia y alerta temprana para advertir el peligro de introducción y difusión de la enfermedad (Tracey *et al.*, 2004).

En el presente estudio se buscó analizar la presencia de IA en aves silvestres albergadas en centros de rehabilitación.

En este estudio, se obtuvieron dos aislamientos virales replicados en líquido alantoideo de embriones de pollo SPF a partir de muestras de hisopados cloacales. Las muestras corresponden a dos ejemplares del grupo taxonómico Falconiforme: aguililla cola roja (*Buteo jamaicensis*) y aguililla de harris (*Parabuteo unicinctus*). Es remarcable el contraste entre el aislamiento en embrión de pollo y la prueba de RT-PCR en tiempo real, en donde de un total de 48 hisopados orofaríngeos 40 resultaron positivos, mientras que de 46 hisopados cloacales 39 lo fueron.

Las diferencias encontradas en el número de muestras positivas por aislamiento viral y por RT-PCR en tiempo real pueden deberse a que el RT-PCR detecta al genoma viral, cualquiera que sea su estado (partícula viable o no); mientras que el aislamiento muestra la viabilidad del virus en el huésped. Por otra parte, éstas diferencias pudieran también verse influenciadas por la temporada de muestreo, es decir, el reducido período de excreción viral a través de las secreciones orofaríngea y cloacal por 14 días, aunque la concentración del virus alcanza un

máximo a las 24 hrs y empieza a reducirse al cabo de 72 hrs, por lo que las muestras deben ser tomadas en la fase aguda de la enfermedad, lo que dificulta su aislamiento (Webster *et al.*, 1992; Austin and Webster 1993; CENA VECE, 2013). Es importante mencionar que este estudio fue realizado con animales clínicamente sanos y no dirigido a casos clínicos, sino que se realizó un monitoreo general para conocer la distribución epidemiológica de Influenza Aviar en aves albergadas en los centros de rehabilitación (CIVS y zoológico).

El alto número de muestras positivas determinadas por la RT-PCR en tiempo real pueden deberse a la alta sensibilidad que tiene la prueba, para detectar tanto fragmentos de genoma de partículas virales viables y no viables. Un factor importante para la obtención del aislamiento, son las buenas prácticas de manejo posteriores a la toma de muestras, ya que su exposición a temperaturas cálidas puede afectar la viabilidad del virus. En este caso, las muestras se manejaron siempre en cadena fría, sin embargo, las partículas virales son sensibles a cambios de temperatura por ser virus con envoltura lipídica (Talledo *et al.*, 2009).

Probablemente el haber solamente aislado el virus de muestras de hisopados cloacales se debe a que los virus de IABP infectan preferentemente las células epiteliales que recubren el tracto intestinal, los cuales posteriormente son excretados en altas concentraciones en las heces, convirtiéndose en el principal mecanismo de transmisión vía fecal-oral (García *et al.*, 2006; PANAFTOSA *et al.*, 2010; Loza-Rubio *et al.*, 2012). En relación a ello, la transmisión respiratoria representa menos importancia para las aves, aunque posiblemente esta vía tenga un rol importante en algunas especies, particularmente las que viven en tierra (aves domésticas de producción) (CFSPH, 2010; Morens *et al.*, 2012). No obstante, aislamientos recientes de virus del linaje asiático H5N1 (IAAP) han sido encontrados en mayores cantidades en las secreciones respiratorias, que en las heces. Esto sugiere que al menos en algunas aves silvestres, éstas cepas ya no son transmitidas primariamente por la vía fecal - oral (Fouchier *et al.*, 2009). [u10]

En patos silvestres los virus de Influenza A se replican preferentemente en las células que recubren el tracto intestinal, no causan signos de enfermedad y se

excretan en grandes concentraciones en las heces (hasta $10^{8.7}$ dosis infectante en embrión de pollo 50%/g; (Webster R. *et al.*, 1992). En un estudio llevado a cabo por la CPA en México (año 2004), se estableció la técnica de RT-PCR para la detección del virus de Influenza Aviar en tejidos de aves infectadas experimentalmente, previamente fue titulado el virus en embriones de pollo de 9-11 días, donde se obtuvo y fue determinado el título viral de $10^{8.7}$ dosis letales en embrión de pollo al 50% ($DLEP_{50}$ /mL) del subtipo H5N2 de IAAP: A/Ck/Querétaro/20/95 (Padilla *et al.*, 2004).

En cuanto a los resultados de la prueba de titulación viral obtenidos en el presente estudio, los virus aislados del líquido alantoideo de embriones de pollo (EP) inoculados con muestras de hisopados cloacales, presentaron títulos de $4.7 \times 10^{4.7}$ (aislado de un *Parabuteo unicinctus*) y $4.24 \times 10^{4.7}$ (aislado de *Buteo jamaicensis*), estas cantidades representan un título menor al encontrado en el virus de referencia IABP subtipo H5N2 ($10^{11.7} DLEP_{50}$ /mL) inoculado experimentalmente, es decir, que las $DLEP_{50}$ /mL de los virus aislados de aves silvestres representan cantidades menores de dosis letales requeridas para matar el 50% de ejemplares inoculados (Embrión de pollo).

Algunos otros estudios realizados por diferentes autores, también notifican una baja frecuencia de aislamientos virales, en relación a la positividad de las muestras en RT-PCR. En el año 2006, en la zona costera de Noreste de Alemania se examinaron un total de 1,991 muestras de heces frescas de aves acuáticas, para determinar la presencia del virus de IA, los resultados obtenidos de la prueba de RT-PCR en tiempo real determinó 11 aves positivas (0.9 %) de 1,268 (gansos y cisnes), al ser inoculadas las muestras en embrión de pollo, sólo se obtuvieron dos aislamientos virales del subtipo H5N2 de IABP (Mettenleiter, 2006). De manera parecida un estudio en aves silvestres acuáticas en Noruega (período 2008 - 2009), las pruebas serológicas determinaron que el 70 % de las aves adultas habían desarrollado anticuerpos contra el virus de Influenza, a pesar de ello únicamente se obtuvo un aislamiento viral de una gaviota (*Rissa tridactyla*) (Tonnessen, 2013). En ambos estudios dejan claro la epidemiología y la

adaptación del virus de IA para no causar signos clínicos relevantes en los hospedadores.

La serología tiene la ventaja de revelar evidencias de infección durante mayor tiempo respecto a las técnicas virológicas, en consecuencia, ofrece mayores oportunidades de detección en los individuos infectados (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

Para la determinación de las frecuencias serológicas de cada ejemplar aviar se utilizó la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, que proporciona información de valor *ante mortem* sobre la dinámica de infección del virus de Influenza en aves; sin embargo, genera poca explicación sobre la infección clínica en los animales, por lo que detecta el nivel de anticuerpos ante la exposición con el antígeno, pero no necesariamente la presencia de la enfermedad (Janke, 2000).

En el presente estudio realizado, la exposición al subtipo de Influenza A/H5N2 representó que 50 sueros de 79 aves fueron positivos, es decir el 63.3%. En cuanto al orden filogenético correspondió a lo siguiente: 20% fueron Psittaciformes (10 aves), 22% Strigiformes (11 aves) y el 58% Falconiformes (29 aves). Los títulos positivos registrados de estas aves, representan como valor de título mínimo encontrado de 1:16 (9 sueros), el valor de frecuencia más repetido fue de 13 sueros con 1:164 y el valor máximo fue de un ave del orden falconiforme (*Falco peregrinus*) con un título de 1:512.

La razón que probablemente pueda explicar estos resultados, es que los ejemplares seropositivos durante su vida libre o incluso en cautividad, cazaron o recibieron como alimento aves de producción vivas, que pudiesen ser hospedadoras de algún subtipo del virus de influenza aviar, ya que es importante tener en cuenta que hay regiones del territorio mexicano donde aún no ha sido posible la erradicación del virus de IA en su forma patógena (IAAP). Esporádicamente en zoológicos y centros de rescate se alimenta a las aves de presa con carne de pollo fresca, que procede de planteles avícolas, la cual no es

sometida a ningún análisis para[u11] Influenza A u otra enfermedad antes de ser entregada como alimento (González *et al.*, 2012). Un estudio realizado por la Universidad Autónoma de Barcelona, España, demostró experimentalmente que los halcones híbridos gyr – sacre (*Falco rusticolus x Falco cherrug*) son altamente susceptibles a la infección por el virus H5N1 de la gripe Aviar, desempeñando así un papel importante en la propagación de los virus, ya que lograron por primera vez con éxito la infección natural al alimentar a las aves (halcones híbridos) con presas infectadas experimentalmente con virus de IABP e IAAP, con ello se demuestra que el adquirir aves de presa silvestres para cetrería o como mascotas, propicia una situación de riesgo para el ser humano (Bertran *et al.*, 2012).

Una hipótesis sobre la seropositividad de las aves, va dirigida al análisis y descripción del tipo de albergue de las aves, ya que pueden existir factores que pudieran influir a la transmisión de IA. En los centros de rehabilitación los ejemplares en su mayoría están separados por tipo de especie y basado en ello las instalaciones son diferentes para satisfacer al mínimo las necesidades de vuelo y de espacio; por ejemplo para el albergue de las aguilillas de harris (*Parabuteo unicinctus*) las medidas oscilan entre 10m x 5m aproximadamente, para los de la especie caraca (*Caracara cheriway*), aguilillas cola roja (*Buteo jamaicensis*), lechuza de campanario (*Tyto alba*) y búho real (*Bubo virginianus*); las instalaciones cuentan con medidas aproximadas por albergue de 4 x 4 m.

En el caso específico de aves que están albergadas individualmente en una jaula o caja transportadora (como es el caso de la mayoría de Psittaciformes, el halcón peregrino (*Falco peregrinus*), tecolote oriental (*Megascops asio*) y tecolote rítmico (*Megascops trichopsis*), éste tipo de instalación es para albergar solamente un ejemplar, son pequeñas, metálicas y contienen aditamentos plásticos para ofrecer el agua de bebida y alimento. Comúnmente las aves son acomodadas contiguamente, dejando así que los ejemplares en posiciones cercanas, unos con otros, resaltando aquí que cada ave tiene diferente origen geográfico, procedimiento de traslado y manejo sanitario previo a ser albergado. Esta situación expone a ejemplares sanos a adquirir el virus de IA de aves vecinas, a

través del contacto directo con secreciones de aves hospedadoras del virus de IA (DGVS, 2010).

Un hecho documentado, describe que al hacerse un monitoreo virológico de rutina en aves importadas a Japón, se aislaron dos virus de IA en embriones de pollo inoculados con muestras de periquitos cuello anillado (*Psittacula krameri manillensis*) importados de Pakistán. El primer virus, A / perico /Chiba/1/97, se aisló de la tráquea de un pájaro que murió en una tienda de animales dentro de los 10 días posteriores a ser importadas, en marzo de 1997. El segundo virus, A / perico /Narita/92A/98, también aislado de órganos respiratorios, provino de un ave que murió en la estación de cuarentena del aeropuerto de Narita, en Japón, en junio de 1998; ambos aislados fueron identificados mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación convencional como virus de la gripe A del subtipo H9N2 (Mase *et al.*, 2001).

El estar en contacto estrecho con la instalación, aunado con la cualidad del virus para sobrevivir en diferentes fómites, puede ser que los ejemplares absorban las partículas virales directamente del fómite (García *et al.*, 2006; PANAFTOSA *et al.*, 2010; Loza-Rubio *et al.*, 2012; González *et al.*, 2012). Uno de los factores en común en diferentes tipos de albergue es la presencia de vehículos que pudieran diseminar partículas de virus de una instalación a otra, un ejemplo son los insectos, caso particular de las moscas, que pueden diseminar partículas virales a través del contacto directo (CFSPH, 2010).

Otra hipótesis del modo en que pudieron estar expuestas las aves a IA previamente a ser ingresadas a un centro de rehabilitación de fauna, es el comportamiento de las aves en vida silvestre, ya que para algunas aves es normal el volar largas distancias para migrar en invierno, reproducirse o anidar en diferentes sitios (CONABIO, 2014). De ahí que pueden intercambiar virus con otras poblaciones en los sitios donde realicen escalas o paradas, incluyendo los lugares donde pasan el invierno (CFSPH, 2010).

Por ejemplo, en el caso de los ejemplares de aguilillas cola roja (*Buteo jamaicensis*) y aguilillas de harris (*Parabuteo unicinctus*) se distribuyen en México desde Baja California y el límite norte de México hacia el sur hasta Veracruz y Chiapas. Migrando en épocas de apareamiento hacia el norte y en invierno para la época de anidación se trasladan al sur del país (CONABIO, 2014). Un ejemplo de lo ya descrito, está documentado en un estudio realizado en Minnesota, E.U. A durante el período 2007 y 2008, donde se obtuvo dos aislamientos del virus de IA (H13N9) en pelícanos blancos americanos (*Pelecanus erythrorhynchos*), al analizar la partícula viral genéticamente se demostró que el primer virus estaba relacionado con el virus de IA en gaviotas y aves costeras en América del Norte y el segundo virus presentaba un linaje relacionado con los virus de Eurasia. Lo que demuestra el movimiento global de los virus y la recombinación de ellos en diferentes especies de aves (Lebarbenchon *et al.*, 2010).

Los tres requisitos que deben estar presentes para la transmisión de patógenos causantes de enfermedades respiratorias entre animales es: 1.- la excreción del agente viral por animales infectados, 2.- concentración crítica del virus en secreciones y excreciones del hospedador y 3.- el contacto entre animales susceptibles y el agente causal (Maes, 1997).

Hay una gran variedad de aves que ingresa a los centros de rehabilitación por diferentes vías: por ejemplo, las entregas voluntarias a través de particulares, brigada de protección animal (H. cuerpo de bomberos) o bien por conducto de decomisos de la PROFEPA (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente) y de la UEIDAPLE (unidad dependiente de la PGR), en todos estos diferentes casos se desconoce la información sobre el tipo de manejo que se le dio al ejemplar antes de su ingreso al centro (DGVS, 2010).

En este estudio los factores de riesgo asociados a la exposición de IA subtipo A/H5N2 encontrados, fueron los que presentaron valores de riesgo relativo mayor a 1 (OR>1 y P<0.05): tipo de manejo que se le da a los Psittaciformes (OR = 1.73)

y el tipo de alimento que se les proporcionan (frutos / granos) (OR = 1.58). Por lo contrario, el factor de protección encontrado fue el tipo de manejo de los Falconiformes (OR = 0.6).

Los Psittaciformes son la especie que más comúnmente se comercializa ilegalmente en México (65,000 a 78,500 ejemplares anualmente). El proceso implica la extracción directa de la vida silvestre (estrés), traslado y distribución en condiciones de hacinamiento con ejemplares enfermos, todo esto antes de llegar al consumidor y posteriormente su ingreso a los centros de albergue (CIVS/zoológico). En el proceso se presenta una mortalidad del 77%, los ejemplares sobrevivientes quedan susceptibles a agentes patógenos virales, ya que sus sistema inmune se encuentra disminuido, sumado a esto la mayoría de las veces el dueño no les proporcionan condiciones de albergue, alimento o manejo sanitario adecuado (DGVS, 2010; Cantú *et al.*, 2014).

El manejo que se proporciona a estos ejemplares en un CIVS, es el alojarlos en recintos individuales (jaula), relativamente pequeño, lo que puede provocar que el ave tenga estrecho contacto con su albergue. Algunas veces en este tipo de recintos no se aplican efectivamente normas de bioseguridad, tales como, el aislamiento de las nuevas aves (cuarentena), limpieza y desinfección de las jaulas; el resultado de ello es la sobrevivencia de las partículas virales en el albergue (Alfonso, 2010; PANAFTOSA *et al.*, 2010; González *et al.*, 2012).

El siguiente factor de riesgo significativo correspondió al tipo de alimento que se les proporciona, que presentó 0.58 más posibilidades de ser positivo al virus de Influenza respecto a las demás categorías analizadas. Este factor no incluye como tal a lo que comen, sino que va enfocado a las prácticas de manejo de estos alimentos, antes de ser proporcionado e ingerido. Describiendo un poco, el hecho de preparar el alimento incluye un número variado de personal que realice esta práctica, desde el momento en que se corta el alimento (frutos), se sirve en los utensilios plásticos y se distribuye a cada uno de los ejemplares. Esto es importante ya que puede existir la posibilidad del transporte del virus, al tener contacto directo y/o dispersión de éste a través del humano (participando como

vehículos transmisores) ya que una misma persona puede tener contacto directo con secreciones / heces de enfermos, materiales (utensilios dentro de la jaula), semillas, agua, equipo y ropa contaminados, todo esto previo a alimentar a un ejemplar (García *et al.*, 2006; OIE, 2013).

El manejo en general que se les da a los ejemplares del orden filogenético Falconiforme, en este estudio fue considerado como un factor de protección para la positividad serológica del virus de Influenza Aviar, ya que se disminuye hasta un 40% las posibilidades de adquirir el virus de IA.

Este tipo de aves en los CIVS se les considera como las especies con mayor éxito para la rehabilitación (física, conductual y clínica) y la liberación en el medio silvestre. La mayoría de las aves de presa necesitan un manejo de rehabilitación específico, el manejo está dirigido en cuidar el aspecto de que el ejemplar en lo posible debe permanecer aislado y evitando así cualquier fuente de estrés (no toleran la presencia humana ni la manipulación). Uno de los procedimientos comunes es el ingresar a los ejemplares en una cámara de muda (cámara cubierta con plástico oscuro en su interior y exterior, para aislar el ruido, factores ambientales) y la asignación de un percha o posadero individual (DGVS, 2010).

Una característica igualmente importante de manejo de estas aves, es el tipo de alimento que se les proporciona, es decir no se les alimenta con aves vivas, aspecto que evita el factor de riesgo de ingerir carne o vísceras infectadas con virus de IA. Un ejemplo de ello fue lo ocurrido en la clínica Falcon Al Safa en Dubai, Emiratos Árabes, a la cual se ingresó un halcón peregrino (*Falco peregrinus*) y posterior a las 48 hrs. de ser hospitalizada murió a pesar de la atención y del tratamiento proporcionado. El halcón de 2 años, por ser un ave utilizada para cetrería, antes de su muerte había estado en un viaje de caza en Siria con su dueño. El cadáver fue sometido a un examen post-mortem, y las investigaciones dieron como resultado el aislamiento de un subtipo H7N3 del virus de IA (Manvell, *et al* 2000).

El dar éste tipo de manejo a estas aves de alguna manera evita o disminuye posibilidades de exposición hacia los virus de IA. Es decir, en éste procedimiento se observa que una enfermedad no sólo está influenciada con la presencia de agentes infecciosos específicos, sino también por la compleja interacción entre los factores relacionados al agente, al hospedador y al ambiente (Jaramillo y Martínez, 2010; *CENAVECE*, 2013).

En estudio realizado en aves de presa, durante dos temporadas de caza (2006/2007 y 2007/ 2008) en Alemania, los cetreros tomaron hisopos traqueales y cloacales de 1.080 aves de presa que fueron capturados por sus aves de cetrería (un total de 54 aves). Al realizar la prueba de RT-PCR detectaron que 74 gaviotas, es decir, el 4.1 % y 53 patos (3.8 %) fueron positivas a Influenza Aviar (subtipos H6, H9, o H13). Las pruebas de serología realizadas a las aves de cetrería resultaron negativas para virus de Influenza Aviar, al igual que las muestras de suero de los 43 cetreros resultaron positivos para Influenza A en la prueba de ELISA, pero siendo negativos a la prueba microneutralización contra los subtipos H5 y H7 y la inhibición de la hemoaglutinación contra los subtipos H6, H9 y H13. En conclusión el estudio demostró la participación de las aves acuáticas como reservorios para los virus de IA, en cambio las aves de caza y los cetreros no parecen tener un alto riesgo de contraer el virus al tener contacto con las presas de caza (Kohls *et al.*, 2011).

7. CONCLUSIONES

En conclusión, en este estudio se observó la prevalencia de Influenza Aviar subtipo H5N2 en aves silvestres del orden filogenético Psittaciformes, Strigiformes y Falconiformes, indicando una circulación viral activa en los centros de rehabilitación de fauna silvestre muestreados. El principal factor de riesgo para la exposición de las aves es la constante movilización e introducción de animales sanos y/o enfermos dentro de ambos centros de conservación. Es importante resaltar que las aves de las cuales se obtuvo el aislamiento viral no presentaban signos clínicos visibles, por ello, se debe considerar en la manera de lo posible el implemento de vigilancia cuarentenal para los ejemplares de nuevo ingreso. Este estudio representa la primera notificación del virus de Influenza en este tipo de aves en México.

8. RECOMENDACIONES

Se debe promover información sobre los riesgos para la salud de la población humana y animal, al seguir participando en el tráfico ilegal de especies, al comprar ejemplares extraídos del medio silvestre. También es importante incrementar el monitoreo serológico para los subtipos de Influenza circulantes en los centros de rehabilitación, pues una detección y confirmación diagnóstica de casos son fundamentales para asegurar un tratamiento adecuado y oportuno, y así evitar la propagación y la mutación del agente viral en otras especies. Por lo tanto, se debe considerar un manejo sanitario adecuado en las instalaciones, hacer uso de la correcta desinfección y en la manera de lo posible poner en vigilancia (cuarentena) los nuevos ejemplares a ingresar. Es importante se capacite el personal para que conozca el papel de las aves silvestres como reservorios naturales de Influenza, factores de riesgo asociados a la enfermedad y la aplicación de las medidas de bioseguridad y manejo para reducir en gran medida la transmisión de los virus de Influenza Aviar.

9. REFERENCIAS

Alfonso P. Amenazas y oportunidades de reducción de riesgos por virus Influenza en la interfase animal hombre. *Revista Salud Animal*. 2010. 32(1): 1-10.

Anderson M, Nelson A. Enfoque en epidemiología de campo. North Carolina Center for Public Health Preparedness-The North Carolina Institute for Public Health. Vol. 3 Núm. 6. Acceso: http://cphp.sph.unc.edu/focus/vol3/issue6/3-6DataTests_espanol.pdf

Austin F. and Webster R. Evidence Of Ortho- And Paramyxoviruses In Fauna From Antarctica. *Journal of Wildlife Diseases*. 1993, 29(4): 568-571.

Bertran K, Busquets N, Abad FX, García de la Fuente J, Solanes D. Highly (H5N1) and Low (H7N2) Pathogenic Avian Influenza Virus Infection in Falcons vía Nasochoanal Route and Ingestion of Experimentally Infected Prey. *PLoS ONE*. 2012. 7(3); 32107 – 32109.

Bustin S. and Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*. 2005. 109: 365–379.

