



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

“EVALUACION SEROLOGICA POR INHIBICION DE  
LA HEMOAGLUTINACION Y AISLAMIENTO VIRAL  
EN EMBRION DE POLLO DE LA INMUNIDAD  
CONFERIDA CONTRA INFLUENZA AVIAR DE BAJA  
PATOGENICIDAD EN POLLOS DE ENGORDA  
INMUNIZADOS CON UNA VACUNA VECTORIZADA  
(*POXVIRUS* – GEN H5 DE *ORTOMIXOVIRUS*)”

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

EDGAR LUJANO CHAVEZ

ASESOR: M. EN C. VICTOR MANUEL PETRONE  
GARCIA

CUAUTITLÁN IZCALLI. EDO. DE MÉXICO 2010



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.

## AGRADECIMIENTOS

### **A Dios**

Por darme a mi amada familia, novia, amigos y rodearme de tantas personas importantes en mi vida, además de proporcionarme la capacidad, interés, energía y voluntad para culminar éste objetivo.

### **A mi mamá**

Que con tanto sacrificio hizo posible que concluyera mi licenciatura, a pesar de todas las adversidades que surgieron a lo largo de nuestras vidas. A ti mamá te debo lo que soy y estoy infinitamente agradecido por entregar prácticamente tu vida a razón de mi bienestar. Te quiero mucho mamá, siempre serás mi modelo a seguir y mi heroína.

### **A mis hermanas**

Porque son un pilar muy importante en mi vida y fuente de inspiración. Las quiero mucho.

### **A mi novia**

Porque eres el motor que impulsa a mi corazón y a mi razón, para salir adelante en éste mundo tan complicado, pero hermoso. Te amo Adriana.

### **A José Ruíz**

Por estar con nosotros, brindarnos su apoyo y cariño.

### **A mi papá**

Por tu cariño y enseñanzas brindadas a lo largo de mi vida.

### **Al Dr. Víctor Petrone**

Por darme la oportunidad de participar en éste proyecto tan importante, es usted una persona admirable y de excelente corazón.

### **Al laboratorio Merial**

Porque a pesar de no conocerme, depositaron en mí su confianza y su apoyo incondicional. Han creado en mí nuevos horizontes e interés por un área con inmenso potencial. Un agradecimiento especial al Dr. Alejandro Rojas, por su apoyo laboral y su gran amistad.

### **Al CENASA**

Por el apoyo y conocimientos brindados, además de la calidez de su gente, que siempre me ayudó y orientó a fin de cumplir mis objetivos. Estoy muy agradecido especialmente con el Dr. Joaquín Delgadillo que depositó toda su confianza en mí, además de otorgarme tanta libertad y su apreciada amistad. También quiero agradecer al Dr. Wilfrido Pedroza, al Dr. Enrique Águila y al próximo Ingeniero Abraham García, queridos amigos, los cuales me apoyaron y trabajaron conmigo hombro con hombro.

### **A todos mis amigos**

No saben cuánto me divertí y aprendí con ustedes, siempre están en mi mente; y bien saben quiénes son.

### **A mis profesores**

Por los conocimientos tan valiosos, que tanto tiempo y esfuerzo les requirió aprender, para que forjaran en mí un profesionalista capaz y gran calidad. Especialmente a mi profesor y amigo, el Dr. Gabriel Ruíz, el cual es una persona honorable, que se preocupa por nuestra enseñanza y que al igual que otros profesores, deja huella en sus alumnos.

### **A la UNAM**

A mi amada universidad que me ha forjado. Siempre estaré agradecido.

Resumen.....	1
Introducción.....	3
• Influenza aviar.....	3
• Sinonimias.....	3
• Etiología.....	3
• Características fisicoquímicas.....	5
• Distribución.....	5
• Transmisión.....	5
• Patogenia.....	6
• Lesiones y signos.....	7
• Diagnóstico.....	7
• Control y profilaxis.....	9
• Tratamiento.....	10
• Salud pública.....	10
• Inmunología aviar.....	11
• Inmunización.....	13
Justificación.....	16
Objetivos.....	16
Materiales y métodos.....	17
Resultados.....	24
• Serología.....	24
• Aislamiento viral.....	25
Discusión.....	28
• Serología.....	28
• Aislamiento viral.....	29
Conclusiones.....	31
Referencias.....	32
Apéndices.....	36

## RESUMEN

El propósito de éste estudio fue evaluar la inmunidad conferida a los pollos vacunados con una vacuna vectorizada (VV) comercial (Trovac VA-IA.H5<sup>®</sup>, Merial México S.A. de C.V.) contra influenza aviar de baja patogenicidad (IABP) formada por un *Poxvirus* como vector y el gen H5 de un *Ortomixovirus*, en comparación con vacuna inactivada emulsionada (VI) de influenza aviar H5N2.

Se formaron 7 grupos de 7 pollos cada uno (A, B, C, D, E, F y G) con las siguientes características: testigo grupo A no vacunados; los grupos B y C con VV vía *in ovo* (18 días de incubación); grupos E y F con VV al día de nacido vía subcutánea (SC); grupos C, D y F con VI a los diez días vía SC; y grupo G o “centinela” sin vacunación. Se desafiaron los grupos a la edad de 35 días (Excepto el grupo G) con una cepa de IABP (SAGARPA), con un título de  $10^{6.0}$  dosis infectante en embrión de pollo. Se integró un pollo del grupo G, 24 horas posdesafío en cada grupo desafiado, para evaluar la diseminación viral. No se observaron signos clínicos ni lesiones en ninguno de los grupos experimentales.

Los resultados de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH) predesafío y posdesafío para detección de anticuerpos contra IABP fueron: promedio predesafío: A-0, B-0, C-0.009486607±0.006321669, D-0.00976563±0.02330147, E-0, F-0.020996094±0.028838923 y G-0; Resultados posdesafío: A-0.01432292±0.01433475, B-0.00669643±0.01121175, C-0.008370536±0.006925041, D-0.01123047±0.02087326, E-0.01283482±0.01366523 y F-0.004115513±0.005679316.

Prueba de aislamiento viral en embrión de pollo, con diluciones origen (sin diluir), 1/10, 1/50 y 1/100, para análisis de excreción viral, a partir de hisopos traqueales y cloacales tomadas las muestras a los 38 y 42 días de edad posdesafío. Los resultados del aislamiento viral positivos a 38 días de edad fueron: grupo A: 3 tráquea (T) – 4 cloaca (C), B: 5 T – 0 C, E: 0 T – 1 C y F: 1 T – 1 C. Resultados a los 42 días de edad: grupo A: 3 T – 1 C, B: 1 T – 0 C y F: 0 T – 1 C.

Se concluye que la VV proporcionó un título más bajo de anticuerpos en comparación con la VI ante el desafío, la VV aplicada in ovo no proporciona suficiente protección y permite la excreción viral, la VV aplicada vía SC puede ser empleada para protección contra influenza aviar de baja patogenicidad y que hubo cooperación inmunológica cuando se aplicaron las dos vacunas subcutáneas en combinación (VV e VI).

Palabras clave: Influenza aviar de baja patogenicidad, aislamiento viral en embrión de pollo, inhibición de la hemoaglutinación, vacuna vectorizada e inactivada.