Cantú J., Sánchez M., Grosselet M. y Gámez J. Tráfico Ilegal de Pericos en México. *Defenders of Wildlife de México & Teyeliz, A.C.* [Pub. en línea] <<http://www.pericosmexico.org/>> [Fecha de acceso Marzo 2014].

Cao L., Liao L., Liao M., Jiao P., Song Y., Yuan R. and Wei L. Complete Genomic Sequence of an H5N1 Influenza Virus from a Parrot in Southern China. *Journal Virology*. 2012, 86(16): 8894.

Cárdenas E. Influenza Aviar ¿Una Amenaza Para El Ser Humano?. Tesis de Licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana De San Nicolàs De Hidalgo, Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia. 2006:4-6.

Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE). Influenza Aviar. [Pub. en línea]. <<http://www.cenavece.salud.gob.mx/-emergencias/interior/flu-aviar.htm>> [fecha de acceso 20 de Sep. 2013].

Choi J., Kang H., Jeon W., Choi K., Kim K., Song B., Lee H., Kim J. and Lee Y. Characterization of Clade H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses Isolated from Wild Birds (Mandarin Duck and Eurasian Eagle Owl) in 2010 in Korea. 2013. 5(4): 1153-1155

Claas E., Osterhaus A., Van B., De Jong J., Rimmelzwaan G. & Senne D. Human Influenza A H5N1 virus related to a HPAI virus. Lancet. 2002: 472-477.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Listado de Aves – México. 2014. [Pub. en línea] <http://avesmx.conabio.gob.mx/lista_ave> [Fecha de acceso Marzo 2014].

Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). Sistema Meteorológico Nacional (SMN). [Pub. en línea]. <<http://www.http://smn.cna.gob.mx>> [fecha de acceso 7 Febrero del 2014].

Cox N. & Subbarao K. Influenza. Lancet 1999; 354: 1277-1282.

Dabanch P. Zoonosis. Revista Chilena de Infectología. 2003, 20 (1): 47 – 51.

De Irala J, Fernandez-Crehuet R, et al. Intervalos de confianza en regresión logística: interpretación de resultados de programas estadísticos. Rev. Panam. Salud Pública/Pan. Am. J. Public Health 1997; 1(3): 230-233.

Dennis J. A review of avian Influenza in different bird species. Vet. Microbiol. 2000, (74): 3-13.

Dirección General de Vida Silvestre (DGVS). Manual de rehabilitación de aves de presa en los Centros para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS). SEMARNAT. 2010; 1ra edición: 18 -39.

Fouchier R. and Munster V. Epidemiology of low pathogenic avian Influenza viruses in wild birds. *Rev. Sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2009, 28 (1): 49-58.

Furuse Y., Suzuki A., Kamigaki T. and Oshitani H. Evolution of the M gene of the Influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis. *Virology Journal*. 2009. 6(67): 1-2.

García F. Enfermedades Infecciosas emergentes: interacción entre el mundo microbiano y las sociedades humanas. *Acta médica. Costarricense*. 2008, 50 (3): 136-143

García J., Ramos C. La Influenza, un problema vigente de salud pública. *Salud Pública Méx*. 2006: 48:244-267.

García M., Crawford J., Latimer J., Rivera-Cruz E. & Perdue M. Heterogeneity in the hemoagglutinin gene and emergence of highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian Influenza viruses from México. *Journal of General Virology*. 1996, (77): 1493-1504.

Gherzi B., Blazes D., Icochea E., Gonzalez R., Kochel T., Tinoco Y., Sovero M., Lindstrom S., Shu Bo., Klimov A., Gonzalez A., and Montgomery J. Avian Influenza in Wild Birds, Central Coast of Peru. *Emerging Infectious Diseases*. 2009, 15 (6): 935 - 938.

González A., Gaete Á., Moreno L., Ardiles K., Cerda F., Mathieu C., Ortega R. Anti-cuerpos séricos contra la enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar en aves rapaces de Chile. *Revista de MVZ Córdoba*. 2012, 17(3): 3119-3123.

Hause B., Ducatez M., Collin E., Ran Z., Liu R., Sheng Z., Armien A., Kaplan B., Chakravarty S., Hope A., Wbly R., Simonson R. and Li F. Isolation of a novel swine Influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human C viruses

Hawkins M., Crossley B., Osofsky A., Webby R., Lee C., Suarez D. and , Hietala S. Avian Influenza A virus subtype H5N2 in a red-lore Amazon parrot. Journal of the American Veterinary Medical Association. 2006. 228(2): 236-241.

Hénaux V. and Samuel M. Avian Influenza Shedding Patterns in Waterfowl: Implications for Surveillance, Environmental Transmission, and Disease Spread. Journal of Wildlife Diseases. 2011, 47(3): 566–578.

Janke BH. Diagnosis of swine Influenza. Swine Health Prod J 2000; 8 (2): 79-84.

Jaramillo C. y Martínez J. Epidemiología Veterinaria. Manual moderno. 2010, 1ra edición: pp 52 -70.

Jiménez L. Desarrollo de un Biológico contra Influenza Porcina y Evaluación en un modelo *in vivo* de su respuesta inmune para uso potencial en cerdos. Posgrado en Salud Animal Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2012: (1). 6 - 12.

Kim H., Park C., Oem J., Bae Y., Choi J., Lee O. and Lee Y. Characterization of H5N2 Influenza viruses isolated in South Korea and their influence on the emergence of a novel H9N2 Influenza virus. Journal of General Virology. 2010: 91(1). 13836–13837.

Kohls A., Mohamed H., Harder t., Jansen A., Lierz P., Lüschow D. Avian Influenza virus risk assessment in falconry. Virology Journal. 2011, 8(187): 2-4.

Lebarbenchon C., Sreevatsan S., Ramakrishnan M., Poulson R., Goekjian V., Di Matteo J., Wilcox B. and Stallknecht D. Influenza A Viruses in American White Pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). Journal of Wildlife Diseases. 2010, 46(4): 1284–1289.

Loza E., Diosdado F., Vargas A., Hernández A., Banda V., Morilla A., y García J. Diagnóstico serológico de Influenza Aviar por medio de una técnica de

microinmuno-difusión (midg) en agar. *Técnicas Pecuarias Méx.* 2012. (35)3: 166-168.

Maes D. Risk indicators for the seroprevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in slaughter pigs from farrow to finish pig herds. *Epidemiologie et Santé Animale*. 1997. 8(187): 31-32.

Manvell R., McKinney P., Wernery U. and Frost K. 1 Isolation of a highly pathogenic Influenza A virus of subtype H7N3 from a peregrine falcon (*Falco peregrinus*). *Avian Pathology Journal*. 2000, (29): 635– 637.

Martin V., Forman A. y Lubroth J. Preparándose para la Influenza Aviar altamente patógena. Organización Mundial de Salud Animal (OIE). 2007, (1): 6-12

Mase M., Imada T., Sanada Y., Etoh M., Sanada N., Tsukamoto K., Kawaoka Y. and Yamaguchi S. Imported Parakeets Harbor H9N2 Influenza A Viruses That Are Genetically Closely Related to Those Transmitted to Humans in Hong Kong. *Journal Virol.* 2001. 75(7): 3490- 3493.

Mettenleiter T. Active Surveillance for Avian Influenza Virus Infection in Wild Birds by Analysis of Avian Fecal Samples from the Environment. Instituto Friedrich Loeffler. 2006, [Pub. en línea] <<http://www.madrimasd.org/informacionidi/noticias>>.

Morens D. and Taubenberger J. 1918 Influenza, a Puzzle with Missing Pieces. *Emerging Infectious Diseases*. 2012, 18(2): 332 -334.

Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng H, Kawaoka Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in Influenza A virus particles. *Nature* 2006; 439: 490-492.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Confirman brote de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad subtipo H7N3 en Jalisco, México. 2012. [Pub. en línea]

<<http://www.rlc.fao.org/es/prensa/noticias/confirman-brote-de-influenza-aviar-de-alta-patogenicidad-tipo-h7n3-en-jalisco-mexico/>> [Fecha de acceso Marzo 2014].

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Situación en el Continente Americano: Influenza Aviar. 2007, [Pub. en línea] <http://www.rlc.fao.org/es/prioridades/transfron/aviar/paises/mexico.htm> [Fecha de acceso Marzo 2014].

Organización Mundial de sanidad animal (OIE). Fichas de información general sobre enfermedades animales Influenza Aviar. [Pub. en línea] <www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/AI-ES.pdf> [Fecha de acceso 24 de Agosto 2013].

Padilla R., Fernández E., Cachon M. y Noriega L. Influenza aviar: Histopatología y detección viral por RT-PCR en tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina. Vet. Méx. 2004: 35(1): 6-9.

PANAFTOSA, OPS y OMS. Diagnóstico de virus de Influenza en mamíferos y aves. Rio de Janeiro 2010.

Pannwitz G., Wolf C. and Harder T. Active Surveillance for Avian Influenza Virus Infection in Wild Birds by Analysis of Avian Fecal Samples from the Environment. Journal of Wildlife Diseases. 2009, 45(2): 512–518.

Polo G. Aspectos moleculares del virus de la Influenza A subtipo H1N1. Rev. Med. Vallejana 2009. 6(1): 48-51.

Saavedra C. Influenza Aviar, aves acuáticas y ecosistemas productivos. Wildlife Conservation Society. 2010. 1ra edición: 16 -22.

Saggese M. Medicina de la conservación, enfermedades y aves rapaces. Hornero. Revista Bio-médica 2007, 022 (02): 117-130.

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. 1996. NORMA Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar. Diario Oficial de la Federación (DOF9), Febrero 2014.

Secretaria De Agricultura, Ganaderia Y Desarrollo Rural. 1999. NORMA Oficial Mexicana NOM-056-ZOO-1995, Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria. Diario Oficial de la Federación (DOF9), Febrero 2014.

SENASICA, DINESA y GEESA. Manual de procedimientos para la prevención, control y erradicación de la Influenza Aviar de alta patogenicidad (IAAP). SAGARPA. 2011.

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Manual de Procedimientos: Influenza Aviar [Pub.] < www.senasa.gov.ar > [fecha de acceso Enero 2014].

Simonsen L. The global impact of Influenza on morbidity and mortality. *Vaccine*. 1999. 1(17): 4-7.

Soriano L. Monitoreo de Influenza Aviar en aves silvestres en humedales de la República Mexicana. Tesis de Maestría en Ciencias de Biomédica. IPN. México, D.F. 2009: 1. 12 -24

Spackman E, Senne AD, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, et al. Development of a realtime reverse transcriptase PCR assay for type A Influenza virus and the avian H5 and H7 hemoagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* . 2002. 40: 3256-3260.

Stärk DCK. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine-A literature review. *Vet J*. 2000. 159: 37-56.

Suzuki Y. Recent research on Influenza virus receptor and the mechanism of its host range mutation. *Glycoforum*. 2013. [Pub. en línea] <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/glycomicrobiology/GM10/GM10E.html>> [Fecha de acceso Enero 2014].

Talledo M. y Zumaeta K. Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1. Rev. peru. biol. 2009. 16(2): 228-231.

Taubenberger J., Morens D. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. Emerging Infectious. 2006. 12: 15-22.

The center for food security & public health (CFSPH). Influenza Aviar de alta patogenicidad. College of veterinary Medicine Iowa state university Ames. Última actualización: Enero de 2010. 3: 2-7.

Thrusfield M. Demonstrating association. Veterinary Epidemiology. Ed. Butterworth Heinemann. 1991. 1:141.

Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., Chen Li., Johnson A., Tao y., Dreyfus c., Yu W., McBride R., Carney P., Gilbert A., Chang J., Guo Z., Davis C., Paulson J., Stevens J., Rupprecht C., Holmes E., Wilson I. and Donis R. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. PLoS Pathog. 2013, 9(10): 1003657.

Tønnessen R. Influenza virus in wild birds in Norway. Norwegian School of Veterinary Science. 2013. [Pub. en línea] www.sciencedaily.com/releases/2013/09/130911093051.htm [Fecha de acceso Enero 2014].

Tracey J., Woods R., Roshier D., West P. and Sauders R. The Role of wild birds in the transmission of avian Influenza for Australia: an ecological perspective. Emu. 2004. 104: pp 109 -124.

Valdez R. Pandemia de gripe en Sinaloa, 1918 – 1919. Elementos. 2002. (47): pp. 37–43.

Ventocilla K., Icochea E., Gonzales R. González A. Presencia del virus de la Enfermedad de Newcastle en Aves silvestres de una Laguna albúfera cercana a Lima. Revista de Investigación Veterinaria. Perú. 2011. 22(1): 39-44.

Viesca T. Medicina prehispánica de México. Panorama Editorial. 2001.1: 49-50.

Webster R., Bean W., Gorman O., Chambers J. and Kawaoka Y. Evolution and Ecology of Influenza A. Microbiological Reviews. 1992. 56(1): 45-47.

Zamora A., Percedo M., Abeledo M. y Noda J. Algunas pautas para establecer Una estrategia de vigilancia epidemiológica de La Influenza Aviar. Revista de Salud Animal. 2008. 30 (2): 69-77.

10. ANEXOS

10.1 Formato de registro de aves muestreadas.

LUGAR DE TOMA DE MUESTRA:	CMS "Los Reyes"
FECHA:	25 de Septiembre 2013
HORA:	06:00 a.m.

LUGAR DE TOMA DE MUESTRA:	CMS "Los Reyes"
FECHA:	25 de Septiembre 2013
HORA:	06:00 a.m.

ID. de la muestra	ID. del individuo	Muestra Sangre	Hisopados		Especie	Nombre común	Sexo	Lugar y Fecha de procedencia		Alimentación		Condiciones	Tipo de manejo
			Orofaringea	Cloacal				Frugivoro	Carnívoro	Albergue			
01H	SB.001	Sí	Sí	Sí	<i>Eutecciorhinus</i>	Aguilla cola roja	Macho adulto	Aseguramiento PGR en Méx. 2009.	Sí	Percha individual, en cámara de muda.	Poco manejo		

EJEMPLO

10.2 Protocolo para la RT – PCR en tiempo real

a) Materiales y equipo.

- Campana para PCR
- Micropipetas 1-1000 µl y puntas con filtro
- Termociclador Light Cycler 480
- Gradilla fría para tubos de PCR
- Gradilla de 96 tubos
- Placa de 96 pozos y placa adhesiva Light Cycler 480
- Mica adhesiva Light Cycler 480
- Kit Ag Path-ID™ OneStep RT PCR 100 rx

b) Partidores y sondas para la RT-PCR en un paso

- Iniciador Inf+ Fw 5´ AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG 3´ (Escala de síntesis 50 nmol; Purificación: Desalados)
- Iniciador Inf- Rv 5´ TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG 3´ (Escala de síntesis 50 nmol; Purificación: Desalados)
- Sonda InA-M 5´- FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA –BHQ1- 3´(Escala de síntesis 1000nmol; Purificación: HPLC)

c) Muestras controles

- Control positivo: ARN del Virus influenza A.
- Control Negativo: Agua libre de nucleasas.

Procedimiento:

1. Colocar los reactivos contenidos en el Kit Ag Path-ID™ OnStep , en hielo.
2. Una vez descongelados se vortexean los reactivos.

3. Colocar las muestras de ARN problema en una gradilla sobre hielo en el orden deseado, facilitando la adición de las muestras en la placa de RT PCR.
4. Colocar la placa de RT-PCR en una platina congelada para mantenerla fría.
5. Preparar la mezcla de reacción en el orden designado en un vial estéril de 2ml. (Hacer cálculo previo para el número de reacciones requeridas (1rx por pozo de placa a utilizar))

En el siguiente cuadro se observa el volumen requerido por cada reactivo a utilizar del Kit Ag Path-ID™ OneStep para una Reacción.

Reactivos	µl
Agua libre de nucleasas	0.29
Buffer 2X	6.25
potencializador	0.835
25x Mezcla de enzimas RT-PCR	0.5
Primer de partida	0.25
Primer de reversa	0.25
Sonda	0.125

6. Vortexear y centrifugar a 20 seg.
7. Colocar 8.5 µl de la mezcla anterior en cada pozo.
8. Colocar los controles (+) y (-) en las últimas dos posiciones de la placa.
9. Una vez cargada toda la placa, deberían cubrirse los pozos con una mica adhesiva LightCycler 480.

10. Cubrir adicionalmente con papel aluminio, para posteriormente centrifugarse a 750 rpm durante 1 minuto.

11. Mantener la placa cubierta de aluminio sobre la platina fría, durante el transporte.

NOTA I: La placa debe cargarse en un sitio con la mínima luz que permita depositar los reactivos correctamente, esto para evitar la inactivación de algunos componentes de los reactivos.

NOTA II: En caso que no se corra la placa el mismo día debe ser almacenada una temperatura de -20°C hasta su uso y no más de 7 días. (Antes de ser usada debe de centrifugarse nuevamente).

(PANAFTOSA *et al.*, 2010; FAO, 2012)

10.3 NOTIFICACIÓN DE RESULTADOS A SENASICA-SAGARPA

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



ELR
inifap
Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal

Dirección

JAG.003.E.038

Asunto: Aislamientos de virus de influenza aviar

Marzo 6 de 2014

DR. PEDRO BRAJCICH GALLEGOS
DIRECTOR GENERAL DEL INIFAP
PRESENTE

Por este conducto hago de su conocimiento que un grupo de investigadores, encabezados por la Dra. Elizabeth Loza Rubio, lograron tres aislamientos de virus de influenza aviar caracterizados como pertenecientes al tipo H5N2 de baja patogenicidad. Dos de los aislamientos correspondieron a muestras de aves rapaces y el tercero a muestras procedentes de un mono araña.

Estas investigaciones se realizan dentro del proyecto "Estudio genómico de los virus de influenza porcina y aviar y sus posibles implicaciones en una salud" que se realiza en el CENID-Microbiología Animal y el estudio animal silvestre se llevó a cabo atendiendo la solicitud del ex director de Investigación de Vida Silvestre de la SEMARNAT, MVZ. Fernando Cortés, quien proporcionó las muestras a los investigadores de este Centro.

En los estudios realizados con las muestras se incluyeron pruebas serológicas, la técnica de PCR en tiempo real y el aislamiento en embriones de pollo. Los aislados virales fueron secuenciados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, lo que permitió confirmar que los tres corresponden al tipo H5N2 de baja patogenicidad. Considerando la importancia que representa la identificación de la presencia de este virus en animales silvestres, los investigadores responsables del proyecto tienen la intención de elaborar un artículo para su publicación en una revista científica; sin embargo, es necesario en primera instancia, que el INIFAP notifique a las autoridades de SENASICA los resultados que se mencionan en este documento y se determine la conveniencia o no de publicar esta información.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

A T E N T A M E N T E


DR. RICARDO FLORES CASTRO
DIRECTOR

c.c.p.- Dr. Salvador Fernández Rivera.- Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación del INIFAP.

Carretera México-Toluca, Km. 15.5, Col. Palo Alto, Cuajimalpa, C.P. 05110, México, DF, Tel. 0155 3618 0803



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“IDENTIFICACIÓN DEL GEN M MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL Y
FRECUENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA INFLUENZA A EN AVES
SILVESTRES ALBERGADAS EN DOS CENTROS DE REHABILITACIÓN DE
FAUNA EN EL ESTADO DE MÉXICO”.**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIO ZOOTECNISTA.**

**PRESENTA:
ROCÍO DEL CARMEN LÓPEZ RAMÍREZ.**

**ASESOR:
M. EN MVZ. GERARDO LÓPEZ ISLAS.**

**COASESORES:
DRA. ELIZABETH LOZA RUBIO.
MVZ. FERNANDO CORTÉS VILLAVICENCIO.**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

"IDENTIFICACIÓN DEL GEN M MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL Y FRECUENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA INFLUENZA A EN AVES SILVESTRES ALBERGADAS EN DOS CENTROS DE REHABILITACIÓN DE FAUNA EN EL ESTADO DE MÉXICO."

Que presenta el pasante: **ROCIO DEL CARMEN LÓPEZ RAMÍREZ**
Con número de cuenta: **30384101-0** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Mayo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.V.Z. Rodolfo Córdova Ponce	
VOCAL	M. en C. Ignacio Carlos Rangel Rodríguez	
SECRETARIO	M. en M.V.Z. Gerardo López Islas	
1er SUPLENTE	Dr. Hugo Ramírez Alvarez	
2do SUPLENTE	M.V.Z. Juan Omar Hernández Ramírez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/yrf

A Dios y a mis ángeles por estar a mi lado. Por la oportunidad de estar viva y seguir planteándome metas que deseo cumplir a lo largo de mi vida que beneficien a su vez la conservación de la fauna silvestre. Gracias por la paciencia y el apoyo para realizar y culminar este trabajo.

A mis padres Ignacio y Rocío, que siempre han estado a mi lado para alentarme a ponerle el doble de esfuerzo a las cosas que realizo, gracias por su apoyo, compañía y paciencia en este proyecto que hoy termino. A mis hermanos, Nacho y Marii que siempre se encargan de tener las palabras ideales para darme ánimo y motivarme para arriesgarme y cumplir metas, ustedes mi ejemplo.

A Edw, por su cariño, confianza, paciencia y apoyo que me has brindado desde el día que decidí realizar proyectos lejos de casa. A toda mi familia "L-R": Abue, a mis dos segundas madres* (Alicia y Monse), Elias, Sac, Mez, Citla, Nic, Dani, Lez, Alex, Alberto T. y los que me faltan... Incluyendo claro, a todos mis pequeños peludos que todos los días estuvieron muy cerca demostrándome su cariño. A René por sus buenos deseos y oraciones para que mi trabajo finalmente viera la "luz".

A la MVZ. Verónica Peña, a mis amigos de Chacahua, Oax., a los de la FES-C y al MVZ. Javier López por demostrarme su apoyo día a día.

A la Dra. Elizabeth Loza Rubio, Dra. Edith Rojas Anaya y a la M. en C. Catalina Tufiño Loza muchas gracias por brindarme su apoyo y conocimientos para realizar todo este trabajo, pero principalmente por creer en mí.

Al MVZ. Daniel, a Porfirio y a todo ese gran equipo de compañeros y amigos (Ofelia, Carlos, Daniel y Lucio), que me facilitaron muchísimo las cosas al compartir conmigo su experiencia y apoyo.

Al M. en MVZ. Gerardo López y al MVZ Fernando Cortés por su colaboración y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

➤ Al Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias - Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Laboratorio de Biotecnología en Salud Animal que me proporcionaron un lugar para la realización de esta tesis, bajo la tutoría de la Dra. Elizabeth Loza Rubio, Dra. Edith Rojas Anaya y la M. en C. Catalina Tufiño Loza.

➤ Al zoológico de Zacango y al Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS) “Los Reyes”, por brindarme la confianza para el manejo de las aves muestreadas para la realización del trabajo.

Resumen

El virus de Influenza aviar (IA) pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, su genoma es un ácido ribonucleico, dividido en 8 segmentos que codifican para 12 proteínas, los virus se clasifican en subtipos basados en la antigenicidad de sus moléculas de superficie (Tong *et al.*, 2013). Las especies de aves silvestres acuáticas son el reservorio natural de IA y se ha demostrado su participación como dispersoras del virus mediante sus migraciones (Morens *et al.*, 2012). La creciente tasa de contacto entre seres humanos- animales silvestres / domésticos aumenta la susceptibilidad a enfermedades emergentes y reemergentes (Saggese, 2007, García, 2008).

El objetivo de este estudio fue detectar la presencia del gen M del virus de influenza A, conocer la frecuencia serológica y la determinación de posibles factores de riesgo asociados a la exposición del virus de IA. Durante el período de los meses de Junio a Octubre del 2013, se muestreó un total de 81 aves de los ordenes filogenéticos Psittaciforme, Strigiforme y Falconiforme; de las cuales se estudiaron 79 muestras de suero sanguíneo, 48 muestras de hisopados orofaríngeos y 46 hisopados cloacales; las diferencias entre el número de muestras de sueros e hisopados se debió a la disponibilidad de ejemplares y a que se descartaron algunas aves muy pequeñas para evitar daño al manipularlas. Para determinar la frecuencia de anticuerpos se utilizó la técnica de inhibición de la hemoaglutinación, usando un virus de referencia de IA subtipo H5N2. Se obtuvo el total de 50 sueros positivos (63%) con títulos mayor o igual a 16, presentándose títulos hasta 1:512 (1 suero), siendo la mayor proporción en 1:64 (13 sueros). El 100% de los Psittaciformes fueron seropositivas (10 aves), 78.57% son Strigiformes (11 de 14 aves) y el 53.7% Falconiformes (29 de 55 aves) resultaron positivas.

La detección del gen M del virus de IA se realizó por RT-PCR en tiempo real, se obtuvo la frecuencia global del 84 % de muestras positivas: con Ct >35 de 48 hisopados orofaríngeos se obtuvieron 40 positivos (32 aves correspondían a los Falconiformes, 6 aves Strigiformes y 2 aves Psittaciformes); mientras que de 46

muestras de hisopados cloacales 39 resultaron positivas (32 aves Falconiformes, 5 Strigiformes y 2 Psittaciformes). El total de las muestras positivas (79 hisopados) se inocularon en embriones de pollo, donde dos líquidos alantoideos obtenidos del segundo pase, resultaron positivos a la prueba de hemoaglutinación y a la RT-PCR en tiempo real. Los aislamientos virales se realizaron a partir de muestras cloacales de un ejemplar de aguililla cola roja (*Buteo jamaicensis*) y de un aguililla de harris (*Parabuteo unicinctus*).

Finalmente los factores de riesgo asociados a la exposición a IA H5N2 encontrados como significativos (valores de $P < 0.05$ y $OR > 1$) fueron: el tipo de manejo que se le da a los Psittaciformes ($OR = 1.73$) y el tipo de alimento que se les proporciona (frutos / granos) ($OR = 1.58$).

En conclusión, en este estudio se observó la prevalencia del subtipo H5N2 de influenza A en aves silvestres de los ordenes filogenéticos Psittaciforme, Strigiforme y Falconiforme, indicando una circulación viral activa en los centros de rehabilitación de fauna silvestre muestreados, esto representa la primera notificación del virus de influenza Aviar en estas aves en México.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Definición de la enfermedad	1
1.2 Características del agente etiológico	1
1.2.1 Descripción molecular	1
1.2.2 Características del genoma viral.....	2
1.2.3 Ciclo de replicación del virus.....	4
1.2.4 Mutaciones y el origen de nuevas cepas virales	6
1.3 Ecología de los virus de Influenza	7
1.3.1 Ciclo de transmisión	7
1.3.2 Patogenicidad	8
1.4 Hospedadores.....	9
1.4.1 Hospedadores naturales.....	10
1.4.2 Hospedadores no convencionales.....	11
1.5 Distribución mundial del virus de Influenza A.....	12
1.6 Factores de Riesgo	17
1.7 DIAGNÓSTICO	19
1.7.1 Diagnóstico serológico	20
1.7.2 Diagnóstico virológico	21
1.7.3 Diagnóstico molecular	22
2 JUSTIFICACIÓN	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo general	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 MATERIAL Y MÉTODOS	27
4.1 Área de estudio	27
4.2 Muestras biológicas	27
4.3 Colección, preservación y transporte de muestras biológicas.....	28
4.3.1 Obtención y conservación del suero sanguíneo	28
4.3.2 Obtención y conservación de hisopados orofaríngeos y cloacales..	28
4.4 Procedimientos y técnicas utilizados para el análisis de muestras.	29
4.4.1 Detección del gen M del virus de Influenza A	29
Fase 1: Extracción de ARN	29
Fase 2: RT-PCR en tiempo real.....	29
4.4.2 Aislamiento Viral en embrión de pollo.....	31
Fase 1 Técnica de inoculación en cavidad alantoidea	31

CONTENIDO

	Pág.
Fase 2: Titulación y cuantificación viral absoluta	32
4.4.3 Serología	33
4.5 Metodología estadística	34
5 RESULTADOS	36
5.1 Diagnóstico del gen M de Influenza A	37
5.2 Aislamiento Viral	39
5.3 Serología	42
5.4 Determinación de factores de riesgo: análisis bivariado	43
6 DISCUSIÓN	45
7 CONCLUSIÓN	55
8 RECOMENDACIONES	55
9 REFERENCIAS	56
10 ANEXOS	65
10.1. Formato de registro de aves muestreadas	65
10.2 Protocolo para la RT – PCR en tiempo real.....	66
10.3 Notificación de resultados a SENASICA-SAGARPA	69

Lista de Figuras

- Figura 1. Diagrama estructural del virus de la Influenza.
- Figura 2. Esquema del ciclo de replicación del virus de la influenza.
- Figura 3. Ejemplo del reacomodo genético en el virus de la Influenza.
- Figura 4. Los diferentes subtipos del virus de Influenza A y sus hospedadores.
- Figura 5. Hipótesis del modelo de asociación entre los factores de riesgo para la presentación de enfermedades respiratorias.
- Figura 6. Ejemplares muestreados.
- Figura 7. Curva de amplificación estándar en RT-PCR en tiempo real con muestras positivas al aislamiento viral.

Lista de Cuadros

- Cuadro 1. Pandemias ocurridas a lo largo de la historia en humanos debido a diferentes subtipos de la Influenza (OIE 2013).
- Cuadro 2 Programa del termociclado
- Cuadro 3. Factores de riesgo obtenidos de la información de los sitios de muestreo y sus posibles categorías de estudio.
- Cuadro 4. Ejemplares muestreados
- Cuadro 5. Resultados de Ct de muestras de hisopados orales a la prueba de PCR en tiempo real por orden filogenético y tipo de especie muestreada.
- Cuadro 6. Resultados de muestras de hisopados cloacales a la prueba de PCR en tiempo real (Ct) por orden filogenético y tipo de especie muestreada.
- Cuadro 7. Cuantificación viral de las muestras positivas a aislamiento viral.
- Cuadro 8. Frecuencia de títulos serológicos
- Cuadro 9. Valores de Chi-cuadrada (X^2) para los diferentes factores de riesgo por exposición al subtipo H5N2 de IA.

Abreviaturas y términos usados.

ADN:	Ácido desoxiribonucleico.
ARN:	Ácido ribonucleico.
Ave de presa:	Ave que caza presas para alimentarse, utilizando su pico y sus garras afiladas.
Cámara de muda:	Recinto oscuro que favorece la recuperación física y muda de plumas del ave.
CDC:	The Centers for Disease Control and Prevention.
<i>CENAVECE:</i>	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades.
Cetrería:	Modalidad de caza que emplea aves de presa adiestradas para capturar animales silvestres en su medio natural.
Cetreros:	Practicantes de la cetrería.
CFSPH:	The center for food security & public health.
CIVS:	Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre.
CONABIO:	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
CPA:	Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales.
Ct:	Cycle threshold ó ciclo umbral.
DGVS:	Dirección General de Vida Silvestre.
DINESA:	Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal.
DLEP 50%:	Dosis Letal en Embrión de pollo 50%.
E. U. A:	Estados Unidos de América.
ECTAD:	Centro de Emergencias para el Control de la Enfermedades Transfronterizas.

ELISA:	Ensayo inmuno-enzimático / Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay.
EP:	Embrión de pollo.
Falconiformes:	Orden de aves de presa diurnas.
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
FP:	Factor de protección.
FR:	Factor de riesgo.
HA:	Hemoaglutinina.
IA:	Influenza aviar.
IAAP:	Influenza aviar de alta patogenicidad.
IABP:	Influenza aviar de baja patogenicida.
IDGA:	Inmunodifusión en gel de agar.
IgA:	Inmunoglobulina A.
IgY	Inmunoglobulina Y.
IH:	Inhibición de la Hemaglutinación.
IMSS:	Instituto Mexicano del Seguro Social.
INIFAP:	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
IPIV:	Índice de patogenicidad intra-venoso.
LSB:	Laboratorio de bioseguridad.
NA:	Neuraminidasa.
NCBI:	Base de Datos del National Center for Biotechnology.
OIE:	Organización Mundial de Sanidad Animal.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OPS:	Organización Panamericana de la Salud.

OR:	Odds ratio ó razón de momios.
Orden filogenético:	Clasificación científica de las especies basada únicamente en las relaciones de proximidad evolutiva (filogénesis).
PANAFTOSA:	Centro Panamericano de Fiebre Aftosa-Salud pública veterinaria.
PGR:	Procuraduría General de la República.
PROFEPA:	Procuraduría Federal de Protección al Ambiente.
Psittaciformes:	Orden de aves que incluye loros y afines.
RNA _m :	Ácido ribonucleico mensajero.
Rpm	Revoluciones por minuto.
RR:	Riesgo relativo.
RT-PCR:	Retro transcripción - Reacción en cadena de la polimerasa.
SAGARPA:	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
SENASA:	Servicio Nacional de Salud Animal.
SENASICA:	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
SPF:	Libre de patógenos específicos (Specific Pathogens Free).
Strigiformes:	Orden de aves nocturnas: Búhos y afines.
TNF:	Factor de necrosis tumoral.
UEIDAPLE:	Unidad Especializada en Investigación de Delitos contra el Ambiente y Previstos en Leyes Especiales.
UHA:	Unidad hemoaglutinante.
χ^2 :	Chi-cuadrada.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de la enfermedad.

La Influenza Aviar (IA) también llamada Peste Aviar o Gripe Aviar, es una enfermedad infecto-contagiosa de etiología viral que varía entre una infección leve o asintomática hasta una enfermedad aguda y fatal, que afecta a la mayoría de las aves. Las aves acuáticas migratorias, constituyen el reservorio natural de los virus de IA, en cambio las aves de corral domésticas (en particular los pollos y los pavos) son especialmente vulnerables a las epidemias (García *et al.*, 2006; Taubenberger *et al.*, 2006).

La primera descripción de un padecimiento identificable como Influenza la realizó Hipócrates en el año 492 a.c. En América, la Influenza fue documentada en Texcoco en 1552 y se le denominó “pestilencia catarral”; en Italia se documentó en el año 1580 y se describió como la “influenza planetaria” por una asociación que hicieron con fenómenos astrales observados antes del brote, de donde se deriva el nombre actual de Influenza. El término “grippe”, proviene de Francia siendo más descriptivo ya que alude al “agarrotamiento” del pecho (CFSPH, 2010).

1.2 CARACTERÍSTICAS DEL AGENTE ETIOLÓGICO

1.2.1 Descripción molecular

Los virus de la Influenza pertenecen a la familia Orthomyxoviridae (del griego orthos, ‘correcto’, y myxo, ‘mucus’), comprende los géneros: Influenzavirus A, B, C (afectan animales vertebrados), Isavirus (afecta al salmón) y Thogotovirus (afecta mosquitos). Pertenecen al grupo de virus ARN de cadena simple, polaridad negativa y genoma segmentado. Son virus neumotrópicos con afinidad selectiva por las células epiteliales traqueobronquiales (Jiménez, 2012). La composición global de la partícula viral es 1% de ARN, 5-8% de carbohidratos, 20% de lípidos y

cerca de 70% de proteínas. Son virus esféricos o pleomórficos de hasta 120 nm de diámetro; la partícula viral tiene una masa de 250×10^6 Daltons (Talledo *et al.*, 2009).

La resistencia de los virus aviares en el medio ambiente es escasa, rayos ultravioletas los inactivan rápidamente, son sensibles al calor, solventes de lípidos, detergentes no iónicos, formaldehído, agentes oxidantes y a pH ácidos, y son relativamente estables sólo a pH comprendido en un rango de entre 6 y 8 (SENASA, 2014). Sin embargo, algunos virus de IA en su forma patógena pueden permanecer viables en las heces de las aves durante al menos 35 días a baja temperatura (4°C) y a temperaturas más altas (37°C), puede sobrevivir en muestras fecales durante 6 días (OIE, 2013).

Presentan una envoltura derivada de la célula huésped que alberga la hemoaglutinina (**HA**), la neuraminidasa (**NA**) y la proteína M. La HA se encuentra en una proporción de 4-5 a 1 con respecto a la NA, tiene de 4 a 6 nm de diámetro y se proyecta por encima de la envoltura hasta 10 a 14 nm. Hacia el interior de la partícula viral, existe una capa formada por la proteína de matriz (M) y más al interior, está la nucleocápside de simetría helicoidal, constituida por los complejos polimerasa y nucleoprotéico que incluye el genoma viral. (Talledo *et al.*, 2009).

1.2.2 Características del genoma viral.

El genoma completo tiene 13600 nucleótidos y está constituido por ARN de polaridad negativa dividido en ocho segmentos que codifican para once proteínas. Los tres primeros codifican el complejo polimerasa que tiene actividad endonucleasa; proteína básica (PB1 y PB2) y la proteína ácida (PA). Los segmentos cuatro y seis codifican glicoproteínas de superficie de envoltura; La hemoaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) que constituyen los antígenos virales mayores. El segmento cinco codifica para la nucleoproteína (NP), la cual se une al

ARN viral. El segmento siete o Gen M codifica dos proteínas que comparten una región corta: la proteína de matriz M1 que le da estructura a la cápside viral y la proteína de matriz M2 que funciona como un canal de iones. Finalmente, el segmento ocho codifica las proteínas NS1 y NEP que están vinculadas con el transporte, transcripción y empalme del ARN (Figura 1) (Furuse *et al.*, 2009; Jiménez, 2012).

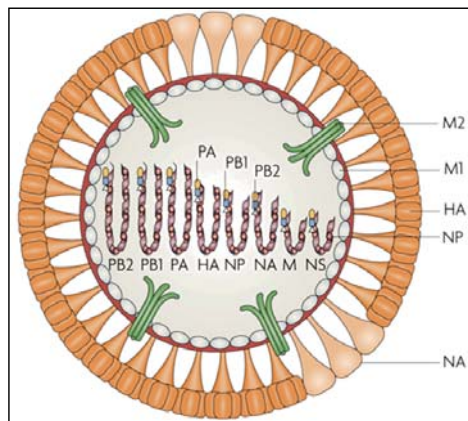


Figura 1. Diagrama estructural del virus de la Influenza. HA: hemoaglutinina; M: matriz; NA: neuraminidasa; NP: nucleoproteína; NS: proteína no estructural; PA: polimerasa ácida; PB1 y PB2: polimerasa básica (Noda *et al.*, 2007).

Los virus de la Influenza A se clasifican en subtipos basados en la antigenicidad de sus moléculas de superficie: 18 hemoaglutininas (subtipos: H1 a H18) y 11 neuraminidasas (subtipos: N1 a N11), incluidas las recientemente encontradas en murciélagos (Tong *et al.*, 2013).

Los subtipos de los virus de IA se clasifican en cepas, que se describen de acuerdo a su tipo, su huésped, el lugar del primer aislamiento, el número de cepa (si lo hubiera), el año de aislamiento y el subtipo antigénico; por ejemplo, un virus H5N1 aislado de los pollos en Hong Kong en 1997 es un A/pollo/Hong Kong/y385/97 (H5N1). En el caso de las cepas de humanos, el huésped generalmente se omite (Talledo *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010).

1.2.3 Ciclo de replicación del virus

La duración de cada ciclo de replicación es entre 4 y 6 horas, el virus por medio de la hemoaglutinina-HA (HA), se une por endocitosis a los receptores de ácido siálico ubicados en la superficie de la célula hospedera, ~~para ingresar por endocitosis,~~ posteriormente la proteína M2 inicia el ciclo de replicación con el intercambio de protones entre el endosoma y el virus, induciendo su disminución de pH y generando cambios conformacionales en la HA. Una vez fusionada la membrana viral con la membrana del endosoma, la nucleocápside viral es liberada dentro del citoplasma y es transportada al núcleo de la célula hospedera. Allí, el ARN (-) es copiado por la ARN polimerasa viral a ARNm viral adquiriendo terminaciones cap 5' de los pre-ARNm del hospedero. Los ARNm son transportados al citoplasma y traducidos en proteínas virales tanto estructurales como reguladoras (Talledo *et al.*, 2009; Polo, 2009)

Los ARNm se traducen para generar las proteínas de la envoltura viral (HA, NA y M2) en los ribosomas unidos al retículo endoplásmico, ingresando a la vía secretora de la célula hospedera donde la HA y NA son glicosiladas. Los ARNm restantes son traducidos por ribosomas en el citoplasma y las proteínas PA, PB1, PB2 son importadas al núcleo, donde participan en la síntesis de cadenas positivas de ARN (+) que sirven de molde para las cadenas de ARN (-) viral; algunas de estas ingresan a la vía de la síntesis de ARNm, mientras que la proteína NP va a conformar las nucleocápsides. Las proteínas M1 y NS1 son transportadas al núcleo, esta unión a las nuevas cadenas de ARN (-) detiene la síntesis de ARNm viral y junto con la proteína NEP induce la exportación de la progenie de las nucleocápsides al citoplasma. Posteriormente, las nucleocápsides del virión asociadas con las proteínas M1 y NEP, son transportadas a la superficie celular junto con las proteínas HA, NA y M2, para que en la membrana plasmática se mantengan unidas. Finalmente, el empalme de los viriones se completa una vez que ocurre la gemación desde la membrana plasmática de la célula infectada (Polo, 2009; Jiménez, 2012).

El proceso de replicación y síntesis de proteínas no estructurales virales dispara los factores de transducción de señales que inducen a la expresión de los genes de citoquinas proinflamatorias, como por ejemplo el Factor de Necrosis Tumoral - alfa (TNF-alfa), iniciando la comúnmente llamada "tormenta de citoquinas" y la formación de anticuerpos en secreciones respiratorias (IgA) y en el suero (IgY en aves e IgG en mamíferos).

Los anticuerpos producidos en el hospedador desempeñan dos funciones principales: neutralización de la infección e interferencia en la liberación de nuevas partículas virales de la membrana de las células infectadas (García *et al.*, 1996; García *et al.*, 2006).

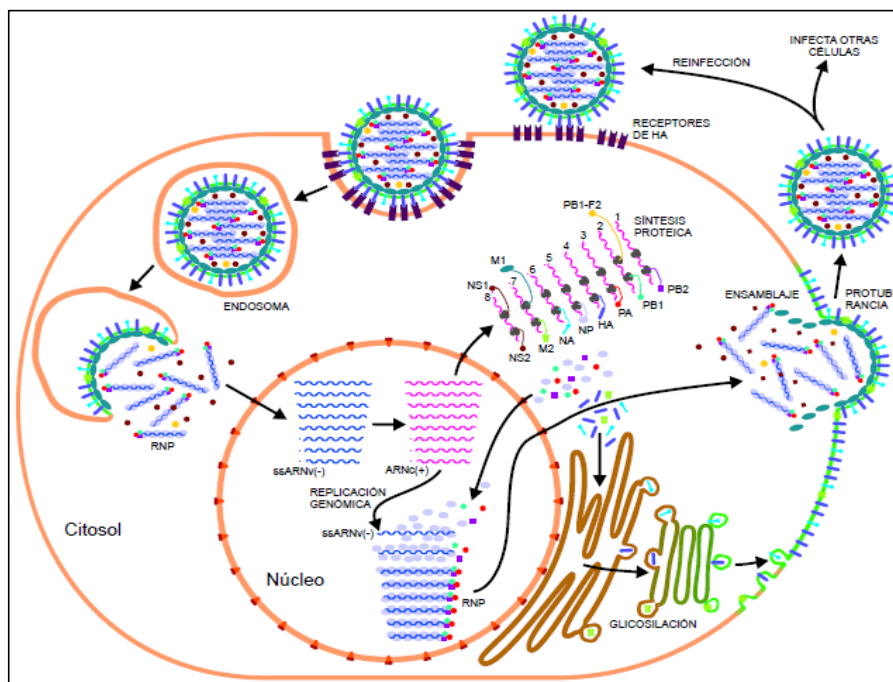


Figura 2. Esquema del ciclo de replicación del virus de la Influenza (Polo, 2009).

1.2.4 Mutaciones y el origen de nuevas cepas virales

Los virus de la IA se mantienen en las aves reservorio en estasis evolutivo, únicamente cuando el virus entra en contacto con aves susceptibles como los pollos o gallinas pueden modificar sus características genéticas mediante los siguientes procesos denominados:

1.-Drift antigénico o deriva antigénica: las mutaciones en el sitio antigénico de la proteína HA reduce o inhibe la unión de anticuerpos neutralizantes, formándose un nuevo subtipo. Las proteínas del virus (HA y NA) pueden tolerar mutaciones puntuales en su secuencia de aminoácidos sin afectar necesariamente la capacidad del virus para replicarse, es decir por errores en la replicación del ARN puede revertir una cepa de baja patogenicidad a una de alta patogenicidad (Talledo y Zumaeta, 2009; Polo, 2009).

2.-Shift antigénico o reacondo genómico: ocurre cuando la célula es infectada por dos diferentes virus al mismo tiempo y sus segmentos genómicos son intercambiados durante la replicación. Debido a que este genoma es segmentado y habiendo dos cepas virales en proceso dentro de la misma célula, es relativamente frecuente que se introduzcan segmentos genómicos en la cápside del virus no correspondiente, lo que por lo general, genera partículas no viables. Aunque algunas veces el producto de esta recombinación, pueden aparecer cepas con características nuevas (Polo, 2009; SENASICA *et al.*, 2011).