## INTRODUCCIÓN

### Influenza aviar

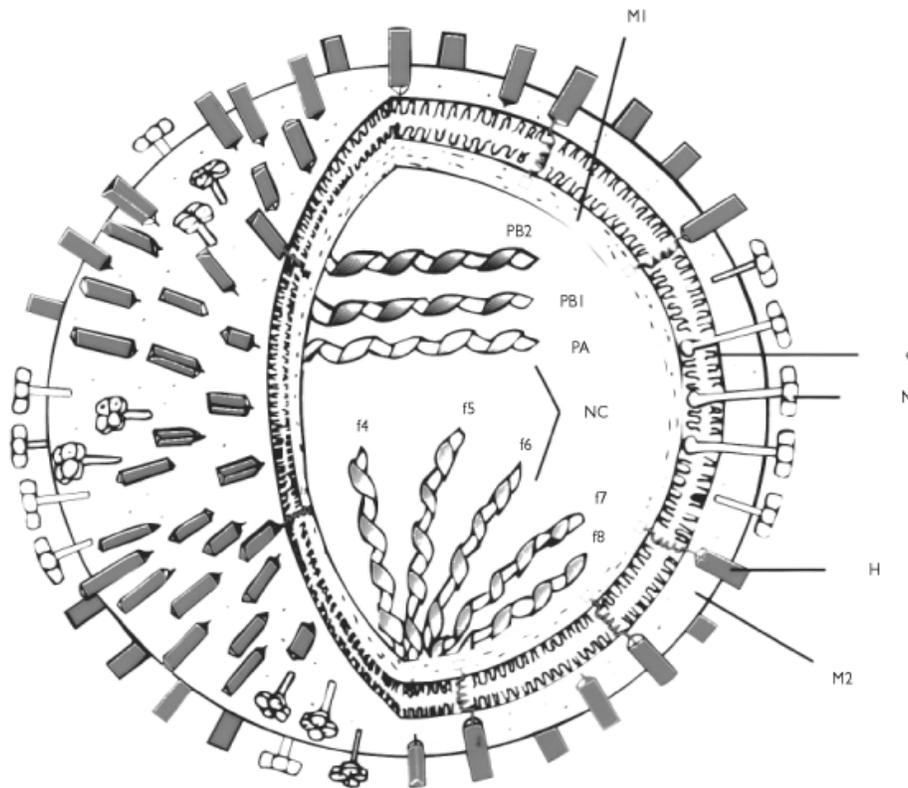
### Sinonimias

Gripe aviar, peste aviar, gripe del pollo, gripe de los pájaros.<sup>1,2</sup>

### Etiología

La influenza aviar (IA) es una enfermedad causada por un virus RNA, pertenece a la familia de los *Orthomyxoviridae*, el cual es segmentado (8 segmentos separados, lo que favorece la mutación), de sentido negativo, el virus mide de 80-120 nm de diámetro, esféricos o filamentosos, con una nucleocápside de simetría helicoidal cubierta con una envoltura que adquieren conforme géman de la membrana citoplasmática, Los determinantes antigénicos localizados en esta envoltura viral son responsables de las variantes en tipo y subtipo serológico, de la envoltura sobresalen peplómeros (picos de glicoproteínas) que son de dos clases: una es la hemaglutinina (H), que está directamente involucrada con la antigenicidad y la otra la neuraminidasa (N). La H y la N, son la base para la descripción e identificación serológica de los virus de la influenza. La H, es el antígeno protector por excelencia porque induce la aparición de anticuerpos neutralizantes que inhiben la unión del virus a la célula hospedadora y por lo tanto la infección, además, es responsable de la unión a los receptores de la célula hospedadora para su ingreso. La N ayuda a la salida del virus porque actúa sobre en ácido siálico celular destruyéndolo. Las dos glicoproteínas de la envoltura sufren variaciones antigénicas por mutaciones pequeñas en la H o N dentro de un mismo subtipo y por lo tanto su diversidad. La proteína "M" o de la matrix se encuentra asociada a la superficie interna de la envoltura, es importante para el ensamblaje del virus (figura 1). La destrucción del virus de la influenza aviar (VIA) es función de los linfocitos T, que son responsables de la respuesta inmune mediada por células en la inmunidad adaptativa.<sup>1-7</sup>

Figura 1: estructura del virus de influenza tipo A<sup>8</sup>



La familia contiene un género *influenzavirus*, que comprende 3 especies: virus de la influenza tipo “A”, cuyas cepas han sido recuperadas de aves, cerdos, equinos, caninos, humanos y los virus de la influenza tipo “B” y “C” que son exclusivamente del humano y no han sido aislados de animales bajo condiciones naturales. En el tipo “B” se han encontrado también variaciones antigénicas, pero no son tan marcadas y frecuentes como en el tipo “A”. El tipo “C” en cambio, es de características estables.<sup>1,2</sup>

Actualmente entre los virus de influenza tipo “A” se han descrito 16 antígenos de H y 9 de N. Los subtipos H5 y H7 incluyen la mayoría de las cepas patógenas actuales.<sup>8,9,10</sup>

El VIA se divide por su grado de patogenicidad en cepas de baja patogenicidad (IABP) y alta patogenicidad (IAAP), en México, a partir del 23 de Mayo de 1994 se notificó del aislamiento del virus de I.A. el cual fue tipificado como A/H5N2 de baja patogenicidad, pero se ha demostrado que los virus H5 y H7 de baja patogenicidad pueden mutar a alta patogenicidad.<sup>11</sup>

#### Características fisicoquímicas

Éste virus se inactiva a 60°C durante 30 minutos o 56°C durante 3 horas es sensible a la luz ultravioleta, pH ácido y básico, solventes orgánicos, detergentes, formalina, fenol, iodo y cloro.<sup>8,10</sup>

#### Distribución

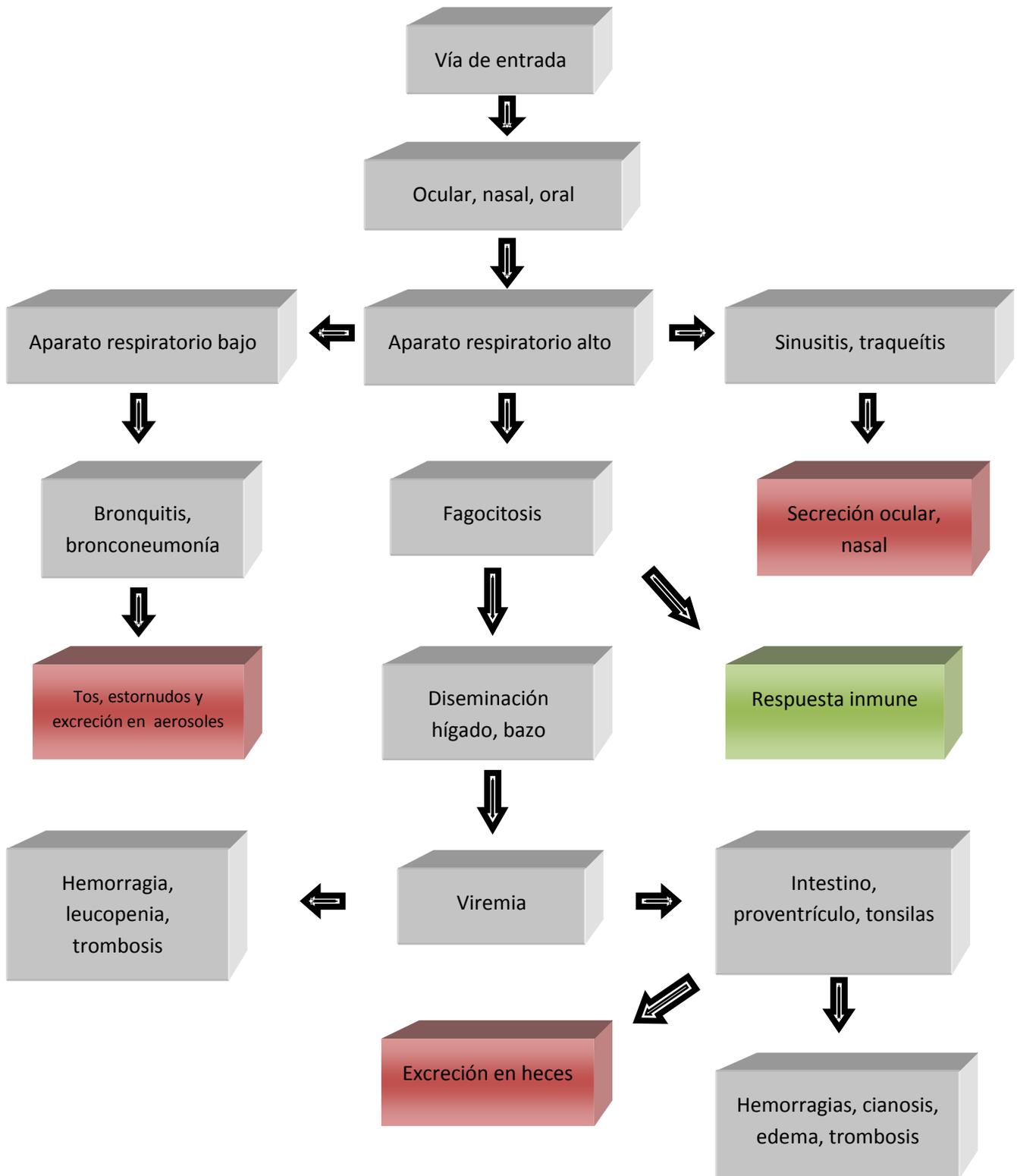
La influenza aviar se ha registrado en todo el mundo, pero las diferentes cepas pueden tener una mayor prevalencia en determinadas zonas. En diciembre de 1994 se presentó en México un brote de IAAP H5N2 el cual afectó gravemente a la avicultura comercial en dos estados del centro del país, mismo que fue erradicado en junio de 1995. Existe IABP principalmente en los estados del centro del país, los cuales se encuentran en fase de erradicación y las demás zonas están libres.<sup>11</sup>

#### Transmisión

Se transmite de forma horizontal por transferencia de secreciones respiratorias por medio de aerosoles generados al estornudar y toser, o de materia fecal, por el contacto directo con secreciones y fómites, lo que explica la contaminación del agua, además, por equipo y ropa contaminados. Puede sobrevivir en muestras fecales durante 6 días. Las aves silvestres pueden normalmente ser portadores del virus de la influenza aviar en el tracto respiratorio o intestinal, pero no suelen contraer la infección.<sup>5,7,10,12</sup>

El periodo de incubación generalmente varía entre 3 a 7 días dependiendo del aislamiento, especie aviar, edad, estado fisiológico, entre otros. La morbilidad es alta y la mortalidad es variable (depende de la cepa).<sup>6,8</sup>