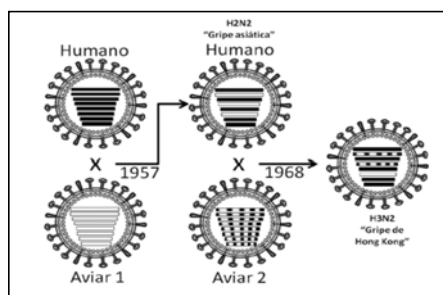


Figura 3. Ejemplo del reacondo genético en el virus de la Influenza (Talledo *et al.*, 2009).

1.3 ECOLOGÍA DE LOS VIRUS DE INFLUENZA.

Los virus de Influenza A se describieron en 1933, afectan animales y al hombre; son factor causal de epidemias y pandemias. Los virus de Influenza B se identificaron en 1940, afectan a los humanos causando epidemias moderadas, incluso se han encontrado anticuerpos en focas. Los virus de Influenza C se describieron en 1950, infectan de manera limitada a humanos y existen evidencias serológicas de infección en cerdos y perros (García *et al.*, 2006; González *et al.*, 2012) e incluso recientemente se ha aislado un virus de Influenza C a partir de cerdos en el año 2013 (Hause *et al.*, 2013).

Las aves acuáticas migratorias tanto de lagos como costeras, son los reservorios naturales de toda la gama de virus de Influenza; en particular las especies del orden Anseriforme (patos), Passeriforme (golondrinas) y el orden Charadriiforme (gaviotas y golondrinas marinas, entre otras) (Taubenberger y Morens, 2006). Sin embargo, se ha reportado en Psittaciformes (loros, quacamayas), Galliformes (Faisanes, gallina de guinea) e inclusive ha sido documentada que afecta una gran variedad de especies de reptiles, mamíferos y al hombre. Todos los subtipos de HA, incluidos los identificados en los últimos 16 años (HAs 14, 15, y 16) se aislaron de patos y gaviotas, lo que demuestra que ocurrieron mayores cambios genéticos virales en estas aves (Morens *et al.*, 2012).

1.3.1 Ciclo de transmisión

Las aves acuáticas migratorias normalmente introducen el virus a una parvada, una vez dentro se disemina de una población a otra; en cambio las aves domésticas se consideran especies aberrantes, lo que origina mutaciones en los virus como un mecanismo de adaptación para una óptima replicación y transmisión en la nueva especie (García *et al.*, 2006; CENA VECE, 2013).

La transmisión y diseminación del virus se produce por el contacto directo entre aves afectadas y aves susceptibles. Las aves se infectan fácilmente por instilación

Comentado [u1]:

Con formato: Color de fuente: Texto 1

Con formato: Color de fuente: Texto 1

Comentado [E2]: Incluir la cita siguiente:
Hause BM, Ducatez M, Collin EA, Ran Z, Liu R, Sheng Z, Armien A, Kaplan B, Chakravarty S, Hope AD, Wbly RJ, Simonson RR, Li F. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human C viruses

Con formato: Color de fuente: Texto 1

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

del virus hacia el saco conjuntival, narinas o la tráquea (CENAVECE, 2013). Las

1.3 ECOLOGÍA DE LOS VIRUS DE INFLUENZA.

Los virus de A se describieron en 1933, afectan animales y al hombre; son factor causal de epidemias y pandemias. Los virus de B se identificaron en 1940, afectan a los humanos causando epidemias moderadas, incluso se han encontrado anticuerpos en focas. Los virus de C se describieron en 1950, infectan de manera limitada a humanos y existen evidencias serológicas de infección en cerdos y perros (García y Ramos, 2006; González *et al.*, 2012; PANAFTOSA *et al.*, 2010)

Las aves silvestres acuáticas migratorias tanto de lagos como costeras, son los reservorios naturales de toda la gama de virus de : en particular las especies del orden *Anseriforme* (patos), *Passoriforme* (gansos) y el orden *Charadriiforme* (gaviotas y golondrinas marinas, entre otras) (Taubenberger y Morens, 2006); Sin embargo se ha reportado en *Psittaciformes* (Loros, guacamayas), *Galliformes* (Faisanes, gallina de guinea), inclusive ha sido documentada que afecta una gran variedad de especies de reptiles, mamíferos, y al hombre. Todos los subtipos de HA, incluidos los identificados en los últimos 16 años (HAs 14, 15, y 16) se aislaron de patos y gaviotas, lo que demuestra que ocurrieron mayores cambios genéticos virales en estas aves (Morens y Taubenberger, 2012).

1.3.1 Ciclo de transmisión

En las aves acuáticas migratorias generalmente introducen el virus en una parvada, una vez dentro se disemina de una población a otra; En cambio las aves domésticas se consideran especies aberrantes, lo que origina mutaciones en los virus como un mecanismo de adaptación para una óptima replicación y transmisión en la nueva especie (CENAVECE, 2013; García y Ramos, 2006).

La transmisión y diseminación del virus se produce por el contacto directo entre aves afectadas y aves susceptibles. Las aves se infectan fácilmente por instilación del virus hacia el saco conjuntival, narinas o la tráquea (CENAVECE, 2013). Las

Con formato: Color de fuente: Texto 1

Con formato: Espacio Después: 0 pto, No ajustar espacio entre texto latino y asiático, No ajustar espacio entre texto asiático y números

Con formato: Normal, No ajustar espacio entre texto latino y asiático, No ajustar espacio entre texto asiático y números

aves afectadas eliminan el virus mediante los aerosoles y secreciones corporales, especialmente por las heces, las cuales son la principal fuente de diseminación de cepas entéricas avirulentas, llegando así a contaminar el agua de bebida y otros fómites (García *et al.*, 2006; PANAFTOSA *et al.*, 2010; Loza-Rubio *et al.*, 2012). En los patos silvestres los virus se replican primero en las células del tracto intestinal y se excretan por las heces en altas concentraciones (hasta $10^{8.7}$ dosis infectante en embrión de pollo 50% (DIEP 50%/g) (Webster *et al.*, 1992).

1.3.2-Patogenicidad

Los términos utilizados para describir a los virus de IA, comúnmente se definen sobre la base de su patogenicidad, virulencia y letalidad (Cox *et al.*, 1999; Cárdenas, 2006). El período de incubación de la enfermedad depende de la especie, edad del ave y la cepa del virus, sin embargo el período es generalmente de 3 a 7 días, no obstante puede prolongarse hasta 21 días (SENASICA *et al.*, 2011).

Los virus de IA se dividen en virus de alta patogenicidad (IAAP) y de baja patogenicidad (IABP) (OIE, 2013; SENASA, 2014). Los signos clínicos asociados varían dependiendo el subtipo, siendo la mayoría completamente asintomáticos (Soriano 2009; Hénaux *et al.*, 2011).

A) Influenza Aviar de baja patogenicidad (IABP)

Han sido identificados en aves y su replicación se limita a células de los tractos respiratorio y digestivo. La infección por el virus de Influenza en su fase primaria causa una enfermedad respiratoria febril con signos clínicos leves o imperceptibles (OIE, 2013).

Las infecciones bacterianas por *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus Influezae* son causas secundarias de neumonía, empiema, absceso pulmonar, choque tóxico, meningitis y sepsis, incluso llegan a aumentar el número de muertes (PANAFTOSA *et al.*, 2010). La infección combinada de virus y bacterias produce efectos

fisiopatológicos determinantes en la neumonía viral-bacteriana que conduce a la muerte en individuos que se hallan en grupos de riesgo; estos efectos incluyen barreras físicas destruidas o dañadas, adherencia incrementada (mediada por anticuerpos neutralizantes, actividad mucociliar disminuida, disfunción de células del sistema inmune, desregulación del sistema inmune y hasta expresión génica sobre regulada (Talledo *et al.*, 2009; Jiménez, 2012;).

B) Influenza Aviar de alta patogenicidad (IAAP)

Los virus IAAP para casos sobreagudos y agudos presentan tasas de morbilidad y mortalidad cercanas al 100%, ocurriendo después de la expresión de signos clínicos iniciales de la enfermedad (entre los 2 y 12 días) y frecuentemente en las siguientes 48 horas (Martin *et al.*, 2007).

En su forma grave el virus adquiere la capacidad de causar infecciones sistémicas, incluso producir hemorragia interna masiva. Las aves se observan marcadamente deprimidas, con una disminución en el consumo de alimento y agua; plumas erizadas; presencia de sinusitis, lagrimeo, cianosis en la cabeza, la cresta y la barbilla; edema en la cabeza y diarrea verde blancuzca; enfermedades neurológicas, disminución en la producción de huevos, pérdida en la pigmentación de los huevos y huevos deformes o sin cáscara (CFSP, 2010; OIE, 2013).

1.4 HOSPEDADORES

Los virus de Influenza tienen un rango de hospederos limitado a individuos de la misma especie, lo que hace que ni siquiera pueda infectar a las aves de otras especies, menos aún a miembros de otras clases. Por lo tanto, el virus tiene que pasar obligadamente por un proceso de mutación progresiva antes de dar el salto a los humanos (Talledo *et al.*, 2009).

1.4.1 Hospedadores naturales

El huésped natural de los virus de Influenza A (subtipos: H1-H16, N1-N9) son las aves acuáticas silvestres y especialmente a las aves del orden *Anseriformes* y *Caradriformes*, la infección ocurre a nivel del intestino donde causa una infección subclínica y el virus es evolutivamente estable (Talledo *et al.*, 2009; SENASA, 2014). En las aves terrestres: gallinas, pollos y pavos tanto de tipo aviar (Siaa2-3 Gal) y de tipo humano (Siaa2-6Gal) los receptores se detectan en las células epiteliales de la tráquea (Suzuki, 2013).

La migración es una estrategia común para las aves que ocupan hábitats estacionales y pueden extenderse desde desplazamientos cortos hasta intercontinentales, las aves migratorias se mantienen como portadoras de patógenos que particularmente no afectan su estado de salud ni interfieren con su traslado; ésta actividad conecta muchas poblaciones de aves en espacio y tiempo, tanto en las áreas de crianza comunes como en las de alimentación. Consecuentemente las aves infectadas con el virus pueden transmitir sus patógenos a otras poblaciones que puedan traer posteriormente los virus a nuevas áreas (Simonsen, 1999; Soriano, 2009; Ventocilla *et al.*, 2011).

Las aves domésticas que entran en contacto con aves migratorias o sus deposiciones son el enlace mediante el cual el virus pasa de generar una infección intestinal subclínica a una infección avirulenta del tracto respiratorio (Talledo *et al.*, 2009). Los pollos son las especies de aves más susceptibles, en menor frecuencia otras especies de aves domésticas: como codornices, faisanes, patos, gansos y las palomas (García *et al.*, 2006; Taubenberger *et al.*, 2006).

Las cepas de virus poco virulentas y los virus vacunales inactivados generan una inmunidad que protege sólo contra el mismo subtipo. Las aves inmunizadas pueden enfermarse, sin embargo los signos y lesiones que desarrollan son menos graves así como también es menor la cantidad de virus que excretan y diseminan en el medio ambiente (SENASA, 2014).

1.4.2 Hospedadores no convencionales.

Los virus de IA experimentan un proceso de reordenamiento génico mediado por mutaciones que les permite adaptarse al hospedero y a las condiciones del ambiente, lo cual se conoce como presión selectiva o evolución obligada. Las mutaciones que ocurren en la región de unión de la HA parecen determinar la capacidad para que los virus de Influenza crucen la barrera de especie de aves a los mamíferos (Cox *et al.*, 1999; García *et al.*, 2006; Talledo *et al.*, 2009).

Se han encontrado anticuerpos en diferentes especies de mamíferos de manera directa o a través de aves domésticas: mamíferos marinos como focas y ballenas, mamíferos terrestres como cerdos, caballos, visones, tigres, leopardos, hurones e incluso perros han sido algunos de los animales que han presentado seropositividad a IA (Figura 4) (García *et al.*, 2006; Hénaux, 2011).

Desde el año 1997 se conoce que a partir de los virus de alta patogenicidad, en aves, los subtipos H5N1, H7N7, H7N9 se han transmitido de aves domésticas a los seres humanos, y los virus H9N2 se transmitieron de codornices a los seres humanos (Suzuki, 2013). El hombre desempeña un papel importante como transmisor directo o indirecto del virus, ya sea por transporte mecánico a través de la ropa, equipos o vehículos contaminados, o bien, por el contrabando de aves silvestres, de ornato, de pelea y comerciales (Simonsen, 1999; Viesca, 2001; Claas, 2002). Receptores de tipo Aviar y humano también se han detectado en el tracto respiratorio del cerdo (Suzuki, 2013).

Para llegar a infectarse una persona debe tener contacto directo y estrecho con aves enfermas o sus secreciones. En la mayoría de los casos la infección en personas con los virus de Influenza Aviar de alta patogenicidad provoca una conjuntivitis sin afectación general. Sin embargo, aunque se ha mostrado que algunas veces las cepas altamente patógenas de este virus pueden infectar al hombre, esta enfermedad no debe confundirse con la gripe humana estacional (causada generalmente por los virus H1 y H3) (Dennis, 2000; Valdez, 2002; García *et al.*, 2006; OIE, 2013).

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

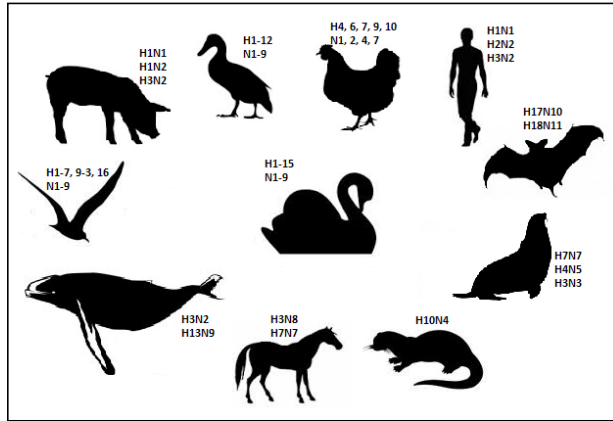


Figura 4. Los diferentes subtipos del virus de Influenza A y sus hospedadores, incluidos los recientemente encontrados en murciélagos.

1.5 DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DEL VIRUS DE INFLUENZA A

Durante la historia se han registrado los siguientes eventos donde algunos subtipos de Influenza han afectado gravemente a la humanidad. ~~Cuadro 1.~~

Cuadro 1.
Pandemias en humanos registradas a lo largo de la historia

Año	Nombre Común	Descripción	Subtipo de IA
1918	"Gripe española"	Pandemia <u>de origen porcino.</u>	H1N1
1947	<u>"Gripe italiana" s/n</u>	<u>Origen aviar.</u> Pseudopandemia, variación antigénica subtípica <u>extrema</u>	H1N1
1957	"Influenza asiática"	Pandemia <u>de origen aviar.</u>	H2N2
1968	"Influenza de Hong Kong"	Pandemia <u>de origen aviar.</u>	H3N2

Con formato: Fuente: Negrita

Con formato: Fuente: 10 pto, Sin Cursiva

Con formato: Fuente: 10 pto

Año	Nombre Común	Descripción	Subtipo de IA
1976	Sin nombre	Pandemia potencial abortiva, epidemia de virus de Influenza porcina.	H1N1
1977	"Gripe rusa"	Pandemia restringida a la edad juvenil, retorno del H1N1 humano.	H1N1
2009	Influenza A/H1N1" "Influenza humana de origen porcino"	Pandemia <u>de origen porcino</u> .	H1N1

Cuadro 1. Pandemias en humanos causadas por diferentes subtipos de Influenza, que se han registrado a lo largo de la historia (Basado en información de la OIE, 2013).

La mayoría de los casos en humanos se han detectado en áreas rurales y semi-rurales donde se mantenía un pequeño número de aves, pero curiosamente, entre el personal sometido a riesgo alto, como veterinarios, personal de rastros, trabajadores de mercados de aves vivas o sanitarios al cuidado de pacientes, se han producido muy pocos casos. Actualmente los subtipos que están circulando en humanos corresponde a H1 y H3, los cuales siguen experimentando cambios antigénicos (OIE, 2013). Después de complejas investigaciones hoy se conoce el genoma del virus que causó la gripe española en 1918-1919, contenía el mismo ácido nucleico proveniente de los porcinos, aves y del humano (Talledo *et al.*, 2009; SENASA 2014).

Algunos de los subtipos que se han registrado en aves y mamíferos de todo el mundo, a continuación se describen brevemente.

Europa: en octubre de 2005 se confirmó el primer caso de H5N1 en la Unión Europea, el virus fue aislado de un loro ~~de procedencia ilegal a Siria, procedente de Surinam, que se encontraba en cuarentena al ser un ejemplar de procedencia ilegal.~~ Días posteriores otro caso del virus de IA volvió a detectarse, esta vez en Croacia cuando fueron examinados doce cisnes ~~hallados muertos hallados~~ en un estanque de peces; consecuentemente el personal del Instituto Friedrich Loeffler,

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

En marzo del 2006 en el parque nacional de Inagua, una isla del sur del archipiélago de Bahamas, se notificó la muerte de 10 flamencos rosados (*Phoenicopterus ruber*), 5 espátulas rosadas (*Platalea ajaja*) y algunos cormoranes (*Phalacrocorax carbo*), éste pudo ser el primer caso de H5N1 en América pero no fue confirmado por las autoridades correspondientes. ~~En el mismo año se detectó un brote en aves de corral en zonas rurales del Estado Mexicano de Chiapas, la cepa fue aislada (H5) y se determinó como "no transmisible a los humanos" (Soriano, 2009).~~

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Sin Cursiva, Sin subrayado, Color de fuente: Automático

Con formato: Fuente: Sin Cursiva, Sin subrayado, Color de fuente: Automático

En el mismo año (-año-2006) fueron aislados del medio ambiente nueve virus de IA, subtipos de hemoaglutinina H3, H4, H10, y H13, de entre 2405 muestras fecales que fueron recogidas en bandadas de aves acuáticas a lo largo de la costa central de Perú, en especies de aves como: vuelvepiedra (*Arenaria interpres*), ostrero americano (*Haematopus palliatus*), pelícano peruano (*Pelecanus occidentalis thagus*), zarapito trinador (*Numenius phaeopus*), gaviota (*Larus dominicanus*), patos rojizos (*Anas bahamensis*) y pato colorado (*Anas cyanoptera*) (Gherzi *et al.*, 2009).

Comentado [u4]: quitar el espacio juntar párrafos.

En República Dominicana (2008), se anunció la aparición de la cepa de gripe aviar H5N1 de baja patogenicidad, los casos se descubrieron cuando unos productores avícolas solicitaron permiso oficial para exportar gallos de pelea a Colombia (Pannwitz *et al.*, 2009).

En 2006, E. U. A. dio el primer reporte de ingreso de IA subtipo H5N2, cuando se aisló el virus de un ejemplar de loro cachetes amarillos (*Amazona autumnalis*), de 3 meses de edad, ~~de un ejemplar de Loro cachetes amarillos (*Amazona autumnalis*)~~ producto del tráfico ilegal de especies. El ave ingresó al hospital veterinario con signos clínicos de letargo, al realizarse estudios de serología (inhibición de la hemoaglutinación), RT-PCR y aislamiento en embrión de pollo, los resultados fueron positivos. ~~EL virus aislado fue secuenciado y se determinó que estaba estrechamente relacionado con un linaje de virus (subtipo H5N2) que solamente él~~ había sido registrado en México y América Central. El ave se recuperó favorablemente en cuarentena a las 9 semanas (Hawkins, 2006).

En 2012, las autoridades de salud animal de México confirmaron la presencia de la IAAP subtipo H7N3 en tres granjas avícolas comerciales de los municipios de Tepatitlán y Acatic, en el Estado de Jalisco, murieron por la IA aprox. 200 mil aves y se sacrificaron 600 mil más para el control de la enfermedad (FAO, 2014).

~~En 1994, en granjas comerciales del centro de México se detectó por primera vez el virus de IABP subtipo H5N2, que posteriormente se convirtió en IAAP, desde entonces se continúa con un programa de acción contra IA. Actualmente el territorio Mexicano se encuentra libre del virus de Influenza Aviar de alta patogenicidad desde junio de 1995.~~

El Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal (DINESA), de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), participan en la vigilancia de la Influenza Aviar y en las acciones de control-erradicación. ya que desde 1994, en granjas comerciales del centro de México se detectó por primera vez el virus de IABP subtipo H5N2, que posteriormente se convirtió en IAAP. El brote fue rápidamente controlado y el virus de la IAAP fue erradicado en junio de 1995. En el mismo año se creó la NOM-044-ZOO-1995: Campaña Nacional contra la Influenza aAviar, que estuvo vigente hasta el 21 de junio de 2011 (SENASICA, 2014).

En el año 2012 las autoridades de salud animal confirmaron la presencia de IAAP subtipo H7N3 en tres granjas avícolas comerciales de los municipios de Tepatitlán y Acatic, en el Estado de Jalisco (principal productor de huevo a nivel nacional), las aves presentaron sinología clínica de carácter agudo y muerte, entre las 32 y 94 semanas de edad, murieron cerca de 200 mil aves; el brote en poco tiempo fue controlado por el DINESA (FAO, 2014). De acuerdo a estimaciones de la OMS y de la OIE, el país se encuentra catalogado como de bajo o moderado riesgo de infección con IA (FAO, 2014). México actualmente tienen clasificadas como libres a 15 entidades mexicanas; los Estados de Coahuila y Durango, así como la

Región Lagunera se encuentran suspendidos en su reconocimiento de fase libre; las 17 entidades restantes se encuentran en fase de erradicación de esta campaña contra la IA. La población avícola en la zona libre representa aproximadamente un 27%, la cual produce el 38% y 30% de la carne de pollo y huevo del total nacional (SAGARPA, 2014).

Actualmente para las regulaciones relacionadas con el control y erradicación de la Influenza Aviar existe:

1.-Campaña Nacional contra la Influenza Aviar: campaña y las medidas zoonosanitarias que deberán aplicarse para el diagnóstico, prevención, control y erradicación de la IA.

2.- NOM-056-ZOO-1995. Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria (SENASICA, 2014).

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

1.6 FACTORES DE RIESGO

En México, son pocos los estudios que han investigado los factores involucrados en la propagación del virus de Influenza entre aves silvestres.

La presencia de enfermedades respiratorias no solo está influenciada por la presencia de microorganismos específicos, sino por la compleja interacción entre los factores relacionados al agente, al hospedador y al ambiente. Las aves vivas ~~re~~representan el mayor riesgo para la transmisión de la IA, pero algunos elementos como por ejemplo: los cadáveres con plumas de aves infectadas, huevos de gallinas infectadas, desperdicios de aves de corral u otros fómites son contaminados con excremento, convirtiéndolos en fuentes importantes de infección (Figura 5) (Saavedra, 2010).

Comentado [u5]: CAMPAÑA NACIONAL CONTRA LA INFLUENZA AVIAR NOTIFICABLE

Actualmente, la Campaña Nacional contra la Influenza Aviar, se realiza con fundamento en el Acuerdo por el que se da a conocer la campaña y las medidas zoonosanitarias que deberán aplicarse para el diagnóstico, prevención, control y erradicación de la Influenza Aviar Notificable, en las zonas del territorio de los Estados Unidos Mexicanos en las que se encuentre presente esa enfermedad, publicado en el DOF el 21 de junio de 2011, el cual establece las medidas zoonosanitarias que permiten diagnosticar, prevenir, controlar y, en su caso, erradicar el virus de la influenza aviar notificable, también cuenta con la información técnica actualizada sobre diagnóstico, epidemiología, constatación, movilización, importación, vacunación y bioseguridad, entre otras, de cualquier virus de influenza aviar que potencialmente pueda afectar, o afecte, a la avicultura nacional y a la salud pública.

Comentado [u6]: quitar el espacio para la tesis final

Comentado [u7]: ESCRIBIR SOBRE FACTORES DE RIESGO EN OTRAS REGIONES Y NO SOLO EN MEXICO

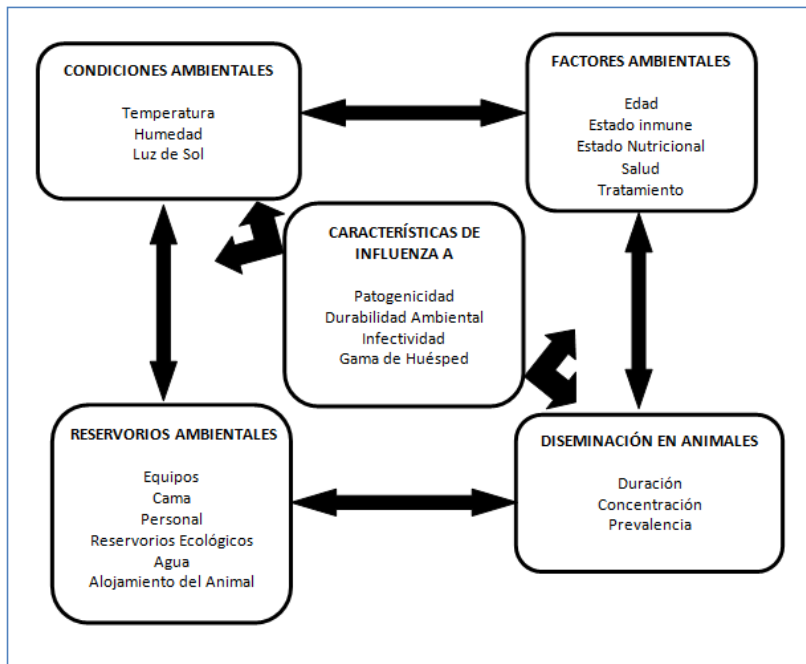


Figura 5. Hipótesis del modelo de asociación entre los factores de riesgo para la presentación de la enfermedad de Influenza Aviar (Basado en Stärk, 2000).

El conocimiento de estos factores es esencial para el control y prevención de las enfermedades, para ello ~~para ello~~ es muy importante primero determinar matemáticamente los factores de riesgo (FR) potenciales (medio-ambientales y de manejo), posteriormente se calcula la relación de estas dos variables, es decir, qué tanto cuando se presenta una variable también se presenta la otra, en este caso se estará estableciendo la fuerza de asociación, la cual puede obtenerse mediante procedimientos denominados medidas de asociación (Stärk, 2000).

Se llama factor de riesgo a una variable que se "cree que está relacionada" con la probabilidad de que se desarrolle la enfermedad en un grupo de individuos expuestos con relación a el grupo de no expuestos. Las medidas de asociación nos indican la fuerza de asociación entre dos variables, tales como la exposición y la enfermedad (Jaramillo *et al.*, 2010).

Las dos medidas de asociación para respuestas categóricas que se usan frecuentemente son: el riesgo relativo (RR) y la razón de momios ó Odds ratio (OR) (Thrusfield, 1991; De Irala *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 2006).

El OR es importante en epidemiología, porque representa una estimación del riesgo relativo en un estudio de casos y controles.

La RR y la OR se interpreta de la siguiente manera (Anderson *et al.*, 2006):

- a) Cuando la RR u OR = 1: la exposición no tiene asociación con la enfermedad.
- b) Cuando la RR u OR > 1: la exposición puede estar positivamente asociada a la enfermedad.
- c) Cuando la RR u OR < 1: la exposición puede estar negativamente asociada a la enfermedad y ser de hecho, un factor de prevención.

1.7 DIAGNÓSTICO

Debido a la variabilidad de los signos clínicos, el diagnóstico clínico se puede ser considerado presuntivo. El diagnóstico definitivo del virus de Influenza puede estar dado por métodos virológicos y serológicos, siendo positivo cuando se realiza el aislamiento e identificación viral (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

Todas las pruebas oficiales de diagnóstico deberán realizarse en los laboratorios oficiales, Laboratorio de bioseguridad 3 (LSB-3) de la CPA (Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales, SENASA (Servicio Nacional de Salud Animal) y en los laboratorios Regionales de CPA y LSB-2 de la CPA (SENASICA *et al.*, 2011).

- Diagnóstico serológico: inhibición de la hemoaglutinación, inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y ensayo inmuno-enzimático (ELISA).
- Diagnóstico virológico: aislamiento viral en embrión de pollo. Índice de patogenicidad intravenoso (IPIV).

- Diagnóstico molecular: ~~RT-PCR~~ (Retrotranscripción - reacción en cadena de la polimerasa) y secuenciación (PANAFTOSA *et al.*, 2010, [SENASICA *et al.*, 2011](#)).

~~Todas las pruebas oficiales de diagnóstico deberán realizarse en los laboratorios oficiales LSB 3 (Laboratorio de bioseguridad 3) de la CPA (Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales), SENASA (Servicio Nacional de Salud Animal), y en los laboratorios Regionales de CPA y LSB 2 de la CPA (SENASICA *et al.*, 2011)~~

1.7.1 Diagnóstico serológico.

El diagnóstico se basa en la detección y medida de niveles de anticuerpos en suero, el resultado demuestra solamente la exposición del individuo a la enfermedad.

a) Técnicas de inmunodifusión en gel de agar (IDGA). ~~La técnica de IDGA se~~ basa en la migración del antígeno y el anticuerpo uno hacia el otro, en un medio de agar. El medio tiene una alta concentración de sales de facilita la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo. Para la realización de la técnica se perforan pocillos sobre el agar de unos 5 mm de diámetro separados entre sí (2.5 mm). ~~a-~~ uno de los pocillos se les añade el antígeno de referencia (nucleocápside) y al resto, las muestras de suero problema; se incuban 24-48 hrs. y se observan las líneas de confluencia formadas. Un resultado es positivo cuando una línea de precipitación se forma entre el antígeno positivo y la muestra de suero contiguos (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

b) ELISA (Ensayo inmuno-enzimático / Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Es la técnica en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima, capaz de generar un producto detectable como cambio de color. La mayoría de los estuches comerciales usan un anticuerpo monoclonal contra la nucleoproteína (NP) y pueden realizarse sin equipo especial

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

de laboratorio y los resultados están disponibles de 15 a 20 minutos. Las desventajas es la falta de sensibilidad y el que aún no han sido validados para todas las aves y mamíferos (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

c) Inhibición de la hemoaglutinación (IH). Se basa en la pérdida de la capacidad hemoaglutinante de un virus al formarse el complejo antígeno-anticuerpo. Cuando se enfrentan anticuerpos conocidos a un virus problema, estos se unen impidiendo la hemoaglutinación viral (provocando la IH). Esta técnica determina los niveles de anticuerpos específicos (IgG) para diferentes subtipos específicos de Influenza A. Los títulos iguales o superiores a 16 son considerados positivos (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

1.7.2 Diagnóstico virológico

Basados en la detección del agente viral por aislamiento en cultivos celulares o huevos embrionados, detección de antígeno y amplificación parcial del genoma viral.

- Aislamiento en embriones de gallinas libres de patógenos específicos (SPF: Specific Pathogens Free). Los virus solamente pueden cultivarse en células vivas, ésta necesidad puede satisfacerse disponiendo de células que actúan como hospedadoras. El embrión de pollo (EP) fue utilizado por primera vez en 1911 por Rous y Murphy para la propagación de un virus oncogénico de las aves, en la actualidad se sigue utilizando por la buena cantidad de virus que se cosechan en el líquido alantoideo, por ejemplo para la producción de vacunas y la propagación de antígenos experimentalmente para diagnóstico.

La técnica se basa en obtener muestras de hisopados cloacales y/o traqueales, materia fecal y/o el pool de órganos (bazo, hígado, pulmón, cerebro, etc.) que posteriormente son procesados e inoculados en la cavidad alantoidea de al menos tres huevos embrionados de gallina SPF de 9 a 11 días de edad; luego de su incubación y pasajes ciegos, los fluidos alantoideos/amnióticos se someten a la

prueba de hemoaglutinación (HA) para evaluar el crecimiento viral, siendo positivo cuando ocurre la HA, es decir, se observan gránulos finos de glóbulos rojos aglutinados (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

- Índice de patogenicidad intravenoso (IPIV): los subtipos de Influenza Aviar producen infecciones asintomáticas o muy leves en aves silvestres y/o domesticas. Sólo algunas cepas de virus de Influenza que contienen los subtipos H5 o H7 han demostrado alta virulencia causando una alta morbilidad y mortalidad en aves. La caracterización de la patogenicidad se realiza mediante la inoculación del líquido alantoideo estéril de los embriones inoculados, por vía intravenosa en aves SPF de 4 a 6 semanas de edad (0.2 ml de virus, título 1:16 y diluido 1:10). Se considerará una cepa de alta patogenicidad aquella que cause letalidad mayor al 75% o un índice de patogenicidad igual o superior a 1.2 dentro de los 10 días post-inoculación. Este criterio es apoyado con el aislamiento de virus de Influenza A y el análisis genómico para identificar cambios en la secuencia de AA en el sitio de escisión proteolítica de la HA (PANAFTOSA *et al.*, 2010; OIE, 2013; SENASA, 2014).

1.7.3 Diagnóstico molecular

Los métodos moleculares permiten detectar el virus directamente en la muestra clínica así como su caracterización genética, el protocolo de manipulación requieren contención biológica nivel 2 utilizando normas de seguridad nivel 3.

- RT-PCR (Retrotranscripción - Reacción en cadena de la polimerasa). La RT-PCR se diferencia de la PCR sólo por la adición de un paso preliminar, la conversión inicial por una polimerasa de ARN en ADN (transcriptasa inversa) (Bustin *et al.*, 2005). La detección cualitativa de virus de Influenza A H5 y H7 de alta patogenicidad en especímenes del tracto respiratorio de humanos, aves domesticas y cultivos celulares utilizando RT-PCR en tiempo real fue diseñado por Spackman *et al.* (2002); ha sido optimizada utilizando un panel específico de

oligonucleótidos partidores, sondas de hidrólisis y el estuche de QIAGEN OneStep RT-PCR (Bustin *et al.*, 2005). En la RT-PCR OneStep (de 1 paso), se puede realizar la transcripción reversa y la PCR en un solo sistema de tampón; la reacción se realiza sin necesidad de añadir reactivos entre los pasos de RT y PCR. Éste método es cómodo ya que existen kits comerciales que contienen todos los reactivos necesarios, incluyendo la enzima transcriptasa reversa, por lo que solamente se necesita la preparación de un tubo para la amplificación de RT. La única desventaja es que tiene una reducida o no sensibilidad para la detección de nuevos subtipos o variantes debido a la alta variabilidad genética especialmente en los genes de la HA y NA (Spackman *et al.*, 2002; Bustin *et al.*, 2005).

La prueba consiste en la amplificación de un segmento específico del genoma del virus, único y característico para cada tipo de microorganismo que se quiera diagnosticar, Permite visualizar de forma inmediata cada ciclo de amplificación a través de la aparición de una señal de fluorescencia, mediada por SYBR Green o sondas marcadas, que determina la concentración de ADN o concentración de un gen presente en una muestra mediante el valor Ct (cycle threshold ó Ciclo umbral). Lo que significa que una alta concentración de ADN tendrá un valor Ct menor que se expresa y visualiza en un ciclo de amplificación temprano (señal de fluorescencia) (SENASA, 2014; FAO, 2014).

La eficiencia de una reacción de RT-PCR se determina con una curva de calibración con diluciones seriadas de una concentración de ADN conocida y sus valores de Ct. La cuantificación de ADN puede ser absoluta o relativa; en la cuantificación absoluta, la curva de calibración es utilizada para determinar la concentración de ADN en una muestra, puesto que dicha concentración se infiere según el valor de Ct encontrado. En la cuantificación relativa, la concentración de ADN de un gen o de un microorganismo de interés se halla en relación con un gen de referencia. En este tipo de cuantificación se usa la curva de calibración como control de calidad, entonces la concentración de ADN en una muestra se determina calculando un valor de ΔCt , el cual corresponde a la diferencia entre los valores de Ct del grupo de interés y el de referencia (Phandanouvong *et al.*, 2010).

- Secuenciación. Es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN. En 1977, se reportaron dos protocolos para la secuenciación de ADN; en ambos métodos se obtiene una autoradiografía y la diferencia está en la secuencia de la molécula que se determina por diferencias en los tamaños de los fragmentos generados.

-Método Maxam y Gilbert ó secuenciación química: determina la secuencia de una molécula de ADN, utilizando químicos que cortan en posiciones específicas fragmentos marcados en sus extremos 5'.

-Método Sanger (utiliza dideoxynucleotidos), mediante un templado de ADN de cadena sencilla sintetiza la hebra complementaria, la cual se termina en posiciones específicas fragmentos de polinucleótidos que traslapan el punto de corte en la primera serie (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

La estrategia básica de la secuenciación de ácidos nucleicos involucra: 1.- La degradación específica y el fraccionamiento de los polinucleótidos de interés a fragmentos suficientemente pequeños para ser secuenciados; 2.- La secuenciación de los fragmentos pequeños; 3.- El ordenamiento de los fragmentos a través de la repetición de los pasos anteriores, usando un procedimiento de degradación que produce una serie de fragmentos de polinucleótidos que traslapan el punto de corte en la primera serie (Spackman *et al.* 2002; PANAFTOSA *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICACIÓN

El ecosistema consiste en múltiples formas de flora y fauna, siendo las aves una de las especies más prolíficas e importantes en el hábitat, juegan un papel importante en la relación depredador - presa en el ecosistema forestal. Las aves silvestres han sido admiradas por su plumaje, su capacidad de caza y los diversos mitos que en torno a ellas han surgido; estas mismas razones han causado que sean constantemente perseguidas, capturadas y vendidas como aves de ornato o mascotas. El resultado de ello pone a muchas especies en alguna categoría de riesgo (CONABIO, 2014). Sumado a esto, los cambios de origen humano en los ambientes naturales, el constante aumento de la población humana y la creciente tasa de contacto entre seres humanos_ animales silvestres / domésticos, aumenta la susceptibilidad a enfermedades emergentes y reemergentes de macroparásitos (helmintos y artrópodos) y microparásitos (bacterias, virus, protozoos) (Saggese, 2007, García, 2008). Las enfermedades de tipo emergentes son predominantemente virales (virus ARN 37%), seguidos por las bacterias (Dabanch, 2003).

El virus de Influenza Aviar actualmente sigue presente en múltiples países, esto es interpretado por organismos sanitarios internacionales como evidencia de la debilidad de los sistemas de vigilancia para advertir el peligro de introducción y difusión de la enfermedad (Zamora, 2008).

Las especies de aves silvestres acuáticas son reservorio natural del virus, por lo que una gran cantidad de estudios han demostrado su participación como dispersoras del virus a nuevas regiones geográficas, esto mediante sus migraciones (Morens *et al.*, 2012). En el presente estudio se buscó analizar especies de aves silvestres albergadas en centros de conservación y rehabilitación, para conocer la prevalencia de Influenza A subtipo H5N2.

3. OBJETIVOS:

3.1 Objetivo general:

- Identificar una región del gen M mediante RT-PCR en tiempo real a partir de hisopados orofaríngeos y cloacales, así como establecer la frecuencia de anticuerpos contra Influenza A en suero de aves silvestres albergadas en dos centros de rehabilitación de fauna en el Estado de México.

3.2 Objetivos específicos:

- Identificar una región del gen M específico para el virus de Influenza Aviar H5N2 mediante la técnica RT-PCR en tiempo real, a partir de muestras de hisopados orofaríngeos y cloacales.
- Intentar el aislamiento viral en embrión de pollo, mediante la inoculación con muestras de hisopados elegidos en base al resultado de RT-PCR en tiempo real.
- Conocer si existe evidencia serológica del virus de Influenza Aviar H5N2 mediante la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación.
- Determinar los parámetros epidemiológicos que pudieran existir, usando la información obtenida de ambos centros de rehabilitación de fauna.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio

Para el presente estudio se muestrearon dos sitios de rehabilitación de fauna del Estado de México, importantes en manejo, rehabilitación (física, clínica y conductual), reubicación y liberación de aves silvestres.

Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS) “Los Reyes”, ubicado en el Municipio La Paz del Estado de México; es una zona semiárida, registra temperaturas en invierno de 21°C - 4.3 °C con menos de 5% de lluvia. En verano la T° es de 28.1°C - 10°C (CONAGUA, 2014).

El zoológico de Zacango está ubicado en el municipio de Calimaya de Díaz González a 14 km de la Ciudad de Toluca, Estado de México, en una zona rural apartada de la civilización. El clima es templado y semiseco de altura, con una temperatura media anual de 13.5 °C y humedad anual relativa es de 63 %. En primavera se alcanzan las temperaturas más altas de hasta 27 °C, mientras que las más frías se dan entre diciembre y febrero, presentándose heladas durante el invierno pero siendo raras las temperaturas mínimas por debajo de -3°C (CONAGUA, 2014).

4.2 Muestras biológicas

Para la selección de los ejemplares se optó por un estudio transversal no probabilístico (muestreo de ejemplares disponibles). El tamaño de muestra se basó en el número total de aves silvestres ingresadas al programa de recuperación, rehabilitación y conservación de especies clave o en riesgo; es decir, se tomó en cuenta ejemplares que son producto de rescate, entregas voluntarias o aseguramientos federales.

Las aves muestreadas se dividieron en tres grupos de acuerdo al orden filogenético del ejemplar: Falconiforme, Strigiforme o y Psittaciforme; por cada individuo muestreado se reportaron datos para establecer antecedentes conocidos y las características de manejo del ejemplar en el centro de albergue (Anexo 1).

4.3 Colección, preservación y transporte de muestras biológicas.

Al ser tomadas las siguientes muestras biológicas se transportaron en cadena en frío al Laboratorio del departamento de Biotecnología en Salud Animal del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias del INIFAP, para su conservación y utilización posterior.

4.3.1 Obtención y conservación del suero sanguíneo

La extracción de sangre (1% de su peso vivo) se realizó por la técnica de punción en vena braquial, o yugular de las aves, se utilizaron jeringas hipodérmicas de 1 mL, 3 mL o 5 mL, con agujas calibre variado (30G x 13mm, 25G x 16mm, 23G x 25mm, 21G x 32 mm), dependiendo el tamaño del ejemplar a muestrear. El procedimiento se llevó a cabo en tubos vacutainer sin anticoagulante que se conservaron a temperatura ambiente hasta la extracción del suero. Para la obtención del mismo se centrifugó la sangre a 1500 rpm 10 min. a 4 °C y se transfirió el suero (sobrenadante) a un vial estéril previamente rotulado con el número de identificación del animal. Se almacenaron a una temperatura de -20°C, para su posterior uso.

4.3.2 Obtención y conservación de hisopados orofaríngeos y cloacales

Se tomaron muestras de mucosa orofaríngea y mucosa cloacal, que se colocaron en 3 mL de medio Leibovitz (In vitro, México) con albúmina sérica bovina al 0.5% y antibiótico-antimicótico 1x (Penicilina 1000 UI/ Estreptomina 1000 ucg / Amfotericina B 0.25 µg/mL en solución de NaCl al 0.85% 100X, *in vitro*,

México). Posteriormente en el laboratorio, los viales con hisopos fueron homogenizados en vortex por 30 segundos para desprender los viriones, se retiró el hisopo y se centrifugaron los tubos a 1500 rpm por 15 min., el sobrenadante se recolectó con una jeringa para ser filtrado con membranas Corning® (0.45µm de diámetro del poro) a un vial estéril, la conservación de la muestra fue a una temperatura de -70 °C.

4.4 Procedimientos y técnicas utilizados para el análisis de muestras:

4.4.1 Detección del Gen M del virus Influenza A.

-Fase 1: Extracción de ARN

Para la extracción de ARN a partir del hisopado orofaríngeo y cloacal se utilizaron 200 µl de la muestra, a las cuales se les agregó 750 µl de Trizol (Reagent Invitrogen, USA.), el procedimiento de extracción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN extraído fue almacenado a -70°C hasta su utilización.

- Fase 2: RT-PCR en tiempo real (One-step).

Para detectar una región del gen M del virus de Influenza, se utilizó la técnica RT-PCR en tiempo real en muestras de hisopados orofaríngeo y cloacal (ARN), respectivamente. El protocolo utilizado fue el reportado por Spackman et al., (2002), adaptado a las condiciones de laboratorio por el personal de la FAO y la OIE (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

La amplificación se llevó a cabo utilizando un termociclador Light Cycler 480 II (Roche, España), con iniciadores específicos para el gen M y el subtipo H5 de IA. Se utilizó una gradilla para termociclador Light Cycler de 96 pozos, en cada pozo se colocaron 8.5 µl de la mezcla de reactivos del Kit Ag Path-ID™ One-step. Consecuentemente se agregaron 4 µl de ARN de las muestras (una muestra

distinta por pozo). Una vez cargada la placa se cubrió con una mica adhesiva Light Cyclor 480 y se introduce al termociclador (Anexo 2).

El programa utilizado para el termociclado fue: 48°C, 30 min.; 95° 10 min., 40 ciclos: 95°C 15 seg., 60°C 1 min.

Es importante mencionar que el Kit Ag Path-ID™ One-step que se utilizó contiene una mezcla de enzimas, la retrotranscriptasa y la polimerasa, esta última es termoestable y por lo tanto no se desnaturaliza durante el primer ciclo del programa, ya que tiene actividad de “hot start” que ocurre a más de 80°C, por lo que empieza a polimerizar cuando inicia el alineamiento de los iniciadores a 60°C.