Patogenia <sup>8</sup>



### Lesiones y signos clínicos

Las infecciones por IAAP, dan como resultado una depresión severa, plumas erizadas, inapetencia, polidipsia, baja o nula producción de huevo y diarrea acuosa. Las aves adultas frecuentemente presentan inflamación de crestas y barbillas, además de edema alrededor de los ojos. A menudo hay cianosis en la punta de la cresta - barbilla y pueden haber vesículas de plasma o sangre en su superficie con zonas oscuras de hemorragias equimóticas, focos de necrosis, también se encuentra congestión de la musculatura, deshidratación, secreciones oral - nasal, congestión renal severa, hemorragia y degeneración de los ovarios, hemorragias en mucosa del proventrículo, particularmente en la unión con el ventrículo y focos hemorrágicos en los tejidos linfoides de la mucosa intestinal (GALT). Los últimos huevos puestos después de iniciado un brote, son con frecuencia sin cascarón. La diarrea al principio es acuosa, de color verde brillante, modificándose a casi totalmente blanca. Puede haber hemorragias difusas en zonas amplias entre la pata y el tarso. Posible muerte súbita en pollos jóvenes y las lesiones pueden estar ausentes. Se logran observar también en ocasiones signos neurológicos como tortícolis y ataxia. Las aves mueren de 1 a 2 días, en el 90% de los casos y pueden prolongarse hasta una semana. En ocasiones algunas aves gravemente afectadas lograrán recuperarse. La IABP puede o no presentar signos clínicos y van de secreciones oral - nasal leves, baja de la producción de huevo y menor ganancia de peso.<sup>5,6,10</sup>

### Diagnóstico

Clínico: puede sospecharse de una infección por IAAP en cualquier parvada donde hay muertes súbitas (puede alcanzar hasta el 100%), seguida de una depresión severa, inapetencia, caída drástica de la producción de huevo, edema facial con crestas y barbillas tumefactas y cianóticas con hemorragias petequiales en las superficies membranosas internas.<sup>6,10,13</sup>

Las infecciones por virus de la IABP, pueden generar desde cuadros subclínicos e inaparentes, hasta diversos grados de complicaciones respiratorias, cuyos signos se exacerban con la presencia de infecciones simultáneas por otros agentes patógenos respiratorios secundarios.<sup>14</sup>

Diferencial: la signología clínica de IA puede ser fácilmente confundida con la enfermedad de Newcastle velogénico vicerotrópico, por los signos similares, aislamiento del virus y hemoaglutinación (HA) positivo, también puede confundirse con otras enfermedades como laringotraqueítis infecciosa, cólera aviar, micoplasmosis y clamidiasis.<sup>6,10,11</sup>

Laboratorio: Aislamiento viral: que es una prueba diagnóstica que consiste en la inoculación en embrión de pollo o cultivo de células. La técnica de inoculación en embrión de pollo es relativamente simple, aunque exige cuidado y práctica, proporcionan cantidades adecuadas de material de virus para experiencias serológicas e inoculaciones en animales de laboratorio, lo cual es necesario para aislar e identificar el virus de dicha enfermedad, obtenido de los órganos por medio de hisopos traqueales o cloacales, así como de órganos internos. Ésta técnica es de elección y rutina.<sup>10,13</sup>

La prueba serológica de Inhibición de la hemoaglutinación (IH), es la prueba de elección utilizada en México, consiste en la detección de niveles de anticuerpos específicos contra el VIA Subtipo H5 mediante la interacción de anticuerpos específicos con la hemaglutinina homóloga del VIA, evitando la aglutinación de los eritrocitos de pollo.<sup>2,6,14-16</sup>

También se utilizan las pruebas de fijación del complemento, seroneutralización, inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales, enzimoimmunoanálisis (ELISA) y la prueba de transcripción reversa de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).<sup>2,12,17</sup>

## Control y profilaxis

Evitar el contacto entre aves de corral y aves salvajes, en particular aves acuáticas, control en el tráfico humano, prevenir la introducción de aves cuyo estado de salud es desconocido a la explotación, utilizar métodos adecuados de limpieza y desinfección, no mezclar aves de diferentes edades en las naves, no criar pollos a campo abierto. Cuando existe un brote de IAAP en la explotación se recomienda; sacrificio de todas las aves, así como la eliminación de las canales, limpieza y desinfección adecuada y minuciosa, esperar al menos 21 días antes de la repoblación.<sup>6,10</sup>

La secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (SAGARPA) de acuerdo a la modificación a la NOM-044-ZOO-1995, será la encargada de autorizar la aplicación de la vacuna inactivada emulsionada y la vacuna recombinante viruela-influenza aviar, ambas del subtipo H5, únicamente en zonas de control y erradicación. Las parvadas o granjas que no sean vacunadas en zona de erradicación deberán ser constatadas. En zonas libres queda prohibida la vacunación.<sup>14,18</sup> (figura 2)

Figura 2: zonas libres y en erradicación en México<sup>8</sup>



## Tratamiento

No hay tratamiento en aves, sin embargo en humanos el hidrocloruro de amantadina ha sido aprobado desde 1966. Investigaciones indican que puede ser efectivo para aves administrándose en el agua de bebida pero no se ha utilizado en pruebas de campo. <sup>6,10</sup>

## Salud pública

Los VIA son del tipo "A", por lo que existe la posibilidad de que pudieran mutar, mediante una recombinación genética de nuevas cepas para mamíferos. <sup>6</sup>

La infección en humanos por el virus tipo A de influenza causa un proceso febril respiratorio cuya severidad varía dependiendo de factores, tanto del huésped como de la cepa particular de virus.

## Pandemias

La primera pandemia registrada fue en 1889 a 1890 en Rusia, se presume que la cepa fue H2N2 y se estima que el número de muertes fue de 1 millón aproximadamente.

A principios de marzo de 1918 hasta 1920, fue basada en la cepa H1N1, se estima que el número de muertes fue de 40 millones aproximadamente. Se conoce a menudo como la gripe española porque fueron los españoles los que se dedicaron en mayor medida a estudiar las causas de la enfermedad.

En 1957 la gripe asiática por la cepa H2N2, se estima aproximadamente 1 millón de muertes.

En 1968 la gripe de Hong Kong por la cepa H3N2 y se estiman aproximadamente 1 millón de muertes.

Desde 1997 se han registrado infecciones en seres humanos a partir de virus aviares de alta patogenicidad de los subtipos H5N1, H7N7 y H9N2<sup>9,12</sup>

## Inmunología aviar<sup>19</sup>

### Sistema linfoide aviar

Los órganos linfoides primarios o centrales son aquellos donde se forman células linfoides; consta de Timo y Bolsa de Fabricio. A su vez los órganos secundarios o periféricos son aquellos que sirven para la maduración o almacenamiento de células linfoides para su posterior acción, estos son glándula de Harder, bazo, tonsilas cecales, medula ósea y la región óculo nasal.

### Células del sistema inmunitario

Las células más abundantes e importantes del sistema inmunológico son los leucocitos. Éstas células se encuentran divididas en: fagocíticas, linfocitos y células cooperadoras.

Las fagocíticas son inespecíficas, se adhieren al microorganismo, lo ingieren y lo destruyen, también presentan antígenos a los linfocitos T (LT). Existen dos tipos de fagocitos: mononucleares (macrófagos, células de Kupffer, histiocitos y trombocitos; que son únicos de las aves) y polimorfonucleares (heterófilos y eosinófilos).

Los linfocitos son más complejos y específicos que las células fagocíticas. Son por completo responsables de la reacción específica en contra de los patógenos. Se dividen en inmunidad celular (LT cooperadores, citotóxicos y granulares) y humoral (linfocitos B).

Las células cooperadoras (granulocitos basofílicos, mastocitos y plaquetas) son aquellas que ayudan a las células inmunitarias ya mencionadas, en el desarrollo de una respuesta inmune. Todas ellas sintetizan mediadores solubles en forma de moléculas que producen inflamación alrededor de los tejidos infectados.

## Moléculas solubles en el sistema inmunitario

Los mediadores solubles, así como las células del sistema inmunitario, son muy similares en aves y mamíferos. Son proteínas o péptidos adheridos algunas veces a moléculas de azúcares (Glucopéptidos) sintetizados por células del sistema inmunológico. Estos mediadores incluyen anticuerpos, citocinas, complemento y una gran variedad de otras moléculas presentes en el suero. Su concentración se incrementa con rapidez durante una infección.

Los anticuerpos, también llamados inmunoglobulinas (Ig), son producidos por linfocitos B y pueden determinar entonces la forma soluble del receptor antigénico del linfocito B. En los mamíferos pueden encontrarse cinco isotipos conocidos como IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, mientras que en las aves solo existen tres isotipos. Estos son IgY, IgM e IgA. En la base de la fisicoquímica y características antigénicas, solo la IgM de las aves se asemeja a la IgM de los mamíferos. La función de la IgY de los pollos es similar a la IgG de los mamíferos, pero su estructura es más parecida a la IgA de los mamíferos. Más aún, la IgA en los pollos puede no estar relacionada con ninguna Ig de los mamíferos. Una nueva Ig fue detectada en los pollos, la cual parece ser homóloga de la IgD de los mamíferos.

**Citocinas:** son el término que se aplica a una gran variedad de moléculas (interferón, interleucinas, factor de necrosis tumoral) producidas por células del sistema inmunitario.

**Complemento:** se encuentra presente en el suero y forma un grupo cercano a 20 proteínas diferentes. Éstas interactúan entre sí y con otros elementos del sistema inmunitario. Un gran número de agentes infecciosos pueden activar el sistema del complemento de una manera inespecífica.