Cuadro 2. Programa del termociclado

T°	Tiempo	Etapas	Descripción
48°C	30 min.	Transcripción reversa	Genera una copia de la hebra de RNA, pero esta copia es ADNc: Unión del primer a la secuencia del ARNm. La transcriptasa reversa copia la primera cadena de ADNc; posteriormente remueve el ARNm y copia la segunda cadena de ADNc.
95°C	10 min	Inactivación Rtas	El templado, ADNc, comienza el proceso de PCR: 1.-DESNATURALIZACIÓN: Se separan las dos cadenas de ADNc por ruptura de enlaces de hidrógeno.
95°C 60°C	15 seg. 40 min. } 1 ciclos	Amplificación del DNA	2.-HIBRIDACIÓN: Los primers se alinean al extremo 3' y 5' del templado (Ocurre a 60°C). *La sonda hibrida junto con la secuencia de interés.
72°C	7 min.	Paso extra de elongación	EXTENSIÓN: La polimerasa actúa en el complejo primers-templado y empieza su función catalítica, para crear cadenas complementarias, la extensión va del extremo 5' a 3'. *La polimerasa corta al fotocromo del resto de la sonda, permitiendo la emisión de señal fluorescente

4.4.2 Aislamiento viral en embrión de pollo

-Fase 1: Inoculación de embrión de pollo: técnica de inoculación en cavidad alantoidea.

El procedimiento de la técnica se basó en lo descrito por el Manual de Diagnóstico de virus de Influenza en mamíferos y aves de la PANAFTOSA *et al.*, 2010.

Los embriones de pollo SPF (libre de patógenos específicos), de 9-11 días de edad (procedentes de industrias ALPES 7, Puebla, Méx.), se inocularon vía cavidad alantoidea (0.2 mL), 3 EP por cada muestra de hisopados cloacal y orofaríngea determinada previamente positiva a la RT-PCR en tiempo real (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

Los embriones se incubaron a una temperatura de 37.7 °C y 55% de humedad relativa (Incubadora Jamesway), fueron ovoscopiados diariamente para determinar la viabilidad y notificar cambios o muerte. Los embriones muertos a las primeras 24 hrs. posteriores a la inoculación fueron eliminados.

Se recolectó con una jeringa de 10 mL el líquido alantoideo de los embriones muertos a las 48 hrs y vivos a las 72 hrs., transfiriendo 1 mL a un vial estéril (alícuota) y el resto a un tubo de 10 mL, para su conservación a una T° de -70°C. Al momento de la extracción del líquido alantoideo se realizó la evaluación del crecimiento viral usando la prueba de hemoaglutinación (HA), de la manera siguiente:

Sobre una placa de acrílico, con una pipeta se deposita una gota de líquido alantoideo y una gota de glóbulos rojos al 1%, se mezclaron con un palillo haciendo movimientos circulares. La lectura se hizo en un máximo de 3 minutos (NOM-044-ZOO-1995; NOM-056-ZOO-1995).

Interpretación:

Reacción positiva (+): la hemoaglutinación consiste en la formación de gránulos finos de glóbulos rojos aglutinados.

Reacción negativa (-): la mezcla permanece sin cambios.

Posteriormente a la recolección del líquido alantoideo, se siguieron nuevamente los pasos ya descritos para realizar la prueba de RT – PCR en tiempo real y determinar las muestras positivas ($Ct \leq 35$) y la posterior inoculación (un segundo pase) en embrión de pollo SFP (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

-Fase 2 Titulación y cuantificación viral absoluta

Para valorar la infectividad del virus aislado primero se prepararon diluciones logarítmicas decimales (décuples seriadas) en medio PBS con el virus de referencia: IABP subtipo H5N2.

Por cada dilución (10^0 hasta 10^{-10}) se realizó la inoculación de 5 embriones de pollo SFP, cada uno con el volumen de 0.2 mL siguiendo la técnica de inoculación en cavidad alantoidea. Los embriones fueron incubados hasta 72 hrs. a 37.7°C , se revisaron cada día y se descartaron los que murieron durante las primeras 24 hrs. post- inoculación (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

Se anotaron y tabularon los resultados de mortalidad y sobrevivencia de los embriones por cada dilución, tomando como positivos aquellos que fueron positivos a la prueba de Hemoaglutinación en placa (NOM-044-ZOO-1995; NOM-056-ZOO-1995).

Para determinar la Dosis Letal en Embrión de Pollo 50% (DLEP 50%) se utilizaron los datos tabulados de los resultados de la inoculación en EP, para desarrollar el método de Reed y Muench (NOM-044-ZOO-1995).

a) DP= Distancia proporcional.

$$DP = \frac{\% \text{ mayor al } 50\% - 50\%}{\% \text{ mayor al } 50\% - \% \text{ menor al } 50\%}$$

b) Corrección del logaritmo de dilución de base 10= Suma de los exponentes:

$$(\% \text{ mayor al } 50\%) + (DP) = \text{DLEP } 50\%/\text{mL}.$$

Posteriormente en el programa de LighCycler 480® se realizó una curva de calibración o curva estándar, para determinar el Ct y la cuantificación viral absoluta (escala logarítmica) de las muestras positivas al aislamiento viral.

4.5 Serología

La identificación de los anticuerpos en el suero se realizó mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH), se empleó el antígeno de referencia del virus de Influenza Aviar subtipo H5N2 con 4 unidades hemoaglutinantes y 25 µl de suero problema de cada ave (FAO, 2014; PANAFTOSA *et al.*, 2010).

Para realizar la prueba se utilizó una microplaca de 96 pozos de fondo "U", a todos los pozos se les agregó 25 µl de PBS (solución de fosfatos con pH de 7.2), posteriormente en el primer pozo de cada fila se colocaron 25 µl de suero problema, considerando dos pozos más, para colocar los controles positivo y negativo. Se pipeteó 7 veces cada pozo y se diluyó 25 µl de la 1er columna a la última, al final se eliminaron 25 µl. Posteriormente se agregaron 25 µl de antígeno con 4 UHA en cada pozo; se cubrió la placa con un trozo de papel aluminio y se incubó durante 30 minutos a T° ambiente. Consecuentemente se colocan 25 µl de PBS y posteriormente 25 µl de eritrocitos de ave al 1% en toda la placa. Posteriormente, se volvió a cubrir la placa y se incubó por 60min. Finalmente se hizo la lectura.

Control Positivo: Hay una unión antígeno anticuerpo por lo que se observa sedimentación de eritrocitos (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

Control Negativo: No hay anticuerpos por lo que el antígeno se une a los eritrocitos observándose hemaglutinación.

Interpretación: Se consideraron como muestras seropositivas si la reacción de IH se observaba a una dilución $\geq 1:16$; es decir, cuando ocurre la reacción antígeno/anticuerpo, la hemoaglutinación de los glóbulos rojos es inhibida. El

anticuerpo impide que el antígeno adsorba al glóbulo rojo (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

4.6 Metodología estadística

Los datos por orden filogenético (Falconiformes, Strigiformes y Psittaciformes) e individual por cada especie fueron analizados, para determinar las frecuencias y posibles factores de riesgo asociados.

Para los resultados de RT-PCR en tiempo real, se elaboraron tablas de contingencia y medidas de tendencia central por cada tipo de muestra (hisopado orofaríngeo e hisopado cloacal) y su valor de Ct (ciclo umbral).

Se utilizó un análisis bivariado para el análisis de los resultados del estudio serológico; la determinación de posibles factores de riesgo asociados a la exposición del virus, se realizó por medio de pruebas de homogeneidad de proporciones por Chi-Cuadrada (χ^2) y el procedimiento de medida de asociación para determinar el factor de riesgo relativo, mayor a 1 ($OR > 1$) con una significancia del 0.05. Los análisis se realizaron con el programa de cómputo Epi Info™ (Versión 2007).

La determinación de las variables independientes o posibles factores de riesgo fueron obtenidos de información recopilada por el personal que labora y maneja las aves en los centros muestreados (Cuadro 3). Las variables dependientes son el resultado del estudio serológico (estado positivo/negativo a la enfermedad).

Cuadro 3. Factores de riesgo obtenidos de la información de los sitios de muestreo y sus posibles categorías de estudio.

Factor de Riesgo	Descripción	Categoría
1.- TIPO DE MANEJO (ORDEN FILOGENÉTICO)	Manejo y procedimientos de rehabilitación enfocados al grupo taxonómico al que pertenece	<u>PSITTACIFORME*</u>
		STRIGIFORME
		FALCONIFORME
2.- ALBERGUE	Lugar donde son albergadas las aves	ZOOLÓGICO ZACANGO
		<u>CIVS "LOS REYES"</u> **
3.- PROCEDENCIA	Tipo de procedimiento para el ingreso del ave. Si procede del rescate del tráfico ilegal de aves o es entregado voluntariamente por particulares	<u>RESCATE /ASEGURAMIENTO*</u>
		ENTREGA VOLUNTARIA
4.- RECINTO	Tipo de instalación en el que se alberga al ave	CAJA/JAULA*
		RECINTO DE CEMENTO
5.- ESPECIES VECINAS	Albergue relacionado con otras especies contiguas	<u>SI*</u>
		NO
6.- CONDICION DE ALBERGUE	Albergue único para un ejemplar o es compartido con otras aves.	<u>ÚNICO / PERCHA INDIVIDUAL</u>
		GRUPO
7.- MANEJO	Frecuencia de contacto cercano con el ser humano	POCO / NULO
		<u>MANEJO DIARIO*</u>
8.- CONDICIONES DE INSTALACIÓN	La mayor parte del día el ave se encuentra confinada en una instalación o por lo contrario la mayor parte del tiempo está en condiciones de exposición al ambiente	CONFINADO
		EXPUESTA AL AMBIENTE*
9.-ALIMENTACIÓN	Tipo de alimento y manejo previo de éste antes de ser proporcionado al ejemplar	<u>FRUGÍVOROS / GRANÍVOROS*</u>
		CARNÍVOROS / INSECTÍVOROS

(*) Ejemplo de la información obtenida sobre el manejo de cada ejemplar muestreado.

5. RESULTADOS

Durante el período comprendido entre los meses de Junio a Octubre del 2013, se muestrearon un total de 79 aves del orden filogenético Psittaciforme, Strigiforme y Falconiforme albergadas en dos centros de rehabilitación de fauna en el Estado de México (Figura 6 y Cuadro 4); a 48 se les tomó muestras de hisopados orofaríngeo y 46 muestras de hisopados cloacales.

Es importante mencionar que las diferencias entre el número de muestras de sueros e hisopados orofaríngeos / cloacales, se debió a la disponibilidad de ejemplares proporcionados por los centros de captura, aunado a ello se descartaron algunas aves muy pequeñas para evitar daño al manipularlas.

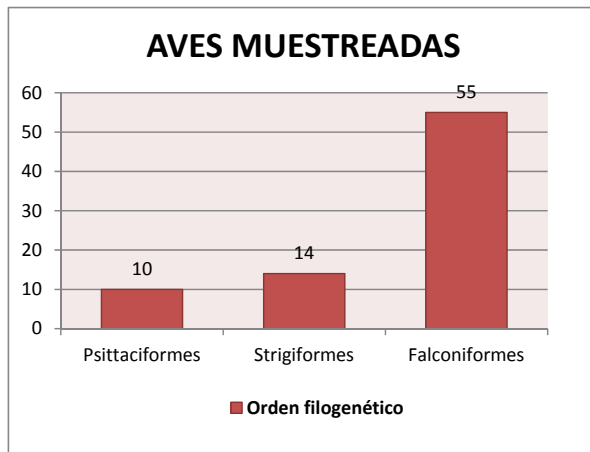


Figura 6. Número de ejemplares muestreados por orden filogenético muestreadas en dos centros de rehabilitación de fauna en el Estado de México.

Cuadro 4. Ejemplares muestreados		
Orden Filogenético	Especie	Nombre Común
Psittaciformes	<i>Ara macao</i>	guacamaya roja
	<i>Ara militaris</i>	guacamaya verde
	<i>Amazona finschi</i>	loro occidental
	<i>Amazona albifrons</i>	loro frente blanca
	<i>Amazona autumnalis</i>	loro cachetes amarillos
Strigiformes	<i>Tyto alba</i>	lechuza de campanario
	<i>Bubo virginianus</i>	búho real
	<i>Megascops asio</i>	tecolote oriental
	<i>Megascops trichopsis</i>	tecolote rítmico
Falconiformes	<i>Buteo jamaicensis</i>	aguililla cola roja
	<i>Parabuteo unicinctus</i>	aguililla de harris
	<i>Caracara cheriway</i>	caracara
	<i>Aquila chrysaetos</i>	águila real
	<i>Buteogallus anthracinus</i>	aguililla negra
	<i>Falco peregrinus</i>	halcón peregrino

Cuadro 4. Orden filogenético, Especie y nombre común de los ejemplares estudiados.

5.1 Detección de una región del Gen M de Influenza A

Para la detección del virus de Influenza por RT-PCR en tiempo real se obtuvo una frecuencia de muestras positivas de: 40 de hisopados orofaríngeos (83%) y 36 hisopados cloacales (78%) con Ct >35.

a) Hisopados orofaríngeos: De 48 muestras se obtuvieron 40 de ellas positivas (83%), de las cuales 32 de 38 aves correspondían a los Falconiformes, 6 de 8 aves fueron Strigiformes y las 2 aves Psittaciformes lo fueron (Cuadro 5).

Cuadro 5. Prueba de PCR en tiempo real: Resultados de Ct de muestras de hisopados orofaríngeos.								
Orden Filogenético	Género	Especie	N. de hisopados Orofaríngeos	CT				
				NEGATIVO		POSITIVOS		
				(-)	35	34	33	32
Psittacidos	<i>Ara</i>	<i>A. macao</i>	1				1	
	<i>Amazona</i>	<i>A. autumnalis</i>	1			1		
Strigiformes	<i>Bubo</i>	<i>B. virginianus</i>	6	1	1	2	1	1
	<i>Megascops</i>	<i>M. asio</i>	1				1	
		<i>M. trichopsis</i>	1				1	
Falconiformes	<i>Buteo</i>	<i>B. Jamaicensis</i>	13			5	6	2
	<i>Parabuteo</i>	<i>P. unicintus</i>	12		3	2	7	0
	<i>Caracara</i>	<i>C. cheriway</i>	8	1		3	4	
	<i>Aquila</i>	<i>A. chrysaetos</i>	3		2		1	
	<i>Buteogallus</i>	<i>B. anthracinus</i>	1				1	
	<i>Falco</i>	<i>F. peregrinus</i>	1					1
Medidas de tendencia central de valores de Ct						MEDIA	MEDIANA	MODA
						Ct 32	Ct 33	Ct 33

Ct =Ciclo umbral

b) Hisopados cloacales: de 46 muestras 39 resultaron positivas, donde 32 de ellas (69.5%) corresponden a el orden filogenético de los Falconiformes, 5 aves (10.87%) fueron Strigiformes y 2 aves (4.347%) Psittaciformes (Cuadro 6).

Cuadro 6. Prueba de PCR en tiempo real: Resultados de Ct de muestras de hisopados cloacales.								
Orden Filogenético	Género	Especie	N. de hisopados cloacales	CT				
				Negativo		Positivo		
				(-)	35	34	33	32
Psittaciformes	<i>Ara</i>	<i>A. macao</i>	1			1		
	<i>Amazona</i>	<i>A. autumnalis</i>	1			1		
Strigiformes	<i>Bubo</i>	<i>B. Virginianus</i>	6	1		2	1	2
Falconiformes	<i>Buteo</i>	<i>B. Jamaicensis</i>	13			1	9	3
	<i>Parabuteo</i>	<i>P. unicinctus</i>	12		3	2	6	1
	<i>Caracara</i>	<i>C. cheriway</i>	8		1	3	3	1
	<i>Aquila</i>	<i>A. chrysaetos</i>	3	1	1	1		
	<i>Buteogallus</i>	<i>B. anthracinus</i>	1			1		
	<i>Falco</i>	<i>F. peregrinus</i>	1				1	

Medidas de tendencia central de valores de Ct	MEDIA	MEDIANA	MODA
		Ct 32	Ct 35

Ct =Ciclo umbral

5.2 Aislamiento viral

Un total de 79 hisopados positivos obtenidos en RT-PCR en tiempo real se inocularon en embriones de pollo (SPF), posteriormente se recolectó el líquido alantoideo de los embriones de pollo y se realizó nuevamente la prueba de RT-PCR en tiempo real, donde solamente resultaron dos muestras positivas. Con el propósito de verificar los resultados, se realizó un segundo pase en embrión de pollo (EP).

Los líquidos alantoideos del primer pase positivos a RT-PCR en tiempo real se inocularon nuevamente en EP, donde fue posible el aislamiento viral. Los líquidos alantoideos obtenidos del segundo pase en EP dieron resultados positivos a la prueba de hemoaglutinación y a la técnica de RT-PCR en tiempo real. Los aislamientos fueron realizados a partir de muestras cloacales, correspondieron a ejemplares albergados en el CIVS “Los Reyes”: 1) aguililla cola roja (*Buteo jamaicensis*) y 2) aguililla de harris (*Parabuteo unicintus*), ambos especímenes resultaron seropositivos a la prueba de IH con títulos de 1:64.

Con el propósito de calcular la concentración viral de las muestras, primero se realizó la titulación viral absoluta en EP de un virus de Influenza Aviar de baja patogenicidad (IABP) subtipo H5N2, el resultado obtenido fue $10^{11.7}$ DLEP₅₀/mL. Posteriormente se realizó una curva estándar para la cuantificación viral, y los dos aislamientos positivos en EP se sometieron nuevamente a la prueba de RT-PCR en tiempo real para determinar los valores de Ct y la cuantificación de las dosis letales (Cuadro 7).

En la Figura 7 se puede observar la amplificación de los genes controles (Diluciones logarítmicas del virus IA) en ciclos muy tempranos, en comparación a la amplificación del aislamiento viral de las muestras de las aves.

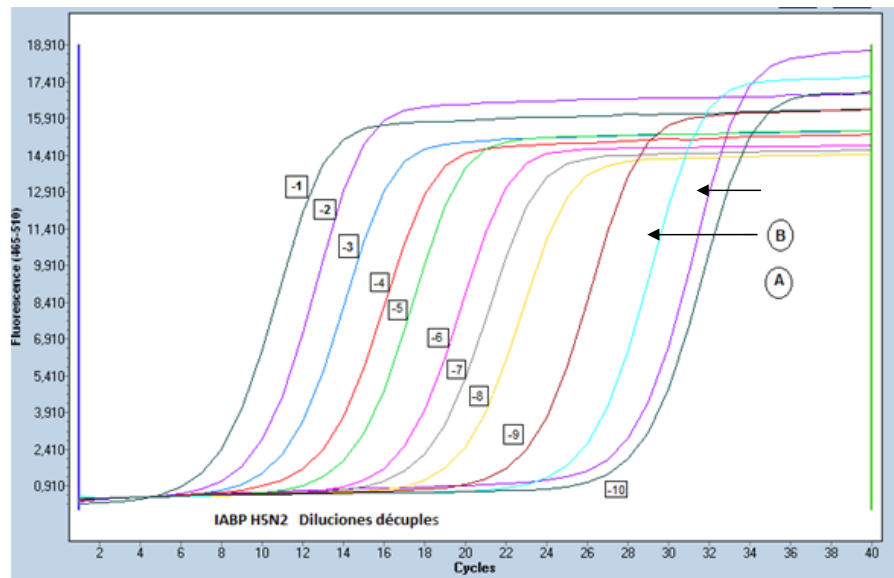
Comentado [u8]: FALTA REAL

Cuadro 7.
Cuantificación viral de muestras positivas a aislamiento viral.

Especie	Tipo de muestra inicial	Valor de Ct	DLEP ₅₀ /mL
<i>Parabuteo unicintus</i>	Muestra de hisopado cloacal	23,27	4.7 x10 ^{4.7}
<i>Buteo jamaicensis</i>	Muestra de hisopado cloacal	18,63	4.24 x10 ^{4.7}

Ct = ciclo umbral.
DLEP₅₀/mL = Dosis letales en embrión de Pollo 50%

Figura 7. Curva de amplificación estándar en RT-PCR en tiempo real con muestras positivas al aislamiento viral.



A= Corresponde a muestra de aguililla cola roja (*Buteo jamaicensis*).

B= Corresponde a muestra de aguililla de harris (*Parabuteo unicinctus*).

-1 a -10 = Corresponde a la amplificación de las diluciones decuplas del virus de IABP H5N2 (10^{-1} a 10^{-10}).

5.3 Serología

De las 79 aves muestreadas, 50 resultaron seropositivas para el subtipo H5N2 de IA, es decir, el 63.2% de los sueros presentaron títulos ≥ 16 (Cuadro 8). Por centro de procedencia: en el CIVS “Los Reyes” el 69% es decir 36 de las 52 aves fueron seropositivas al subtipo H5N2 de la IA; mientras que en el zoológico de Zacango el 51%, es decir 14 de 27 aves positivas.

Cuadro 8. Frecuencias Serológicas											
Orden Filogenético	Especie	Título serológico									
		Negativo					Positivo				
		(-)	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
Psittaciformes	<i>A. macao</i>								1		
	<i>A. militaris</i>							1			
	<i>A. finschi</i>							1			
	<i>A. albifrons</i>						1				
	<i>A. autumnalis</i>						1	5			
Strigiformes	<i>T. alba</i>				1	2					
	<i>B. Virginianus</i>				2	3		1	4	1	
Falconiformes	<i>B. Jamaicensis</i>	2	2		5	1	4	1	1	2	
	<i>P. uncinatus</i>	6	1		3	2	3	2		2	
	<i>C. cheriway</i>	3			1	1	1	2	3	1	1
	<i>A. chrysaetos</i>			1	2						
	<i>B. anthracinus</i>									1	
	<i>F. peregrinus</i>								1		
Total de muestras		11	3	1	14	9	10	13	10	7	1

Como se observó en el Cuadro 8, la mayor frecuencia serológica se presentó en el título de 1:64 (13 sueros) y el título más alto se observó sólo en 1 suero en la dilución 1:512. Para el orden filogenético de Psittaciformes el 100% de las aves fueron seropositivas (10 aves), los Strigiformes el 78.57% (11 de 14 aves) y para los Falconiformes el 52.7% (29 de 55 aves resultaron positivas).

Es importante mencionar que el CENID Microbiología notificó a la SAGARPA-SENASICA los hallazgos y aislamientos; acatando lo establecido por la legislación en la Norma Oficial Mexicana NOM-056-ZOO-1995. Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria (SENASICA, 2014).

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

5.4.-Determinación de factores de riesgo: Análisis Bivariado.