## Inmunización

El objetivo de la inmunización (vacunación) es proporcionar una inmunidad efectiva, al establecer niveles adecuados de anticuerpos (inmunización activa) y generar una población de células de memoria capaces de expandirse con rapidez ante un nuevo contacto con el antígeno del microorganismo patógeno y de éste modo proteger contra una infección natural. A veces se requiere de un título alto de antígeno vacunal para tal efecto y debe acercarse lo más posible al criterio de vacuna ideal (cuadro 1), aunque no existe ninguna actualmente que cumpla con todos los requerimientos.<sup>20,21</sup>

### Vacunas con virus inactivados

La inactivación del virus es la manera más sencilla de anular su capacidad para causar enfermedad, pero se debe mantener su constitución antigénica, asegurándose que los antígenos protectores no sean destruidos en el proceso de inactivación y provoque una inmunización incompleta, dejando al individuo susceptible para desarrollar complicaciones inmunopatológicas. Las vacunas inactivadas inducen exclusivamente una respuesta inmunitaria de tipo humoral y tienen una potencia inmunogénica menor que las vacunas preparadas con virus vivo atenuado.<sup>20</sup>

### Vacunas con virus vivos atenuados

El objetivo de la atenuación es producir un microorganismo modificado que imite el comportamiento natural del microorganismo original sin causar una enfermedad significativa, los virus pueden replicarse en el hospedador, aunque dentro de un límite, con ello aumenta la dosis de antígenos y se conservan durante más tiempo en el organismo. La recombinación genética se utiliza para desarrollar varias cepas de virus atenuados, como el virus de la IABP y algunas de mayor rapidez de multiplicación en embriones de pollo o en células de conejo. Las limitaciones en el uso de las vacunas atenuadas de virus vivos son que existe la posibilidad de que el ácido nucleico pueda incorporarse en el genoma del hospedador o que se revierta hacia una forma virulenta. Las vacunas de uso actual se producen en huevos embrionados de gallina, por lo tanto, se ha expresado gran interés en desarrollar vacunas en un sustrato distinto al de embrión de pollo.<sup>4,20,22</sup>

### Vacunas de DNA puro

El DNA de un patógeno es inyectado en un animal cuyas células siguen las instrucciones codificadas de este DNA, para producir antígenos del microorganismo que el sistema inmune del animal reconoce y monta una respuesta inmunitaria contra el microorganismo.

### Vacunas de DNA vectorizado

Están constituidas de anillos simples de DNA que contienen un gen codificador de un antígeno y un promotor/terminador, que actuaría como vector para expresar genes de otro virus diferente. De ésta forma, este nuevo virus recombinante, puede utilizarse como vacuna frente a ambos. La incorporación de tales genes “extraños” dentro de vectores virales recombinantes atenuados como el virus de la viruela aviaria, proporciona una poderosa estrategia de vacunación con muchos beneficios. Los genes pueden derivar de microorganismos de difícil crecimiento o de peligrosidad inherente y los productos construidos en sí mismos se caracterizan por una replicación deficiente porque no se integran; éstas son estables y relativamente fáciles de preparar. Otro vector potencial son los *baculovirus*.<sup>20,22-24</sup>

Cuadro 1: consideraciones de una vacuna óptima<sup>18</sup>

FACTOR	REQUERIMIENTOS
Eficacia	Deben producir niveles de inmunidad protectores, actuar en el sitio adecuado y de duración adecuada
Disponibilidad	Fácil de cultivar en grandes volúmenes o que la fuente de subunidades sea accesible
Estabilidad	Estable bajo condiciones climáticas extremas; preferentemente que no requiera refrigeración
Seguridad	Protección adecuada al ser desafiado.

La ley de epizootias y la orden de vacunaciones animales constituyen importantes elementos legales con influencia en sus actividades diarias. Las vacunas empleadas en medicina veterinaria no solo son regidas por normas legales nacionales, sino también disposiciones legales europeas. Se emiten textos de la farmacopea para autorizaciones y prohibiciones de vacunas y así mismo se basan en las normas de comprobación de la organización mundial de salud animal (O.I.E.) con sede en Paris. <sup>25</sup>

## JUSTIFICACIÓN

Debido a que el virus de IABP puede mutar a IAAP, es necesario evitar la transmisión entre las aves y de ésta manera la posible recombinación. Hasta la fecha no se ha elaborado ninguna investigación en México que evalúe la diseminación del virus de IABP en aves vacunadas, solo de IAAP, tampoco se ha evaluado el efecto de una vacuna vectorizada aplicada vía in ovo y subcutánea (SC) en comparación con una oleosa vía SC sobre la diseminación del virus de IABP.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Comparar la protección que confiere en pollos de engorda, la utilización de una vacuna vectorizada (in ovo y SC) versus una vacuna oleosa inactivada (SC), con diferentes programas de vacunación, después del desafío con una cepa del virus de IABP a los 35 días de edad.

### Objetivos específicos

Evaluar el título serológico utilizando la prueba de IH, predesafío y posdesafío con la cepa de IABP (32 y 42 días de edad), de aves vacunadas vía in ovo y SC con la vacuna vectorizada contra IA y la vacuna inactivada oleosa vía SC.

Evaluar la diseminación del virus de desafío de IABP, a través de aislamiento viral en embrión de pollo, a partir de muestras traqueales y cloacales de pollos de engorda desafiados a los 35 días de edad, de pollos vacunados in ovo y SC con la vacuna vectorizada contra IA y la vacuna inactivada oleosa vía SC.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aves para investigación

- 48 embriones y pollos (divididos en grupos: A, B, C, D, E, F y G), provenientes de un lote de reproductoras de la línea comercial Cobb, los cuales son pollos de engorda de alto rendimiento.<sup>26,27</sup> (cuadro 2)
- 4000 embriones de 9 a 11 días de incubación libres de patógenos específicos.

### Instalaciones

- Incubadora automatizada (37°C y humedad relativa durante 21 días) y unidades de aislamiento nivel I. Laboratorio ubicado en el municipio El Marqués en el estado de Querétaro (Incubación y vacunación *in ovo*).
- Unidad de crianza en zona de cuarentena (ventilación natural a través de una ventana con malla y puerta de acceso, alimento racionado, agua *ad libitum*, calefacción eléctrica y jaulas separadas por grupo) y unidades de aislamiento nivel III por grupo. Laboratorio de SAGARPA-CENASA, ubicado en el municipio de Tecámac estado de México (crianza, desafío y pruebas de laboratorio).

### Inmunógenos y cepa de desafío

- Vacuna oleosa inactivada (VI) de IA H5/N2, (laboratorio **IASA** – Tehuacán Puebla) cepa Ch/CPA/238/94/H5N2.
- Vacuna comercial vectorizada (VV) viruela – influenza (**Trovac VA-IA.H5<sup>®</sup>**, **Merial México S.A. de C.V.** – El Marqués Querétaro), con un título de  $3.4^{10}$  dosis infectante en cultivo de tejidos (DICT<sub>50</sub>) cepa A/Turkey-Ireland/1378/83 H5N8.
- Cepa de influenza aviar de baja patogenicidad (**SAGARPA-CENASA** – Tecámac Estado de México), 0.2ml vía instilación nasal a una concentración de  $10^6$  dosis infectante en embrión de pollo (DIEP<sub>50</sub>) A/Chicken/México/232/94/CPA H5N2

## Vacunación

- *In ovo* a los 18 días de incubación con la VV a los grupos B y C. Dosis de 0.2ml, vía saco amniótico (cuadro 2).
- Al día de edad (nacidos) se aplicó la VV a los pollos correspondientes a los grupos E y F. 0.2ml vía subcutánea (cuadro 2).
- A los diez días de edad se aplicó la VI a los grupos C, D y F. 0.3ml vía subcutánea (cuadro 2).

## Desafío

- A los 35 días de edad se desafiaron con una cepa de influenza aviar de baja patogenicidad, 0.2 ml vía instilación nasal (cuadro 2).
- Un pollo del grupo G o “Centinela” (no desafiado), se incorporó a las 24 horas posdesafío (36 días de edad), a cada uno de los grupos desafiados (cuadro 2).

Cuadro 2: diseño de tratamiento, grupos, edad y vías de aplicación.

<b>Grupo</b>	<b>No. Aves desafío  35 días de edad</b>	<b>Vacunación y vías de aplicación  (Edad)</b>	<b>No. aves pos-desafío  36 días de edad</b>
<b>“A” “Testigo”</b>	7	Aplicación del diluyente de vacuna inocuo y estéril vía <i>in ovo</i> (18 días de desarrollo embrionario).	8
<b>“B”</b>	7	<i>In ovo</i> : VV de IA.	8
<b>“C”</b>	7	Aplicación de VV <i>In ovo</i> , más aplicación de VI a los 10 días de nacido vía SC	8
<b>“D”</b>	7	VI de IA a los 10 días de nacidos vía SC	8
<b>“E”</b>	7	Aplicación al día de edad de VV de IA vía SC	8
<b>“F”</b>	7	Aplicación de VV al día de edad vía SC, más VI a los 10 días de nacido vía SC	8
<b>“G” * “centinelas”</b>	6  No desafiados	Pollos sin vacuna ni desafío. Se integró un pollo de éste grupo a cada uno de los grupos desafiados (A, B, C, D, E y F) 24 horas posdesafío para evaluar la diseminación viral.	0

\*A este grupo se le tomaron muestras de suero sanguíneo predesafío incluyéndolo como grupo, pero 24 horas posdesafío se incluyó un pollo (de éste grupo) a cada grupo desafiado, por lo tanto, desaparece como grupo posdesafío y solo quedaron 6 grupos al final.