Los factores de riesgo significativos encontrados que pueden estar asociados a la exposición a IA H5N2 en las aves muestreadas, las cuales presentaron una $P < 0.05$ y un $OR > 1$ fueron: tipo de manejo que se le da a los Psittaciformes ($OR = 1.73$) y el tipo de alimento que se les proporciona (Frutos / Granos) ($OR = 1.58$).

Por el contrario, el factor de protección que se encontró significativo ($P < 0.05$) con un $OR < 1$ fue: el tipo de manejo de los Falconiformes ($OR = 0.6$) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Valores de Chi-cuadrada para los diferentes factores de riesgo por exposición al subtipo H5N2 de IA

FACTOR DE RIESGO	CATEGORÍA	No. TOTAL DE AVES	No. DE SERO-POSITIVAS	OR (ODDS RADIO)	χ^2	P
1.- TIPO DE MANEJO (ORDEN FILOGENÉTICO)	PSITTACIFORMES	10	10	1.73 (FR)	6.64	0.01
	STRIGIFORMES	14	11	1.31	1.71	0.19
	FALCONIFORMES	55	29	0.6 (FP)	8.7	0.00
2.- ALBERGUE	ZOOLÓGICO ZACANGO	27	14	0.48	2.31	0.13
	CIVS "LOS REYES"	52	36	2.09		
3.- PROCEDENCIA	RESCATE	40	28	1.8	1.57	0.21
	ENTREGA VOLUNTARIA	39	22	0.55		
4.- RECINTO	CAJA/JAULA INDIV.	42	26	0.88	0.07	0.79
	RECINTO DE CEMENTO	37	24	1.14		
5.- ESPECIES VECINAS	SI	71	47	3.26	2.55	0.11
	NO	8	3	0.31		
6.- CONDICIONES DE ALBERGUE	ÚNICO / PERCHA INDIVIDUAL	21	16	2.26	2.0485	0.15
	GRUPO	58	34	1.4		
7.- MANEJO	POCO / NULO	46	30	1.22	0.18	0.67
	MANEJO DIARIO	33	20	0.82		
8.- CONDICIONES DE INSTALACIÓN	CONFINADO	47	30	1.06	0.0145	0.55
	EXPUESTA AL AMBIENTE	27	20	0.5		
9.- HÁBITOS ALIMENTICIOS	FRUGÍVORO / GRANÍVORO	<u>10</u>	<u>10</u>	1.58 (FR)	5.53	0.02
	CARNÍVOROS / INSECTÍVOROS	<u>69</u>	<u>40</u>	<u>0</u>		

FR= Factor de riesgo
 FP =Factor de protección
 OR= Razón de momios
 χ^2 = Chi cuadrada

6. DISCUSIÓN

México es uno de los países con mayor diversidad de aves, pero tiene el inconveniente del tráfico ilegal de especies, este simboliza el segundo negocio ilegal más redituable en el mundo (después del narcotráfico), siendo las aves y sus productos las más comercializables, lo que representa un alto riesgo para la transmisión de enfermedades a nivel mundial (Zamora *et al.*, 2008).

La explosiva y casi simultánea aparición de Influenza Aviar (IA) en múltiples países, ha sido interpretada por organismos sanitarios internacionales como evidencia de la debilidad de los sistemas de vigilancia y alerta temprana para advertir el peligro de introducción y difusión de la enfermedad (Tracey *et al.*, 2004).

En el presente estudio se buscó analizar la presencia de IA en aves silvestres albergadas en centros de rehabilitación.

En este estudio, se obtuvieron dos aislamientos virales replicados en líquido alantoideo de embriones de pollo SPF a partir de muestras de hisopados cloacales. Las muestras corresponden a dos ejemplares del grupo taxonómico Falconiforme: aguililla cola roja (*Buteo jamaicensis*) y aguililla de harris (*Parabuteo unicinctus*). Es remarcable el contraste entre el aislamiento en embrión de pollo y la prueba de RT-PCR en tiempo real, en donde de un total de 48 hisopados orofaríngeos 40 resultaron positivos, mientras que de 46 hisopados cloacales 39 lo fueron.

Las diferencias encontradas en el número de muestras positivas por aislamiento viral y por RT-PCR en tiempo real pueden deberse a que el RT-PCR detecta al genoma viral, cualquiera que sea su estado (partícula viable o no); mientras que el aislamiento muestra la viabilidad del virus en el huésped. Por otra parte, éstas diferencias pudieran también verse influenciadas por la temporada de muestreo, es decir, el reducido período de excreción viral a través de las secreciones orofaríngea y cloacal por 14 días, aunque la concentración del virus alcanza un

Comentado [u9]: SIN RAYA

máximo a las 24 hrs y empieza a reducirse al cabo de 72 hrs, por lo que las muestras deben ser tomadas en la fase aguda de la enfermedad, lo que dificulta su aislamiento (Webster *et al.*, 1992; Austin and Webster 1993; CENA VECE, 2013). Es importante mencionar que este estudio fue realizado con animales clínicamente sanos y no dirigido a casos clínicos, sino que se realizó un monitoreo general para conocer la distribución epidemiológica de Influenza Aviar en aves albergadas en los centros de rehabilitación (CIVS y zoológico).

El alto número de muestras positivas determinadas por la RT-PCR en tiempo real pueden deberse a la alta sensibilidad que tiene la prueba, para detectar tanto fragmentos de genoma de partículas virales viables y no viables. Un factor importante para la obtención del aislamiento, son las buenas prácticas de manejo posteriores a la toma de muestras, ya que su exposición a temperaturas cálidas puede afectar la viabilidad del virus. En este caso, las muestras se manejaron siempre en cadena fría, sin embargo, las partículas virales son sensibles a cambios de temperatura por ser virus con envoltura lipídica (Talledo *et al.*, 2009).

Probablemente el haber solamente aislado el virus de muestras de hisopados cloacales se debe a que los virus de IABP infectan preferentemente las células epiteliales que recubren el tracto intestinal, los cuales posteriormente son excretados en altas concentraciones en las heces, convirtiéndose en el principal mecanismo de transmisión vía fecal-oral (García *et al.*, 2006; PANAFTOSA *et al.*, 2010; Loza-Rubio *et al.*, 2012). En relación a ello, la transmisión respiratoria representa menos importancia para las aves, aunque posiblemente esta vía tenga un rol importante en algunas especies, particularmente las que viven en tierra (aves domésticas de producción) (CFSPH, 2010; Morens *et al.*, 2012). No obstante, aislamientos recientes de virus del linaje asiático H5N1 (IAAP) han sido encontrados en mayores cantidades en las secreciones respiratorias, que en las heces. Esto sugiere que al menos en algunas aves silvestres, éstas cepas ya no son transmitidas primariamente por la vía fecal - oral (Fouchier *et al.*, 2009).

En patos silvestres los virus de Influenza A se replican preferentemente en las células que recubren el tracto intestinal, no causan signos de enfermedad y se

Comentado [u10]: poner lo de cdc: **Influenza H5N2 en Texas en 2004**

En febrero de 2004, se detectó y registró un brote del virus HPAI (H5N2) en un grupo de 7,000 pollos en el centro-sur de Texas. Este fue el primer brote de HPAI en Estados Unidos en 20 años.^{1,2} No se registró ningún contagio del virus HPAI (H5N2) a humanos. cdc 2012

excretan en grandes concentraciones en las heces (hasta $10^{8.7}$ dosis infectante en embrión de pollo 50%/g; (Webster R. *et al.*, 1992). En un estudio llevado a cabo por la CPA en México (año 2004), se estableció la técnica de RT-PCR para la detección del virus de Influenza Aviar en tejidos de aves infectadas experimentalmente, previamente fue titulado el virus en embriones de pollo de 9-11 días, donde se obtuvo y fue determinado el título viral de $10^{8.7}$ dosis letales en embrión de pollo al 50% ($DLEP_{50}$ /mL) del subtipo H5N2 de IAAP: A/Ck/Querétaro/20/95 (Padilla *et al.*, 2004).

En cuanto a los resultados de la prueba de titulación viral obtenidos en el presente estudio, los virus aislados del líquido alantoideo de embriones de pollo (EP) inoculados con muestras de hisopados cloacales, presentaron títulos de $4.7 \times 10^{4.7}$ (aislado de un *Parabuteo unicinctus*) y $4.24 \times 10^{4.7}$ (aislado de *Buteo jamaicensis*), estas cantidades representan un título menor al encontrado en el virus de referencia IABP subtipo H5N2 ($10^{11.7} DLEP_{50}$ /mL) inoculado experimentalmente, es decir, que las $DLEP_{50}$ /mL de los virus aislados de aves silvestres representan cantidades menores de dosis letales requeridas para matar el 50% de ejemplares inoculados (Embrión de pollo).

Algunos otros estudios realizados por diferentes autores, también notifican una baja frecuencia de aislamientos virales, en relación a la positividad de las muestras en RT-PCR. En el año 2006, en la zona costera de Noreste de Alemania se examinaron un total de 1,991 muestras de heces frescas de aves acuáticas, para determinar la presencia del virus de IA, los resultados obtenidos de la prueba de RT-PCR en tiempo real determinó 11 aves positivas (0.9 %) de 1,268 (gansos y cisnes), al ser inoculadas las muestras en embrión de pollo, sólo se obtuvieron dos aislamientos virales del subtipo H5N2 de IABP (Mettenleiter, 2006). De manera parecida un estudio en aves silvestres acuáticas en Noruega (período 2008 - 2009), las pruebas serológicas determinaron que el 70 % de las aves adultas habían desarrollado anticuerpos contra el virus de Influenza, a pesar de ello únicamente se obtuvo un aislamiento viral de una gaviota (*Rissa tridactyla*) (Tonnessen, 2013). En ambos estudios dejan claro la epidemiología y la

adaptación del virus de IA para no causar signos clínicos relevantes en los hospedadores.

La serología tiene la ventaja de revelar evidencias de infección durante mayor tiempo respecto a las técnicas virológicas, en consecuencia, ofrece mayores oportunidades de detección en los individuos infectados (PANAFTOSA *et al.*, 2010).

Para la determinación de las frecuencias serológicas de cada ejemplar aviar se utilizó la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, que proporciona información de valor *ante mortem* sobre la dinámica de infección del virus de Influenza en aves; sin embargo, genera poca explicación sobre la infección clínica en los animales, por lo que detecta el nivel de anticuerpos ante la exposición con el antígeno, pero no necesariamente la presencia de la enfermedad (Janke, 2000).

En el presente estudio realizado, la exposición al subtipo de Influenza A/H5N2 representó que 50 sueros de 79 aves fueron positivos, es decir el 63.3%. En cuanto al orden filogenético correspondió a lo siguiente: 20% fueron Psittaciformes (10 aves), 22% Strigiformes (11 aves) y el 58% Falconiformes (29 aves). Los títulos positivos registrados de estas aves, representan como valor de título mínimo encontrado de 1:16 (9 sueros), el valor de frecuencia más repetido fue de 13 sueros con 1:164 y el valor máximo fue de un ave del orden falconiforme (*Falco peregrinus*) con un título de 1:512.

La razón que probablemente pueda explicar estos resultados, es que los ejemplares seropositivos durante su vida libre o incluso en cautividad, cazaron o recibieron como alimento aves de producción vivas, que pudiesen ser hospedadoras de algún subtipo del virus de influenza aviar, ya que es importante tener en cuenta que hay regiones del territorio mexicano donde aún no ha sido posible la erradicación del virus de IA en su forma patógena (IAAP). Esporádicamente en zoológicos y centros de rescate se alimenta a las aves de presa con carne de pollo fresca, que procede de planteles avícolas, la cual no es

sometida a ningún análisis para Influenza A u otra enfermedad antes de ser entregada como alimento (González *et al.*, 2012). Un estudio realizado por la Universidad Autónoma de Barcelona, España, demostró experimentalmente que los halcones híbridos gyr – sacre (*Falco rusticolus x Falco cherrug*) son altamente susceptibles a la infección por el virus H5N1 de la gripe Aviar, desempeñando así un papel importante en la propagación de los virus, ya que lograron por primera vez con éxito la infección natural al alimentar a las aves (halcones híbridos) con presas infectadas experimentalmente con virus de IABP e IAAP, con ello se demuestra que el adquirir aves de presa silvestres para cetrería o como mascotas, propicia una situación de riesgo para el ser humano (Bertran *et al.*, 2012).

Una hipótesis sobre la seropositividad de las aves, va dirigida al análisis y descripción del tipo de albergue de las aves, ya que pueden existir factores que pudieran influir a la transmisión de IA. En los centros de rehabilitación los ejemplares en su mayoría están separados por tipo de especie y basado en ello las instalaciones son diferentes para satisfacer al mínimo las necesidades de vuelo y de espacio; por ejemplo para el albergue de las aguilillas de harris (*Parabuteo unicintus*) las medidas oscilan entre 10m x 5m aproximadamente, para los de la especie caraca (*Caracara cheriway*), aguilillas cola roja (*Buteo jamaicensis*), lechuza de campanario (*Tyto alba*) y búho real (*Bubo virginianus*); las instalaciones cuentan con medidas aproximadas por albergue de 4 x 4 m.

En el caso específico de aves que están albergadas individualmente en una jaula o caja transportadora (como es el caso de la mayoría de Psittaciformes, el halcón peregrino (*Falco peregrinus*), tecolote oriental (*Megascops asio*) y tecolote rítmico (*Megascops trichopsis*), éste tipo de instalación es para albergar solamente un ejemplar, son pequeñas, metálicas y contienen aditamentos plásticos para ofrecer el agua de bebida y alimento. Comúnmente las aves son acomodadas contiguamente, dejando así que los ejemplares en posiciones cercanas, unos con otros, resaltando aquí que cada ave tiene diferente origen geográfico, procedimiento de traslado y manejo sanitario previo a ser albergado. Esta situación expone a ejemplares sanos a adquirir el virus de IA de aves vecinas, a

Comentado [u11]: pon NI

través del contacto directo con secreciones de aves hospedadoras del virus de IA (DGVS, 2010).

Un hecho documentado, describe que al hacerse un monitoreo virológico de rutina en aves importadas a Japón, se aislaron dos virus de IA en embriones de pollo inoculados con muestras de periquitos cuello anillado (*Psittacula krameri manillensis*) importados de Pakistán. El primer virus, A / perico /Chiba/1/97, se aisló de la tráquea de un pájaro que murió en una tienda de animales dentro de los 10 días posteriores a ser importadas, en marzo de 1997. El segundo virus, A / perico /Narita/92A/98, también aislado de órganos respiratorios, provino de un ave que murió en la estación de cuarentena del aeropuerto de Narita, en Japón, en junio de 1998; ambos aislados fueron identificados mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación convencional como virus de la gripe A del subtipo H9N2 (Mase *et al.*, 2001).

El estar en contacto estrecho con la instalación, aunado con la cualidad del virus para sobrevivir en diferentes fómite, puede ser que los ejemplares absorban las partículas virales directamente del fómite (García *et al.*, 2006; PANAFTOSA *et al.*, 2010; Loza-Rubio *et al.*, 2012; González *et al.*, 2012). Uno de los factores en común en diferentes tipos de albergue es la presencia de vehículos que pudieran diseminar partículas de virus de una instalación a otra, un ejemplo son los insectos, caso particular de las moscas, que pueden diseminar partículas virales a través del contacto directo (CFSPH, 2010).

Otra hipótesis del modo en que pudieron estar expuestas las aves a IA previamente a ser ingresadas a un centro de rehabilitación de fauna, es el comportamiento de las aves en vida silvestre, ya que para algunas aves es normal el volar largas distancias para migrar en invierno, reproducirse o anidar en diferentes sitios (CONABIO, 2014). De ahí que pueden intercambiar virus con otras poblaciones en los sitios donde realicen escalas o paradas, incluyendo los lugares donde pasan el invierno (CFSPH, 2010).

Por ejemplo, en el caso de los ejemplares de aguilillas cola roja (*Buteo jamaicensis*) y aguilillas de harris (*Parabuteo unicintus*) se distribuyen en México desde Baja California y el límite norte de México hacia el sur hasta Veracruz y Chiapas. Migrando en épocas de apareamiento hacia el norte y en invierno para la época de anidación se trasladan al sur del país (CONABIO, 2014). Un ejemplo de lo ya descrito, está documentado en un estudio realizado en Minnesota, E.U. A durante el período 2007 y 2008, donde se obtuvo dos aislamientos del virus de IA (H13N9) en pelícanos blancos americanos (*Pelecanus erythrorhynchos*), al analizar la partícula viral genéticamente se demostró que el primer virus estaba relacionado con el virus de IA en gaviotas y aves costeras en América del Norte y el segundo virus presentaba un linaje relacionado con los virus de Eurasia. Lo que demuestra el movimiento global de los virus y la recombinación de ellos en diferentes especies de aves (Lebarbenchon *et al.*, 2010).

Los tres requisitos que deben estar presentes para la transmisión de patógenos causantes de enfermedades respiratorias entre animales es: 1.- la excreción del agente viral por animales infectados, 2.- concentración crítica del virus en secreciones y excreciones del hospedador y 3.- el contacto entre animales susceptibles y el agente causal (Maes, 1997).

Hay una gran variedad de aves que ingresa a los centros de rehabilitación por diferentes vías: por ejemplo, las entregas voluntarias a través de particulares, brigada de protección animal (H. cuerpo de bomberos) o bien por conducto de decomisos de la PROFEPA (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente) y de la UEIDAPLE (unidad dependiente de la PGR), en todos estos diferentes casos se desconoce la información sobre el tipo de manejo que se le dio al ejemplar antes de su ingreso al centro (DGVS, 2010).

En este estudio los factores de riesgo asociados a la exposición de IA subtipo A/H5N2 encontrados, fueron los que presentaron valores de riesgo relativo mayor a 1 (OR>1 y P<0.05): tipo de manejo que se le da a los Psittaciformes (OR = 1.73)

y el tipo de alimento que se les proporcionan (frutos / granos) (OR = 1.58). Por lo contrario, el factor de protección encontrado fue el tipo de manejo de los Falconiformes (OR = 0.6).

Los Psittaciformes son la especie que más comúnmente se comercializa ilegalmente en México (65,000 a 78,500 ejemplares anualmente). El proceso implica la extracción directa de la vida silvestre (estrés), traslado y distribución en condiciones de hacinamiento con ejemplares enfermos, todo esto antes de llegar al consumidor y posteriormente su ingreso a los centros de albergue (CIVS/zoológico). En el proceso se presenta una mortalidad del 77%, los ejemplares sobrevivientes quedan susceptibles a agentes patógenos virales, ya que sus sistema inmune se encuentra disminuido, sumado a esto la mayoría de las veces el dueño no les proporcionan condiciones de albergue, alimento o manejo sanitario adecuado (DGVVS, 2010; Cantú *et al.*, 2014).

El manejo que se proporciona a estos ejemplares en un CIVS, es el alojarlos en recintos individuales (jaula), relativamente pequeño, lo que puede provocar que el ave tenga estrecho contacto con su albergue. Algunas veces en este tipo de recintos no se aplican efectivamente normas de bioseguridad, tales como, el aislamiento de las nuevas aves (cuarentena), limpieza y desinfección de las jaulas; el resultado de ello es la sobrevivencia de las partículas virales en el albergue (Alfonso, 2010; PANAFTOSA *et al.*, 2010; González *et al.*, 2012).

El siguiente factor de riesgo significativo correspondió al tipo de alimento que se les proporciona, que presentó 0.58 más posibilidades de ser positivo al virus de Influenza respecto a las demás categorías analizadas. Este factor no incluye como tal a lo que comen, sino que va enfocado a las prácticas de manejo de estos alimentos, antes de ser proporcionado e ingerido. Describiendo un poco, el hecho de preparar el alimento incluye un número variado de personal que realice esta práctica, desde el momento en que se corta el alimento (frutos), se sirve en los utensilios plásticos y se distribuye a cada uno de los ejemplares. Esto es importante ya que puede existir la posibilidad del transporte del virus, al tener contacto directo y/o dispersión de éste a través del humano (participando como

vehículos transmisores) ya que una misma persona puede tener contacto directo con secreciones / heces de enfermos, materiales (utensilios dentro de la jaula), semillas, agua, equipo y ropa contaminados, todo esto previo a alimentar a un ejemplar (García *et al.*, 2006; OIE, 2013).

El manejo en general que se les da a los ejemplares del orden filogenético Falconiforme, en este estudio fue considerado como un factor de protección para la positividad serológica del virus de Influenza Aviar, ya que se disminuye hasta un 40% las posibilidades de adquirir el virus de IA.

Este tipo de aves en los CIVS se les considera como las especies con mayor éxito para la rehabilitación (física, conductual y clínica) y la liberación en el medio silvestre. La mayoría de las aves de presa necesitan un manejo de rehabilitación específico, el manejo está dirigido en cuidar el aspecto de que el ejemplar en lo posible debe permanecer aislado y evitando así cualquier fuente de estrés (no toleran la presencia humana ni la manipulación). Uno de los procedimientos comunes es el ingresar a los ejemplares en una cámara de muda (cámara cubierta con plástico oscuro en su interior y exterior, para aislar el ruido, factores ambientales) y la asignación de un percha o posadero individual (DGVS, 2010).

Una característica igualmente importante de manejo de estas aves, es el tipo de alimento que se les proporciona, es decir no se les alimenta con aves vivas, aspecto que evita el factor de riesgo de ingerir carne o vísceras infectadas con virus de IA. Un ejemplo de ello fue lo ocurrido en la clínica Falcon Al Safa en Dubai, Emiratos Árabes, a la cual se ingresó un halcón peregrino (*Falco peregrinus*) y posterior a las 48 hrs. de ser hospitalizada murió a pesar de la atención y del tratamiento proporcionado. El halcón de 2 años, por ser un ave utilizada para cetrería, antes de su muerte había estado en un viaje de caza en Siria con su dueño. El cadáver fue sometido a un examen post-mortem, y las investigaciones dieron como resultado el aislamiento de un subtipo H7N3 del virus de IA (Manvell, *et al* 2000).

El dar éste tipo de manejo a estas aves de alguna manera evita o disminuye posibilidades de exposición hacia los virus de IA. Es decir, en éste procedimiento se observa que una enfermedad no sólo está influenciada con la presencia de agentes infecciosos específicos, sino también por la compleja interacción entre los factores relacionados al agente, al hospedador y al ambiente (Jaramillo y Martínez, 2010; *CENAVECE*, 2013).