### Diseño de grupos

Los embriones de los grupos B y C se vacunaron a los 18 días de incubación con la VV en Querétaro. A los 10 días de edad (nacidos) los pollos se trasladaron al Estado de México, se dividieron en 7 grupos de 7 pollos cada uno, excepto el grupo centinela (cuadro 2). Se aplicó la VI a los grupos C, D y F. Se acondicionó con calefacción eléctrica, comederos y bebederos. Aseo diario, se proporcionó alimento comercial (anexo 1 pag 36) y agua *ad libitum*. Se mantuvieron en esta área hasta los 34 días de edad y después se trasladaron a las unidades de aislamiento tipo III, de acuerdo al diseño de toma de muestras y análisis de laboratorio (cuadro 3).

Cuadro 3: toma de muestras, análisis de laboratorio y desafío con cepa de IABP.

<b>Edad (días)</b>	<b>Muestra</b>	<b>Análisis de laboratorio</b>
<b>32</b>	Suero sanguíneo.	IH.
<b>35</b>	Desafío con cepa de IABP a los grupos "A, B, C, D, E y F".	
<b>36</b>	Se agregará un pollo del grupo "G" a cada uno de los grupos desafiados.	
<b>38</b>	Hisopos traqueales (HT) y cloacales (HC).	Aislamiento viral en embrión de pollo (AVEP).
<b>42</b>	HT, HC, suero sanguíneo.	AVEP e IH

### Signos clínicos

Se observaron diariamente a las aves, para detectar signos clínicos respiratorios como: cabeceo, lagrimeo, secreción nasal, disnea, así como otros obvios. La forma de medición de los signos fue solo cualitativa y no se indagaron signos subclínicos.

### Toma de muestras

38 días de edad (Tercer día posdesafío)

Se tomaron las primeras muestras con hisopos (comerciales), de tráquea y cloaca colocadas en tubos de ensaye independientes, debidamente identificadas y en 5ml de una solución de PBS (Solución salina amortiguada con fosfatos) adicionado con antibióticos (penicilina-estreptomicina), después se mandaron al laboratorio de virología en el área de aves para su identificación interna, proceso de muestras para aislamiento viral en embrión de pollo (AVEP) y conservación (anexo 2 pag 36).

42 días de edad (Séptimo día posdesafío)

Se realizó la segunda toma de muestras, traqueales, cloacales, sangre para prueba de HI (posdesafío) y sacrificio de los pollos. Las muestras se mandaron al laboratorio de virología (anexo 3 pag 37).

### Análisis serológico

Las muestras sanguíneas para prueba de **IH** se procesaron según el procedimiento descrito en el manual de la OIE y la modificación a la NOM-044-ZOO-1995. <sup>10,14</sup> (anexo 4 pag 38)

### Aislamiento viral en embrión de pollo

Se usaron embriones de 9 a 11 días de edad, de ALPES<sup>®</sup> (aves libres de patógenos específicos). Las muestras obtenidas a través de los hisopos se nombraron "origen" (sin dilución) y a partir de éstas se realizaron diluciones 1/10, 1/50 y 1/100, las cuales también se procesaron (cuadro 4). Se utilizaron 420 embriones semanales (cuadro 5) y se procesaron las muestras con base en la metodología de prueba de AVEP usada en SAGARPA y la OIE. <sup>10,14</sup> (anexo 4 pag 38)

Cuadro 4: diluciones

Dilución	Cantidades requeridas
Sin diluir	Origen
1/10	2.7ml de PBS + 0.3ml de Origen
1/50	2ml de PBS + 0.5ml de dilución 1/10
1/100	2.7ml de PBS + 0.3ml de dilución 1/10

Cuadro 5: muestras y embriones semanales para AVEP

Muestra/Dilución	# de embriones	# de muestras	total
Origen	5	20	100
1/10	5	20	100
1/50	5	20	100
1/100	5	20	100
Control positivo	5	1	5
Control negativo	5	1	5
Total			410

NOTA: las muestras se procesaron dentro de un periodo de 10 semanas.

#### Hemoaglutinación en placa e identificación viral

Se realizó la prueba de HA a partir de líquido alantoideo de los embriones inoculados con los diferentes grupos de pollos desafiados y se realizó la identificación viral en aquellos que resultaron positivos a HA. Las pruebas se realizaron de acuerdo a la metodología de SAGARPA y la OIE.<sup>10,14</sup> (anexo 4 pag38)

### Análisis estadístico

Los títulos de anticuerpos expresados en las diluciones realizadas de la prueba de IH predesafío y posdesafío, fueron analizados a partir de una corrección de datos, aplicando el factor de dilución para obtener su desviación estándar al igual que el error estándar y así comparar los resultados entre las muestras a partir de un análisis de varianza (ANDEVA) y proseguir con la prueba de Tukey con un nivel de significancia estadística de  $P < 0.05$ .

Las muestras positivas al aislamiento viral se expresaron en porcentaje y se aplicó la prueba de  $X^2$  (ji cuadrada) de bondad de ajuste, con una significancia estadística de  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS

Signos clínicos: no se detectaron en ningún día

### Serología

En las muestras tomadas antes del desafío, se observa para el caso del grupo F que se encontraron títulos de anticuerpos más altos por IH, que el resto de los grupos. Los grupos C y D mostraron títulos de anticuerpos más altos que los grupos A, B, E y G (cuadro 6).

En las muestras tomadas al séptimo día posdesafío, el grupo F tuvo títulos más altos por IH. Los grupos C y D tuvieron títulos más altos de anticuerpos que los grupos A, B y E (cuadro 6).

Cuadro 6: medias del factor de dilución y desviaciones estándar de los títulos predesafío y al séptimo día posdesafío de la prueba de IH

Grupo	Media $\pm$ desviación estándar (predesafío)	Media $\pm$ desviación estándar (posdesafío)
A	$0 \pm 0^a$	$0.01432292 \pm 0.01433475^a$
B	$0 \pm 0^a$	$0.00669643 \pm 0.01121175^a$
C	$0.009486607 \pm 0.006321669^b$	$0.008370536 \pm 0.006925041^b$
D	$0.00976563 \pm 0.02330147^b$	$0.01123047 \pm 0.02087326^b$
E	$0 \pm 0^a$	$0.01283482 \pm 0.01366523^a$
F	$0.020996094 \pm 0.028838923^c$	$0.004115513 \pm 0.005679316^c$
G	$0 \pm 0^a$	No hay grupo "G"

Literal ascendente en superíndice, indica diferencia estadísticamente significativa entre grupos, partiendo de "a". Nota: resultados de IH completos ver anexo 5 (pag. 40)

### Aislamiento viral

En las muestras de hisopos traqueales tomadas al tercer día posdesafío, en los grupos A y B fue posible obtener más aislamientos positivos ( $P > 0.05$ ), que el grupo F (Cuadro 7).

En el grupo F se logró un aislamiento de ocho muestras, lo cual no es una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ), que los grupos C, D y E (Cuadro 7).

Resultados del primer muestreo con hisopos traqueales y cloacales (tercer día posdesafío) de AVEP, HA e Identificación viral (Anexo 6 pag 40).

Cuadro 7: aislamientos positivos / total de muestras y porcentaje de muestras traqueales al tercer día posdesafío.

Grupo	# de positivos	Porcentaje
<b>A</b> (testigo)	3/8	37.5% <sup>b</sup>
<b>B</b> (VV in ovo)	5/8	62.5% <sup>b</sup>
<b>C</b> (VV in ovo + VI a los 10 días)	0/8	0%
<b>D</b> (VI)	0/8	0%
<b>E</b> (VV al día de edad)	0/8	0%
<b>F</b> (VV + VI)	1/8	12.5% <sup>a</sup>

NOTA: a = no hay significancia estadística. b= existe significancia estadística. Nivel de significancia  $P < 0.05$ .

En las muestras de hisopos cloacales tomadas al tercer día posdesafío, en el grupo A se obtuvieron más aislamientos ( $P > 0.05$ ), que en los grupos E y F (cuadro 8).

En los grupos E y F se obtuvo un aislamiento, lo que no es una diferencia estadística ( $P < 0.05$ ), que en los grupos B, C y D (cuadro 8).

Cuadro 8: aislamientos positivos / total de muestras y porcentaje de muestras cloacales al tercer día posdesafío.

Grupo	# de positivos	Porcentaje
<b>A</b> (testigo)	4/8	50% <sup>b</sup>
<b>B</b> (VV in ovo)	0/8	0%
<b>C</b> (VV in ovo + VI a los 10 días)	0/8	0%
<b>D</b> (VI)	0/8	0%
<b>E</b> (VV al día de edad)	1/8	12.5% <sup>a</sup>
<b>F</b> (VV + VI)	1/8	12.5% <sup>a</sup>

NOTA: a= no hay significancia estadística. b= existe significancia estadística. Nivel de significancia  $P < 0.05$ .

NOTA: en ésta toma de muestras murieron: 2 pollos del grupo “A”, 1 del grupo “B”, 1 del grupo “C”, 1 de grupo “E” y uno del grupo “F”, todos por asfixia provocada por el traumatismo de la tráquea al momento de la toma.

En las muestras de hisopos traqueales tomadas al séptimo día posdesafío, en el grupo A se obtuvieron más aislamientos ( $P > 0.05$ ), que en el grupo B (cuadro 9).

En el grupo B se obtuvo un solo aislamiento, lo que no es una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ), que en los grupos C, D, E y F (Cuadro 9).

Resultados correspondientes al segundo muestreo (42 días de edad): aislamiento, HA e identificación viral

Cuadro 9: aislamientos positivos / total de muestras y porcentaje de muestras traqueales al séptimo día posdesafío.