En estudio realizado en aves de presa, durante dos temporadas de caza (2006/2007 y 2007/ 2008) en Alemania, los cetreros tomaron hisopos traqueales y cloacales de 1.080 aves de presa que fueron capturados por sus aves de cetrería (un total de 54 aves). Al realizar la prueba de RT-PCR detectaron que 74 gaviotas, es decir, el 4.1 % y 53 patos (3.8 %) fueron positivas a Influenza Aviar (subtipos H6, H9, o H13). Las pruebas de serología realizadas a las aves de cetrería resultaron negativas para virus de Influenza Aviar, al igual que las muestras de suero de los 43 cetreros resultaron positivos para Influenza A en la prueba de ELISA, pero siendo negativos a la prueba microneutralización contra los subtipos H5 y H7 y la inhibición de la hemoaglutinación contra los subtipos H6, H9 y H13. En conclusión el estudio demostró la participación de las aves acuáticas como reservorios para los virus de IA, en cambio las aves de caza y los cetreros no parecen tener un alto riesgo de contraer el virus al tener contacto con las presas de caza (Kohls *et al.*, 2011).

7. CONCLUSIONES

En conclusión, en este estudio se observó la prevalencia de Influenza Aviar subtipo H5N2 en aves silvestres del orden filogenético Psittaciformes, Strigiformes y Falconiformes, indicando una circulación viral activa en los centros de rehabilitación de fauna silvestre muestreados. El principal factor de riesgo para la exposición de las aves es la constante movilización e introducción de animales sanos y/o enfermos dentro de ambos centros de conservación. Es importante resaltar que las aves de las cuales se obtuvo el aislamiento viral no presentaban signos clínicos visibles, por ello, se debe considerar en la manera de lo posible el implemento de vigilancia cuarentenal para los ejemplares de nuevo ingreso. Este estudio representa la primera notificación del virus de Influenza en este tipo de aves en México.

8. RECOMENDACIONES

Se debe promover información sobre los riesgos para la salud de la población humana y animal, al seguir participando en el tráfico ilegal de especies, al comprar ejemplares extraídos del medio silvestre. También es importante incrementar el monitoreo serológico para los subtipos de Influenza circulantes en los centros de rehabilitación, pues una detección y confirmación diagnóstica de casos son fundamentales para asegurar un tratamiento adecuado y oportuno, y así evitar la propagación y la mutación del agente viral en otras especies. Por lo tanto, se debe considerar un manejo sanitario adecuado en las instalaciones, hacer uso de la correcta desinfección y en la manera de lo posible poner en vigilancia (cuarentena) los nuevos ejemplares a ingresar. Es importante se capacite el personal para que conozca el papel de las aves silvestres como reservorios naturales de Influenza, factores de riesgo asociados a la enfermedad y la aplicación de las medidas de bioseguridad y manejo para reducir en gran medida la transmisión de los virus de Influenza Aviar.

9. REFERENCIAS

Alfonso P. Amenazas y oportunidades de reducción de riesgos por virus Influenza en la interfase animal hombre. *Revista Salud Animal*. 2010. 32(1): 1-10.

Anderson M, Nelson A. Enfoque en epidemiología de campo. North Carolina Center for Public Health Preparedness-The North Carolina Institute for Public Health. Vol. 3 Núm. 6. Acceso: http://cphp.sph.unc.edu/focus/vol3/issue6/3-6DataTests_espanol.pdf

Austin F. and Webster R. Evidence Of Ortho- And Paramyxoviruses In Fauna From Antarctica. *Journal of Wildlife Diseases*. 1993, 29(4): 568-571.

Bertran K, Busquets N, Abad FX, García de la Fuente J, Solanes D. Highly (H5N1) and Low (H7N2) Pathogenic Avian Influenza Virus Infection in Falcons via Nasochoanal Route and Ingestion of Experimentally Infected Prey. *PLoS ONE*. 2012. 7(3); 32107 – 32109.

Bustin S. and Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*. 2005. 109: 365–379.

Cantú J., Sánchez M., Grosselet M. y Gámez J. Tráfico ilegal de Pericos en México. *Defenders of Wildlife de México & Teyeliz, A.C.* [Pub. en línea] <<http://www.pericosmexico.org/>> [Fecha de acceso Marzo 2014].

Cao L., Liao L., Liao M., Jiao P., Song Y., Yuan R. and Wei L. Complete Genomic Sequence of an H5N1 Influenza Virus from a Parrot in Southern China. *Journal Virology*. 2012, 86(16): 8894.

Cárdenas E. Influenza Aviar ¿Una Amenaza Para El Ser Humano?. Tesis de Licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo, Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia. 2006:4-6.

Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE). Influenza Aviar. [Pub. en línea]. <<http://www.cenavece.salud.gob.mx/-emergencias/interior/flu-aviar.htm>> [fecha de acceso 20 de Sep. 2013].

Choi J., Kang H., Jeon W., Choi K., Kim K., Song B., Lee H., Kim J. and Lee Y. Characterization of Clade H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses Isolated from Wild Birds (Mandarin Duck and Eurasian Eagle Owl) in 2010 in Korea. 2013. 5(4): 1153-1155

Claas E., Osterhaus A., Van B., De Jong J., Rimmelzwaan G. & Senne D. Human Influenza A H5N1 virus related to a HPAI virus. Lancet. 2002: 472-477.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Listado de Aves – México. 2014. [Pub. en línea] <http://avesmx.conabio.gob.mx/lista_ave> [Fecha de acceso Marzo 2014].

Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). Sistema Metereológico Nacional (SMN). [Pub. en línea]. <<http://www.http://smn.cna.gob.mx>> [fecha de acceso 7 Febrero del 2014].

Cox N. & Subbarao K. Influenza. Lancet 1999; 354: 1277-1282.

Dabanch P. Zoonosis. Revista Chilena de Infectología. 2003, 20 (1): 47 – 51.

De Irala J, Fernandez-Crehuet R, et al. Intervalos de confianza en regresión logística: interpretación de resultados de programas estadísticos. Rev. Panam. Salud Pública/Pan. Am. J. Public Health 1997; 1(3): 230-233.

Dennis J. A review of avian Influenza in different bird species. Vet. Microbiol. 2000, (74): 3-13.

Dirección General de Vida Silvestre (DGVSV). Manual de rehabilitación de aves de presa en los Centros para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS). SEMARNAT. 2010; 1ra edición: 18 -39.

Fouchier R. and Munster V. Epidemiology of low pathogenic avian Influenza viruses in wild birds. Rev. Sci. tech. Off. int. Epiz., 2009, 28 (1): 49-58.

Furuse Y., Suzuki A., Kamigaki T. and Oshitani H. Evolution of the M gene of the Influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis. Virology Journal. 2009. 6(67): 1-2.

García F. Enfermedades Infecciosas emergentes: interacción entre el mundo microbiano y las sociedades humanas. Acta médica. Costarricense. 2008, 50 (3): 136-143

García J., Ramos C. La Influenza, un problema vigente de salud pública. Salud Pública Méx. 2006: 48:244-267.

García M., Crawford J., Latimer J., Rivera-Cruz E. & Perdue M. Heterogeneity in the hemoagglutinin gene and emergence of highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian Influenza viruses from México. Journal of General Virology. 1996, (77): 1493-1504.

Ghersi B., Blazes D., Icochea E., Gonzalez R., Kochel T., Tinoco Y., Sovero M., Lindstrom S., Shu Bo., Klimov A., Gonzalez A., and Montgomery J. Avian Influenza in Wild Birds, Central Coast of Peru. Emerging Infectious Diseases. 2009, 15 (6): 935 - 938.

González A., Gaete Á., Moreno L., Ardiles K., Cerda F., Mathieu C., Ortega R. Anti-cuerpos séricos contra la enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar en aves rapaces de Chile. Revista de MVZ Córdoba. 2012, 17(3): 3119-3123.

[Hause B., Ducatez M., Collin E., Ran Z., Liu R., Sheng Z., Armien A., Kaplan B., Chakravarty S., Hope A., Wbly R., Simonson R. and Li F. Isolation of a novel swine Influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human C viruses](#)

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Sin Cursiva, Color de fuente: Texto 1

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Sin Cursiva, Color de fuente: Texto 1

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Sin Cursiva, Color de fuente: Texto 1

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Sin Cursiva, Color de fuente: Texto 1

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Sin Cursiva, Color de fuente: Texto 1

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Sin Cursiva, Color de fuente: Texto 1

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Sin Cursiva, Color de fuente: Texto 1

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Sin Cursiva, Color de fuente: Texto 1

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Sin Cursiva, Color de fuente: Texto 1

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Sin Cursiva, Color de fuente: Texto 1

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Sin Cursiva, Color de fuente: Texto 1

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Sin Cursiva, Color de fuente: Texto 1

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Sin Cursiva, Color de fuente: Texto 1

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Sin Cursiva, Color de fuente: Texto 1

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Hawkins M., Crossley B., Osofsky A., Webby R., Lee C., Suarez D. and Hietala S. Avian Influenza A virus subtype H5N2 in a red-lored Amazon parrot. Journal of the American Veterinary Medical Association. 2006. 228(2): 236-241.

Con formato: Fuente: Sin Cursiva, Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Fuente: Sin Cursiva, Inglés (Estados Unidos)

Hénaux V. and Samuel M. Avian Influenza Shedding Patterns in Waterfowl: Implications for Surveillance, Environmental Transmission, and Disease Spread. Journal of Wildlife Diseases. 2011, 47(3): 566–578.

Janke BH. Diagnosis of swine Influenza. Swine Health Prod J 2000; 8 (2): 79-84.

Jaramillo C. y Martínez J. Epidemiología Veterinaria. Manual moderno. 2010, 1ra edición: pp 52 -70.

Jiménez L. Desarrollo de un Biológico contra Influenza Porcina y Evaluación en un modelo *in vivo* de su respuesta inmune para uso potencial en cerdos. Posgrado en Salud Animal Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2012: (1). 6 - 12.

Kim H., Park C., Oem J., Bae Y., Choi J., Lee O. and Lee Y. Characterization of H5N2 Influenza viruses isolated in South Korea and their influence on the emergence of a novel H9N2 Influenza virus. Journal of General Virology. 2010: 91(1). 13836–13837.

Kohls A., Mohamed H., Harder t., Jansen A., Lierz P., Lüscho D. Avian Influenza virus risk assessment in falconry. Virology Journal. 2011, 8(187): 2-4.

Lebarbenchon C., Sreevatsan S., Ramakrishnan M., Poulson R., Goekjian V., Di Matteo J., Wilcox B. and Stallknecht D. Influenza A Viruses in American White Pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). Journal of Wildlife Diseases. 2010, 46(4): 1284–1289.

Loza E., Diosdado F., Vargas A., Hernández A., Banda V., Morilla A., y García J. Diagnóstico serológico de Influenza Aviar por medio de una técnica de

microinmuno-difusión (midg) en agar. *Técnicas Pecuarias Méx.* 2012. (35)3: 166-168.

Maes D. Risk indicators for the seroprevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in slaughter pigs from farrow to finish pig herds. *Epidemiologie at Santé Animale.* 1997. 8(187): 31-32.

Manvell R., McKinney P., Wernery U. and Frost K. 1 Isolation of a highly pathogenic Influenza A virus of subtype H7N3 from a peregrine falcon (*Falco peregrinus*). *Avian Pathology Journal.* 2000, (29): 635– 637.

Martin V., Forman A. y Lubroth J. Preparándose para la Influenza Aviar altamente patógena. Organización Mundial de Salud Animal (OIE). 2007, (1): 6-12

Mase M., Imada T., Sanada Y., Etoh M., Sanada N., Tsukamoto K., Kawaoka Y. and Yamaguchi S. Imported Parakeets Harbor H9N2 Influenza A Viruses That Are Genetically Closely Related to Those Transmitted to Humans in Hong Kong. *Journal Virol.* 2001. 75(7): 3490- 3493.

Mettenleiter T. Active Surveillance for Avian Influenza Virus Infection in Wild Birds by Analysis of Avian Fecal Samples from the Environment. *Instituto Friedrich Loeffler.* 2006, [Pub. en línea] <<http://www.madrimasd.org/informacionidi/noticias>>.

Morens D. and Taubenberger J. 1918 Influenza, a Puzzle with Missing Pieces. *Emerging Infectious Diseases.* 2012, 18(2): 332 -334.

Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng H, Kawaoka Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in Influenza A virus particles. *Nature* 2006; 439: 490-492.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Confirman brote de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad subtipo H7N3 en Jalisco, México. 2012. [Pub. en línea]

<<http://www.rlc.fao.org/es/prensa/noticias/confirman-brote-de-influenza-aviar-de-alta-patogenicidad-tipo-h7n3-en-jalisco-mexico/>> [Fecha de acceso Marzo 2014].

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Situación en el Continente Americano: Influenza Aviar. 2007, [Pub. en línea] <http://www.rlc.fao.org/es/prioridades/transfron/aviar/paises/mexico.htm> [Fecha de acceso Marzo 2014].

Organización Mundial de sanidad animal (OIE). Fichas de información general sobre enfermedades animales Influenza Aviar. [Pub. en línea] <www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/AI-ES.pdf> [Fecha de acceso 24 de Agosto 2013].

Padilla R., Fernández E., Cachon M. y Noriega L. Influenza aviar: Histopatología y detección viral por RT-PCR en tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina. *Vet. Méx.* 2004; 35(1): 6-9.

PANAFTOSA, OPS y OMS. Diagnóstico de virus de Influenza en mamíferos y aves. Rio de Janeiro 2010.

Pannwitz G., Wolf C. and Harder T. Active Surveillance for Avian Influenza Virus Infection in Wild Birds by Analysis of Avian Fecal Samples from the Environment. *Journal of Wildlife Diseases.* 2009, 45(2): 512–518.

Polo G. Aspectos moleculares del virus de la Influenza A subtipo H1N1. *Rev. Med. Vallejana* 2009. 6(1): 48-51.

Saavedra C. Influenza Aviar, aves acuáticas y ecosistemas productivos. *Wildlife Conservation Society.* 2010. 1ra edición: 16 -22.

Saggese M. Medicina de la conservación, enfermedades y aves rapaces. Hornero. *Revista Bio-médica* 2007, 022 (02): 117-130.

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. 1996. NORMA Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar. *Diario Oficial de la Federación (DOF9)*, Febrero 2014.

Secretaria De Agricultura, Ganaderia Y Desarrollo Rural. 1999. NORMA Oficial Mexicana NOM-056-ZOO-1995, Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria. Diario Oficial de la Federación (DOF9), Febrero 2014.

SENASICA, DINESA y GEESA. Manual de procedimientos para la prevención, control y erradicación de la Influenza Aviar de alta patogenicidad (IAAP). SAGARPA. 2011.

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Manual de Procedimientos: Influenza Aviar [Pub.] < www.senasa.gov.ar > [fecha de acceso Enero 2014].

Simonsen L. The global impact of Influenza on morbidity and mortality. Vaccine. 1999. 1(17): 4-7.

Soriano L. Monitoreo de Influenza Aviar en aves silvestres en humedales de la República Mexicana. Tesis de Maestría en Ciencias de Biomédica. IPN. México, D.F. 2009: 1. 12 -24

Spackman E, Senne AD, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, et al. Development of a realtime reverse transcriptase PCR assay for type A Influenza virus and the avian H5 and H7 hemoagglutinin subtypes. J Clin Microbiol . 2002. 40: 3256-3260.

Stärk DCK. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine-A literature review. Vet J. 2000. 159: 37-56.

Suzuki Y. Recent research on Influenza virus receptor and the mechanism of its host range mutation. Glycoforum. 2013. [Pub. en línea] <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/glycomicrobiology/GM10/GM10E.html>> [Fecha de acceso Enero 2014].

Talledo M. y Zumaeta K. Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1. Rev. peru. biol. 2009. 16(2): 228-231.

Taubenberger J., Morens D. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. Emerging Infectious. 2006. 12: 15-22.

The center for food security & public health (CFSPH). Influenza Aviar de alta patogenicidad. College of veterinary Medicine Iowa state university Ames. Última actualización: Enero de 2010. 3: 2-7.

Thrusfield M. Demonstrating association. Veterinary Epidemiology. Ed. Butterworth Heinemann. 1991. 1:141.

Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., Chen Li., Johnson A., Tao y., Dreyfus c., Yu W., McBride R., Carney P., Gilbert A., Chang J., Guo Z., Davis C., Paulson J., Stevens J., Rupprecht C., Holmes E., Wilson I. and Donis R. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. PLoS Pathog. 2013, 9(10): 1003657.

Tønnessen R. Influenza virus in wild birds in Norway. Norwegian School of Veterinary Science. 2013. [Pub. en línea] www.sciencedaily.com/releases/2013/09/130911093051.htm [Fecha de acceso Enero 2014].

Tracey J., Woods R., Roshier D., West P. and Sauders R. The Role of wild birds in the transmission of avian Influenza for Australia: an ecological perspective. Emu. 2004. 104: pp 109 -124.

Valdez R. Pandemia de gripe en Sinaloa, 1918 – 1919. Elementos. 2002. (47): pp. 37–43.

Ventocilla K., Icochea E., Gonzales R. González A. Presencia del virus de la Enfermedad de Newcastle en Aves silvestres de una Laguna albúfera cercana a Lima. Revista de Investigación Veterinaria. Perú. 2011. 22(1): 39-44.

Viesca T. Medicina prehispánica de México. Panorama Editorial. 2001.1: 49-50.

Webster R., Bean W., Gorman O., Chambers J. and Kawaoka Y. Evolution and Ecology of Influenza A. *Microbiological Reviews*. 1992. 56(1): 45-47.

Zamora A., Percedo M., Abeledo M. y Noda J. Algunas pautas para establecer Una estrategia de vigilancia epidemiológica de La Influenza Aviar. *Revista de Salud Animal*. 2008. 30 (2): 69-77.

10.2 Protocolo para la RT – PCR en tiempo real

a) Materiales y equipo.

- Campana para PCR
- Micropipetas 1-1000 µl y puntas con filtro
- Termociclador Light Cyclser 480
- Gradilla fría para tubos de PCR
- Gradilla de 96 tubos
- Placa de 96 pozos y placa adhesiva Light Cyclser 480
- Mica adhesiva Light Cyclser 480
- Kit Ag Path-ID™ OneStep RT PCR 100 rx

b) Partidores y sondas para la RT-PCR en un paso

- Iniciador Inf+ Fw 5' AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG 3' (Escala de síntesis 50 nmol; Purificación: Desalados)
- Iniciador Inf- Rv 5' TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG 3' (Escala de síntesis 50 nmol; Purificación: Desalados)
- Sonda InA-M 5'- FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA –BHQ1- 3'(Escala de síntesis 1000nmol; Purificación: HPLC)

c) Muestras controles

- Control positivo: ARN del Virus influenza A.
- Control Negativo: Agua libre de nucleasas.

Procedimiento:

1. Colocar los reactivos contenidos en el Kit Ag Path-ID™ OnStep , en hielo.
2. Una vez descongelados se vortexean los reactivos.

3. Colocar las muestras de ARN problema en una gradilla sobre hielo en el orden deseado, facilitando la adición de las muestras en la placa de RT PCR.
4. Colocar la placa de RT-PCR en una platina congelada para mantenerla fría.
5. Preparar la mezcla de reacción en el orden designado en un vial estéril de 2ml. (Hacer cálculo previo para el número de reacciones requeridas (1rx por pozo de placa a utilizar)

En el siguiente cuadro se observa el volumen requerido por cada reactivo a utilizar del Kit Ag Path-ID™ OneStep para una Reacción.

Reactivos	µl
Agua libre de nucleasas	0.29
Buffer 2X	6.25
potencializador	0.835
25x Mezcla de enzimas RT-PCR	0.5
Primer de partida	0.25
Primer de reversa	0.25
Sonda	0.125

6. Vortexear y centrifugar a 20 seg.
7. Colocar 8.5 µl de la mezcla anterior en cada pozo.
8. Colocar los controles (+) y (-) en las últimas dos posiciones de la placa.
9. Una vez cargada toda la placa, deberían cubrirse los pozos con una mica adhesiva LightCycler 480.

10. Cubrir adicionalmente con papel aluminio, para posteriormente centrifugarse a 750 rpm durante 1 minuto.

11. Mantener la placa cubierta de aluminio sobre la platina fría, durante el transporte.

NOTA I: La placa debe cargarse en un sitio con la mínima luz que permita depositar los reactivos correctamente, esto para evitar la inactivación de algunos componentes de los reactivos.

NOTA II: En caso que no se corra la placa el mismo día debe ser almacenada una temperatura de -20°C hasta su uso y no más de 7 días. (Antes de ser usada debe de centrifugarse nuevamente).

(PANAFTOSA *et al.*, 2010; FAO, 2012)

10.3 NOTIFICACIÓN DE RESULTADOS A SENASICA-SAGARPA

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



ELR
inifap
Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal

Dirección

JAG.003.E.038

Asunto: Aislamientos de virus de influenza aviar
Marzo 6 de 2014

DR. PEDRO BRAJCICH GALLEGOS
DIRECTOR GENERAL DEL INIFAP
PRESENTE

Por este conducto hago de su conocimiento que un grupo de investigadores, encabezados por la Dra. Elizabeth Loza Rubio, lograron tres aislamientos de virus de influenza aviar caracterizados como pertenecientes al tipo H5N2 de baja patogenicidad. Dos de los aislamientos correspondieron a muestras de aves rapaces y el tercero a muestras procedentes de un mono araña.

Estas investigaciones se realizan dentro del proyecto "Estudio genómico de los virus de influenza porcina y aviar y sus posibles implicaciones en una salud" que se realiza en el CENID-Microbiología Animal y el estudio animal silvestre se llevó a cabo atendiendo la solicitud del ex director de Investigación de Vida Silvestre de la SEMARNAT, MVZ. Fernando Cortés, quien proporcionó las muestras a los investigadores de este Centro.

En los estudios realizados con las muestras se incluyeron pruebas serológicas, la técnica de PCR en tiempo real y el aislamiento en embriones de pollo. Los aislados virales fueron secuenciados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, lo que permitió confirmar que los tres corresponden al tipo H5N2 de baja patogenicidad. Considerando la importancia que representa la identificación de la presencia de este virus en animales silvestres, los investigadores responsables del proyecto tienen la intención de elaborar un artículo para su publicación en una revista científica; sin embargo, es necesario en primera instancia, que el INIFAP notifique a las autoridades de SENASICA los resultados que se mencionan en este documento y se determine la conveniencia o no de publicar esta información.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

A T E N T A M E N T E


DR. RICARDO FLORES CASTRO
DIRECTOR

c.c.p. - Dr. Salvador Fernández Rivera - Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación del INIFAP.
Carretera México-Toluca, Km. 15.5, Col. Palo Alto, Cuajimalpa, C.P. 05110, México, DF, Tel. 0155 3618 0803

En febrero de 2004, se detectó y registró un brote del virus HPAI (H5N2) en un grupo de 7,000 pollos en el centro-sur de Texas. Este fue el primer brote de HPAI en Estados Unidos en 20 años.^{1,2} No se registró ningún contagio del virus HPAI (H5N2) a humanos.