Grupo	# de positivos	Porcentaje
<b>A</b> (testigo)	3/6	50% <sup>b</sup>
<b>B</b> (VV in ovo)	1/7	14.2% <sup>a</sup>
<b>C</b> (VV in ovo + VI a los 10 días)	0/7	0%
<b>D</b> (VI)	0/8	0%
<b>E</b> (VV al día de edad)	0/7	0%
<b>F</b> (VV + VI)	0/7	0%

NOTA: a= no hay significancia estadística. b= existe significancia estadística. Nivel de significancia  $P < 0.05$ .

En las muestras de hisopos cloacales tomadas al séptimo día posdesafío, en los grupos A y F se obtuvo un aislamiento, lo cual no es una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ), que en los grupos B, C, D y E (cuadro 10).

Cuadro 10: aislamientos positivos / total de muestras y porcentaje de muestras cloacales al séptimo día posdesafío.

Grupo	# de positivos	Porcentaje
<b>A</b> (testigo)	1/6	16.6% <sup>a</sup>
<b>B</b> (VV in ovo)	0/7	0%
<b>C</b> (VV in ovo + VI a los 10 días)	0/7	0%
<b>D</b> (VI)	0/8	0%
<b>E</b> (VV al día de edad)	0/7	0%
<b>F</b> (VV + VI)	1/7	14.2% <sup>a</sup>

NOTA: a= no hay significancia estadística. b= existe significancia estadística. Nivel de significancia  $P < 0.05$ .

## DISCUSIÓN

### Signos clínicos

En esta investigación no se encontraron signos clínicos en ninguno de los grupos experimentales, lo cual concuerda como lo reportaron Nishiguchi *et al.* (2009)<sup>28</sup>, el cual menciona que con cepas de IABP de campo o inoculadas de forma experimental puede no haber signos clínicos o éstos sean muy leves.

### Serología

En esta investigación se encontró como lo reportaron Loza *et al.* (1997)<sup>29</sup>, en el cual obtuvieron como media 1:320, de los títulos de anticuerpos de IH contra el virus de IABP a partir de una vacuna inactivada emulsionada, para lo cual es similar a nuestra media de los títulos de anticuerpos que resultaron de IH de la vacuna inactivada que usamos.

La vacuna vectorizada no produjo anticuerpos antes del desafío, ni vía in ovo ni subcutánea, a esto existe una diferencia de como lo reportaron Rodríguez *et al.* (1996)<sup>30</sup>, el cual menciona que no produce anticuerpos en los primeros días de edad de los pollos y un limitado número de aves dieron una reacción positiva a partir del día 21 posvacunación.

Ya que la vacuna vectorizada no produjo anticuerpos predesafío y un bajo porcentaje de seroconversión al séptimo día posdesafío, se concuerda como lo reportaron Rodríguez *et al.* (1996)<sup>30</sup>, que por serología se pueden diferenciar pollos vacunados de pollos infectados experimentalmente.

Los resultados de IH demostraron que la aplicación de la vacuna vectorizada seguida de la vacuna inactivada producen mayor título de anticuerpos posdesafío, esto se debe posiblemente, a que la vacuna vectorizada produce una mayor cooperación inmunológica, que se caracteriza por una mayor producción de linfocitos T, que a su vez sensibilizan a los linfocitos B específicos, que se activan para producir IgY como una respuesta más rápida al contacto con el antígeno expresado en el virus de la vacuna inactivada, de manera muy similar a como lo hace una vacuna elaborada con virus activo<sup>30</sup>.

## DISCUSIÓN

La vacuna vectorizada en combinación con la inactivada vía SC, produjo más anticuerpos posdesafío, que la vectorizada aplicada vía in ovo más la vacuna inactivada. Esta mayor cooperación probablemente se deba a que el pollo neonato presenta mayor cantidad de linfocitos T y con mayor madurez, que el embrión de pollo a los 18 días de incubación, a los cuales se les vacuna por esta vía principalmente por el aspecto del manejo y porque la IABP no es una enfermedad que provoque alta mortalidad, así como una baja de producción drástica.

### Aislamiento viral

Se aislaron los virus de desafío de IABP a partir de hisopos traqueales de los grupos A, B y F al tercer día posdesafío y de los grupos A y B al séptimo día, lo cual concuerda como lo reportaron Rodríguez *et al.* (1996)<sup>30</sup>; mencionan que es más factible aislar los virus en los primeros días posdesafío de tráquea; aunque no concuerda con que se aíslan mejor los virus a partir de hisopos cloacales en los días siguientes. Se aislaron los virus de desafío de IABP a partir de hisopos cloacales de los grupos A, E y F al tercer día posdesafío y de los grupos A y F al séptimo día.

El aislamiento viral en el grupo A indica la eficiencia de la cepa de desafío y su excreción viral de IABP. El grupo B, a pesar de aumentar su título de anticuerpos posdesafío, permitió la diseminación viral en las muestras traqueales. En los grupos E y F se reaisló el virus de desafío, aunque no significativamente para fines estadísticos.

Dados los resultados de IH y aislamiento viral se concuerda como lo reportaron Rico *et al.* (1996)<sup>31</sup>, el cual menciona que no siempre se relacionan la seroconversión y niveles de anticuerpos con el grado de protección al desafío, ya que, aunque hubo seroconversión en el grupo B, no se evitó de manera aceptable la excreción viral de IABP y aunque la seroconversión del grupo E fue muy baja, el reaislamiento del virus fue de mínimo a nulo.

## DISCUSIÓN

Se recomienda realizar pruebas de inmunidad celular como la prueba de proliferación de linfocitos, a éste tipo de vacunas vectorizadas, ya que inducen una respuesta celular más que una humoral, como lo hace la vacuna inactivada. No obstante, para fines de constatación se utilizan las técnicas descritas en ésta tesis.

## CONCLUSIONES

Todos los pollos con vacuna vectorizada sola (grupos B y E), no tuvieron títulos de anticuerpos predesafío, por lo tanto, por serología se pueden diferenciar pollos vacunados de pollos infectados experimentalmente.

La vacunación in ovo resultó ser una vía de inmunización deficiente; ya que al desafío produjo un título muy bajo de anticuerpos contra IABP, menor protección ante el desafío con cepa de IABP y permitió la excreción viral de la misma.

La vacuna vectorizada SC, a pesar de inducir un título bajo de anticuerpos posdesafío, se observó que protege ante el desafío con IABP y disminuye la excreción viral de IABP, posiblemente a una reacción de inmunidad celular.

La combinación de la vacuna vectorizada con la vacuna oleosa mostró un aumento considerable en el título de anticuerpos posdesafío, posiblemente a una sensibilización a la proteína H5, la cual al estar expresada en la vacuna inactivada produjo el incremento de los anticuerpos como sucede en la aplicación de un refuerzo vacunal.

La vacuna vectorizada en combinación con la inactivada vía SC, produjo más anticuerpos posdesafío, que la vectorizada aplicada vía in ovo más la vacuna inactivada; esto posiblemente se deba a que la vacuna vectorizada vía SC también produjo mayor cooperación inmunológica que la aplicada in ovo.

## Anexo 4

### Prueba de inhibición de la hemoaglutinación

En una microplaca fondo en "U" o "V" se colocan 25µl de PBS en cada uno de los 96 pozos.

Se transfieren 25 µl de la dilución 1:5 de cada muestra a analizar a la columna 1 de la microplaca. Todos los sueros se trabajaran en orden secuencial. Los sueros control positivo y control negativo se procesan de la misma manera.

Se realizan diluciones dobles seriadas transfiriendo 25 µl de la columna 1 hasta a la columna 3 para obtener las diluciones 1:10, 1:20 y 1:40.

Posteriormente se agregan 25 µl de antígeno de Influenza Aviar conteniendo 4 unidades hemoaglutinantes a cada pozo,

Se realizará una segunda titulación del antígeno a partir de la suspensión de antígeno que se empleo en la prueba, para confirmar que contiene las 4 UH requeridas (control de antígeno)

Tapar la microplaca y agitar por unos segundos, e incubar a temperatura ambiente por lo menos 30 minutos.

Se adiciona 50 µl de una suspensión de glóbulos rojos al 0.5%, se agita nuevamente y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se realiza la lectura cuando el control de glóbulos rojos haya formado un botón bien delimitado en el fondo del pozo.

### Interpretación de resultados

Para validar esta prueba el control de antígeno debe presentar las 4 UH, el control de suero negativo no debe presentar un título de inhibición de la hemoaglutinación mayor a 1:4 y el suero control positivo presentará un título con una diferencia no mayor a una dilución del título previamente establecido.

Los títulos de los sueros se determinarán tomando como referencia la dilución más alta del suero donde se observe al 100% de inhibición hemoaglutinante.

Se considerará como positivo todos aquellos sueros que muestren una inhibición franca en la dilución 1:10.

### Aislamiento viral en embrión de pollo

Se revisan los embriones para certificar su viabilidad y se identificará el área de inoculación la cual estará localizada en el extremo opuesto al embrión, con menos irrigación sanguínea y aproximadamente 3 mm arriba de la cámara de aire. Se utilizan 5 embriones por cada inóculo los cuales son marcados con la identificación correspondiente. Se desinfectan los cascarones con alcohol al 70% y se realiza una perforación en el área identificada para la inoculación.

Cada embrión será inoculado con 0.2 ml vía cavidad alantoidea utilizando jeringas insulínicas. Un grupo de 5 embriones se inoculan, para mantenerlos como testigos positivos y un segundo grupo de 5 embriones se inocularán con PBS identificándolos como testigos negativos.

Todos los embriones inoculados se incuban a 37°C durante 4-7 días

Los embriones se revisarán diariamente registrando la mortalidad embrionaria.

Todos los embriones que mueran antes del 4-7° día del periodo de incubación deben mantenerse a 4°C para posteriormente realizar la prueba de Hemoaglutinación en placa.

Los embriones que permanezcan vivos del 4-7° día se les realizará la eutanasia por enfriamiento, para posteriormente realizar la prueba de Hemoaglutinación en placa.

Prueba de HA

Con una micropipeta o jeringa extraer 50 µl de fluido alantoideo de cada embrión y colocarlo en una placa de vidrio o caja petri.

En cada placa de vidrio o caja de petri adicionar 50 µl de un fluido testigo positivo.

Agregar a cada muestra de fluido alantoideo 50 µl de glóbulos rojos de ave al 5% y homogenizar realizando movimientos de rotación durante 1-2 minutos.

Se deberá dejar una muestra control de glóbulos rojos por cada placa de vidrio o caja de petri.

Realizar lectura utilizando el aglutinoscopio.

Si no se presenta la hemoaglutinación el resultado de la prueba se considera negativo al aislamiento viral.

Si se presenta aglutinación, la prueba se considera sospechosa y se realiza la confirmación realizando la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación en placa para la identificación viral.

En una placa de vidrio o caja Petri se colocarán por separado, 3 gotas de líquido alantoideo sospechoso al VIA.

Se agregará a la primera gota de líquido alantoideo, un volumen igual de suero positivo monoespecífico contra el VIA.

A la segunda gota se le añade un volumen igual de suero positivo monoespecífico contra el virus de la Enfermedad de Newcastle.

A la tercera gota se añade un volumen igual de PBS. Homogenizar, realizando movimientos de rotación durante 1-2 minutos, para permitir la reacción antígeno - anticuerpo durante 3-5 minutos.

Posteriormente añadir una gota de suspensión de glóbulos rojos al 0.5% y se procede a homogenizar durante 1-2 minutos.

Se realiza la lectura utilizando un microscopio óptico.

Si el fluido alantoideo es positivo a la presencia del virus de la Influenza Aviar, en la primera gota, no debe existir aglutinación de eritrocitos, esto significa que los anticuerpos presentes en el antisuero monoespecífico, bloquearon la actividad hemoaglutinante del VIA, confirmando la presencia de este.

## REFERENCIAS

- 1.- Fenner F, White DO. Virología médica. Ediciones científicas – La prensa médica Mexicana S.A., 2ª ed. 1981:14,16,22,23
- 2.- Acha PN, Szyfres B. zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales, publicación científica No. 503, 1986, organización panamericana de la salud, OMS. 332-333
- 3.- Ferreira A, Afani A, Lanza P, Aguillón JC, Sepúlveda C. Inmunología básica y clínica. Santiago – Buenos Aires: Mediterráneo, 2005: 214-218
- 4.- Fellenberg RV. Compendio de inmunología general. España: Acribia. 1978: 24-26
- 5.- Desachy F. las zoonosis. Barcelona: De Vecchi S.A.V. 2006:65-66.
- 6.- Comisión México-Americana para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas. Enfermedades exóticas de los animales. México (DF): CPA, 1986:242-249
- 7.- Restrepo A, Robledo J, Bedoya V, Restrepo M, Botero D, Leiderman E *et al.* Fundamentos de medicina enfermedades infecciosas. 5ª ed. Medellín Colombia: Corporación para investigaciones biológicas, 1996:651-653
- 8.- Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal. Capacitación y actualización en el diagnóstico de las enfermedades de Newcastle e Influenza aviar por técnicas moleculares. Memorias curso-taller. 2009 Julio 29-31. Tecámac (Estado de México) México. Estado de México: CENASA 2009.
- 9.- Siegel M. gripe aviar, Barcelona-España: Amat, 2006:17-19
- 10.- World organisation for animal health (homepage on the internet) Paris: Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (actualizado en mayo 2005) OIE lista "A", gripe aviar (citado 2009 agosto 6). Disponible en:  
[http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es/2.1.14\\_Gripe\\_aviar\\_2007.pdf](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.1.14_Gripe_aviar_2007.pdf)

11.- DIARIO OFICIAL. SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN. Martes 26 Agosto del 2003 (Primera sección). PROYECTO de modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995 Campaña Nacional contra la Influenza Aviar y apéndices normativos A, B, C, D, E, F, G, H, J, K, L, M, y N.

12.- Ortín J. La gripe aviar ¿una nueva amenaza pandémica? Madrid: Consejo superior de investigaciones científicas. 2007: 13-19

13.- SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y DESARROLLO RURAL. NORMA Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995 Campaña Nacional contra la Influenza Aviar.

14.- SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACION. MODIFICACION a la Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar.

15.- SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACION. NORMA OFICIAL MEXICANA DE EMERGENCIA NOM-EM-016-ZOO-2002 CAMPAÑA NACIONAL CONTRA LA INFLUENZA AVIAR.

16.- Carpenter PL. Inmunología y serología. Fournier. 1963: 277-281

17.- Loza RE, Esquivel GF, Mercado SJ, Gutiérrez XL, Banda RVM, Verdugo RA. Expresión de ARNm de la IL-2 en bazos de pollos vacunados contra el virus de la influenza aviar. Técnica Pecuaria México 2003; 41:141-143

18.- SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y DESARROLLO RURAL. NORMA Oficial Mexicana NOM-055-ZOO-1995 Requisitos mínimos para la elaboración de vacunas empleadas en la prevención, control y erradicación de la Influenza Aviar.

19.- Montañó HJA. Temas selectos de inmunología veterinaria. México: Manual moderno S.A de C. V. 2005: 27-30

20.- Roitt IM, Delves PJ. Inmunología fundamentos. Buenos Aires – Argentina: Médica panamericana. 2003: 323-331

- 21.- Bellanti JD. Inmunología II. Segunda edición. México: Interamericana S.A. de C.V. 1981: 590-593
- 22.- De Quadros CA. Vacunas: Prevención de enfermedades y protección de la salud. Publicación científica No. 596. Organización Panamericana de la Salud. Washington DC: OPS: 175-179 y 269-272
- 23.- Sistema Nacional de Investigación y Transferencia Tecnológica (homepage on the Internet) México D.F. CENID Microbiología. INIFAP-SAGAR. Laboratorio de Influenza Aviar. (Citado: 2008 Junio 13) Disponible en: <http://www.snitt.org.mx/pdfs/tecnologias/SaludA/ARCHIVO53.pdf>
- 24.- Halliwell REW, Gorman NT. Inmunología clínica veterinaria. Zaragoza – España: Acribia S.A. 1992: 223-225
- 25.- Selbitz HJ, Moos M. Vacunación de los animales domésticos. España: Acribia, 1997:1-2.
- 26.- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (homepage on the Internet) México: el ganaderito (citado 2008 junio 12). Aves de corral. SAGARPA. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/v1/ganaderito/razaegg.htm>
- 27.- Cobb Vantress Homepage on the Internet) Massachusetts – USA: Cobb 500 (citado 2009 septiembre 14) disponible en: <http://www.cobb-vantress.com/Products/Cobb500.aspx>
- 28.- Nishiguchi A, Kobayashi, Ouchi Y, Yamamoto T, Hayama Y, Tsutsui T. Spatial analysis of low pathogenic H5N2 avian influenza outbreaks in Japan in 2005. Journal Veterinary medicine science. Japan 2009; 71:979-982
- 29.- Loza RE, Diosdado VF, Hernández MA, Banda RVM, Morilla GA, García GJ. Diagnóstico serológico de influenza aviar por medio de una técnica de microinmunodifusión (MIGD) en agar. Técnica Pecuaria México 1997; 35:165-168.

30.- Rodríguez VH, Cerón HM, Palacios MR, García LD, Mickle RT, Montiel NE *et al.* Estudios de evaluación de una vacuna recombinante para prevenir la influenza aviar. Memorias de la XXI convención anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45th Western Poultry Disease Conference, 1996 mayo 1-5. Cancún (Quintana Roo) México. México (DF) ANECA 1996

31.- Rico GMA, López PJA, Palacios MR, Escamilla JJ, Rodríguez VH, García GJ. Evaluación de la respuesta a la vacunación contra influenza aviar, en pollos con y sin anticuerpos maternos, aplicando productos que contienen al virus de influenza aviar solo o se combina con otros antígenos. Memorias de la XXI convención anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45th Western Poultry Disease Conference, 1996 mayo 1-5. Cancún (Quintana Roo) México. México (DF) ANECA 1996

## APÉNDICES

### Anexo 1: ración de alimento

Edad (días)	Alimento (gr) por pollo	Edad (días)	Alimento (gr) por pollo	Edad (días)	Alimento (gr) por pollo
11	56	19	95	27	121
12	62	20	98	28	126
13	67	21	100	29	131
14	72	22	104	30	136
15	77	23	108	31	141
16	82	24	111	32	146
17	87	25	114	33	151
18	91	26	117	34	156

### Anexo 2: Identificación de primeras muestras traqueales y cloacales.

Grupo – muestra (toma)	Identificación interna de virología	División de grupos para trabajo semanal en el laboratorio
AT 1 al AT 7 y CAT 8	1 al 8	Grupo 1= 1 - 20
AC 9 al AC 15 y CAC 16	9 al 16	
BT 17 al BT 23 y CBT 24	17 al 24	
BC 25 al BC 31 y CBC 32	25 al 32	Grupo 2= 21 - 40
CT 33 al CT 39 y CCT 40	33 al 40	
CC 41 al CC 47 y CCC 48	41 al 48	Grupo 3= 41 - 60
DT 49 al DT 55 y CDT 56	49 al 56	
DC 57 al DC 63 y CDC 64	57 al 64	
ET 65 al ET 71 y CET 72	65 al 72	Grupo 4= 61 - 80
EC 73 al EC 79 y CEC 80	73 al 80	
FT 81 al FT 87 y CFT 88	81 al 88	Grupo 5= 81 - 96
FC 89 al FC 95 y CFC 96	89 al 96	

NOTA: La primera letra corresponde al grupo, la segunda a la muestra y en el caso de la letra “C” al comienzo corresponde al centinela. Ejemplo: AT se interpreta como pollo del grupo “A” y la muestra es de tráquea, CFC se interpreta como; pollo centinela perteneciente al grupo “F” y la muestra es de cloaca.

Anexo 3: Identificación de muestras de la segunda toma.

Grupo – muestra (toma)	Identificación interna de virología	División de grupos para trabajo semanal en el laboratorio
AT 1 al AT 5 y CAT 6	1 al 6	Grupo 1= 1 - 19
AC 7 al AC 11 y CAC 12	7 al 12	
BT 13 al BT 18 y CBT 19	13 al 19	
BC 20 al BC 25 y CBC 26	20 al 26	Grupo 2= 20 - 40
CT 27 al CT 32 y CCT 33	27 al 33	
CC 34 al CC 39 y CCC 40	34 al 40	
DT 41 al DT 47 y CDT 48	41 al 48	Grupo 3= 41 - 56
DC 49 al DC 55 y CDC 56	49 al 56	
ET 57 al ET 62 y CET 63	57 al 63	Grupo 4= 57 - 70
EC 64 al EC 69 y CEC 70	64 al 70	
FT 71 al FT 76 y CFT 77	71 al 77	Grupo 5= 71 - 84
FC 78 al FC 83 y CFC 84	78 al 84	

NOTA: Aquí cambia el orden ya que murieron pollos en el primer muestreo, también se tomo sangre de los pollos después del hisopado y finalmente se sacrificaron a todos los pollos para así concluir con la fase de muestreo. Las muestras se mandaron al laboratorio y se congelaron para después realizar las pruebas convenientes.

Anexo 5: Resultados de prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI), correspondiente a los pollos de 32 días de edad (predesafío)

Número de muestras	Grupo	Resultados	Observaciones
7	"A"	7 negativos	Ninguna
7	"B"	7 negativos	Ninguna
7	"C"	1 negativo, 3-1:64, 2-1:128 y 1- 1:256	Ninguna
7	"D"	4 negativos, 1-1:16, 1-1:256, 1-1:512	Ninguna
7	"E"	7 negativos	Ninguna
7	"F"	1 negativo, 2-1:16, 1-1:64, 1-1:256, 1-1:512, 1-1:2048	Ninguna
6	"G" o "CENTINELA"	6 negativos	Ninguna

Resultados de la prueba de HI, correspondiente a los pollos de 42 días de edad (posdesafío).

Número de muestras	Grupo	Resultados	Observaciones
6	A	2 negativos, 2-1:32, 1-1:64, 1-1:128	Murieron dos pollos en muestreo traqueal del tercer día
7	B	3 negativos, 1-1:32, 1-1:128, 2-1:256	Murió pollo en muestreo traqueal del tercer día
7	C	1 negativo, 3-1:64, 3-1:256	Murió pollo en muestreo traqueal del tercer día
8	D	1-1:16, 2-1:128, 1-1:256, 4-1:512	Ninguna
7	E	2 negativos, 2-1:32, 1-1:64, 1-1:128, 1-1:256	Murió pollo en muestreo traqueal del tercer día
7	F	1-1:64, 1-1:128, 1-1:512, 3-1:1024, 1-1:2048	Murió pollo al cuarto día por traumatismo. *SCPA

SCPA: Sin cambios patológicos aparentes.

La muerte de los pollos fue por asfixia, ya que al momento de la toma de muestra traqueal, con el hisopo se lesionaba el órgano y no era posible reanimarlos.

Anexo 6: a continuación se muestran los resultados correspondientes al aislamiento viral en embrión de pollo, posteriormente a HA y finalmente la identificación viral de influenza aviar (IDVIA) que resultaron positivos, de una manera resumida, los cuales aparecen como negativos o positivos al virus de influenza aviar de baja patogenicidad en sus respectivas diluciones.

Datos correspondientes al primer muestreo: aislamiento, HA e identificación.

Grupo y Muestra	ORIGEN 10 <sup>6</sup>	Dilución. 1: 10 10 <sup>7</sup>	Dilución 1:50 10 <sup>7.7</sup>	Dilución 1:100 10 <sup>8</sup>
1ATráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2ATráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3ATráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4ATráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
5ATráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6ATráquea	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
7ATráquea	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
8CATráquea	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
9ACloaca	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
10ACloaca	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
11ACloaca	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
12ACloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
13ACloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
14ACloaca	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
15ACloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
16CACloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
17BTráquea	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
18BTráquea	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
19BTráquea	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
20BTráquea	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
21BTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22BTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
23BTráquea	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
24CBTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
25BCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
26BCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
27BCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
28BCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29BCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
30BCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
31BCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
32CBCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Grupo y Muestra	ORIGEN 10 <sup>6</sup>	Dilución. 1: 10 10 <sup>7</sup>	Dilución 1:50 10 <sup>7.7</sup>	Dilución 1:100 10 <sup>8</sup>
33CTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34CTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
35CTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
36CTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
37CTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
38CTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
39CTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40CCTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41CCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
42CCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
43CCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
44CCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
45CCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
46CCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
47CCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48CCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
49DTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
50DTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
51DTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
52DTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
53DTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
54DTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
55DTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
56CDTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
57DCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
58DCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
59DCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
60DCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
61DCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62DCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
63DCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
64CDCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Grupo y Muestra	ORIGEN 10 <sup>6</sup>	Dilución. 1: 10 10 <sup>7</sup>	Dilución 1:50 10 <sup>7.7</sup>	Dilución 1:100 10 <sup>8</sup>
65ETráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
66ETráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
67ETráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
68ETráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
69ETráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
70ETráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
71ETráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
72CETráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
73ECloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
74ECloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
75ECloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
76ECloaca	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
77ECloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
78ECloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
79ECloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
80CEcloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
81FTráquea	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
82FTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
83FTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
84FTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
85FTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
86FTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
87FTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
88CFTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
89FCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
90FCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
91FCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
92FCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
93FCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
94FCloaca	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
95FCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
96CFCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Datos correspondientes al segundo muestreo: aislamiento, HA e identificación.

Grupo y Muestra	ORIGEN 10 <sup>6</sup>	Dilución. 1: 10 10 <sup>7</sup>	Dilución 1:50 10 <sup>7.7</sup>	Dilución 1:100 10 <sup>8</sup>
1A Tráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2A Tráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3A Tráquea	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
M	-	-	-	-
4A Tráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
5A Tráquea	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
M	-	-	-	-
6ACTráquea	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
7A Cloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8A Cloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9A Cloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
M	-	-	-	-
10ACloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
11ACloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
M	-	-	-	-
12ACCloaca	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
13BTráquea	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
M	-	-	-	-
14BTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15BTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
16BTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
17BTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
18BTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19BCTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20BCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
M	-	-	-	-
21BCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22BCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
23BCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
24BCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
25BCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
26BCCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Grupo y Muestra	ORIGEN 10 <sup>6</sup>	Dilución. 1: 10 10 <sup>7</sup>	Dilución 1:50 10 <sup>7.7</sup>	Dilución 1:100 10 <sup>8</sup>
27CTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
28CTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29CTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
30CTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
31CTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
M	-	-	-	-
32CTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
33CCTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34CCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
35CCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
36CCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
37CCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
38CCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
M	-	-	-	-
39CCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40CCcloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41DTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
42DTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
43DTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
44DTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
45DTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
46DTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
47DTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48DCTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
49DCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
50DCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
51DCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
52DCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
53DCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
54DCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
55DCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
56CDCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Grupo y Muestra	ORIGEN 10 <sup>6</sup>	Dilución. 1: 10 10 <sup>7</sup>	Dilución 1:50 10 <sup>7.7</sup>	Dilución 1:100 10 <sup>8</sup>
57ETráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
M	-	-	-	-
58ETráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
59ETráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
60ETráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
61ETráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62ETráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
63ETráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
64ECloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
M	-	-	-	-
65ECloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
66ECloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
67ECloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
68ECloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
69ECloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
70ECCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
71FTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
M	-	-	-	-
72FTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
73FTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
74FTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
75FTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
76FTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
77FCTráquea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
78CCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
M	-	-	-	-
79FCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
80FCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
81FCloaca	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
82FCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
83FCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
84FCCloaca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo