

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**“DETECCIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN
PATOS DOMÉSTICOS DE CRIANZA FAMILIAR EN LAS
PROVINCIAS DE HUARAL Y HUAURA”**

TESIS

Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Jenny Graciela, Valladares Gago

Lima-Perú

2015



**UNIVERSIDAD NACIONAL
MAYOR DE SAN MARCOS**
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria

**“DETECCIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN PATOS
DOMÉSTICOS DE CRIANZA FAMILIAR EN LAS PROVINCIAS
DE HUARAL Y HUAURA”**

Tesis para optar por el título profesional de:

MÉDICO VETERINARIO

JENNY GRACIELA, VALLADARES GAGO
BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA

LIMA – PERÚ
2014



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 210-EAPMV/FMV-2014

PRESIDENTE : 
HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO

MIEMBROS : 
ELIANA TCOCHEA D'ARRIGO
Asesora de la Tesis

: 
ABELARDO MATURRAMO HERNÁNDEZ

: 
NELLY CRIBILLERO CHUQUIHUACCHA

San Borja, 17 de diciembre de 2014

Vº Bº


M.V. DIEGO DÍAZ COAHUILA
Director de la Escuela Académico Profesional de
Medicina Veterinaria





ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día miércoles 17 de diciembre de 2014, a las 14:00 horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 210-EAPMV/FMV-2014, integrado por los siguientes profesores:

HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO	Presidente del Jurado
ELIANA ICOCHEA D'ARRIGO	Asesora de la Tesis
ABELARDO MATURRANO HERNÁNDEZ	Miembro del Jurado
NELLY CRIBILLERO CHUQUIHUACCHA	Miembro del Jurado

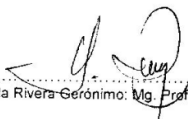
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **VALLADARES GAGO, JENNY GRACIELA**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

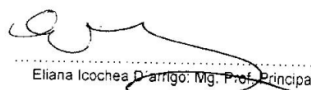
**"DETECCIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN PATOS DOMÉSTICOS DE
CRIANZA FAMILIAR EN LAS PROVINCIAS DE HUARAL Y HUAURA"**


Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO (18)**.

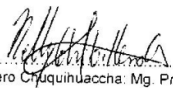
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **14:45 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuádruplicado los integrantes del Jurado:


Hermelinda Rivera Gerónimo: Mg. Prof. Principal, D.E.


Eliana Icochea D'arrigo: Mg. Prof. Principal, D.E.


Abelardo Maturrano Hernández: Dr. Prof. Asociado, T.C.


Nelly Cribillero ChuquiHuaccha: Mg. Prof. Asociado, D.E.



DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía, mi fortaleza y darme la sabiduría para culminar esta etapa académica de mi vida; a mis padres por ser ejemplos de persona y de perseverancia, por sus enseñanzas, su amor incondicional y su apoyo; y a mis abuelos que han sido ejemplo de lucha y los llevo siempre en mi corazón.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Eliana Icochea por su tiempo y sus sabias enseñanzas para la realización y culminación del presente trabajo de investigación y ser un ejemplo de profesional y de persona. A mis padres por ser mi apoyo en momentos difíciles.

Gracias a todos los que me apoyaron de una u otra manera e hicieron posible la culminación de esta tesis.

CONTENIDO

	Pág
ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
Influenza Aviar	3
Importancia económica	3
Importancia en salud pública	5
Historia	8
Etiología	11
Taxonomía	11
Estructura viral	12
Nomenclatura científica	14
Composición	14

Replicación	14
Patogenicidad viral	17
Variación antigénica	17
• Drift antigénico	18
• Shift antigénico	19
Epidemiología	19
Periodo de incubación	19
Excreción viral	20
Persistencia viral	21
Transmisión viral	22
Hospedadores y reservorios	23
Manifestaciones clínico-patológicas	26
• Signos clínicos y lesiones causados por vIABP	27
• Signos clínicos y lesiones causados por vIAAP	28
Patogénesis e inmunidad	29
Diagnóstico	31
Diagnóstico diferencial	31
• Toma de muestras y conservación	31
• Aislamiento e identificación viral	32
• Inmunodifusión en Agar Gel (AGID)	34
• Kits comerciales de Inmunoensayos	35
• Técnicas moleculares	35
Prevención y control	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS	38
Lugar de estudio	38

Animales muestreados	39
Materiales y equipos	40
• Materiales y equipos para la colección de muestras	40
• Materiales y equipos para las pruebas de diagnóstico	40
Método de evaluación	41
Tamaño de muestra	41
Recolección de las muestras	42
Procesamiento de las muestras	43
• Aislamiento viral	43
• Prueba diagnóstica	45
Análisis estadísticos	46
IV. RESULTADOS	47
V. DISCUSIÓN	50
VI. CONCLUSIÓN	55
VII. LITERATURA CITADA	56

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AGID:	Prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar.
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ELISA:	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
H:	Hemaglutinina
HA:	Hemaglutinación
HI:	Inhibición de la Hemoaglutinación
IA:	Influenza Aviar
IAAP:	Influenza Aviar de Alta Patogenicidad
IABP:	Influenza Aviar de Baja Patogenicidad
M:	Proteína matriz
N:	Neuroaminidasa
NP:	Nucleoproteína
OIE:	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OPS:	Organización Panamericana de la Salud
PAMV-1:	Paramixovirus Aviar Tipo 1
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
pH:	Potencial de hidrógeno

RT-PCR: Reacción de la cadena de polimerasa en transcripción reversa

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad Agraria

SPF: Huevos embrionados de pollos libres de patógenos específicos

ul: Microlitro

vIA: Virus de Influenza Aviar

RESUMEN

Influenza Aviar impacta en la salud pública debido a que representa un potencial riesgo zoonótico. Además, es una amenaza para la industria avícola debido a que puede causar una elevada morbilidad y mortalidad en las aves afectando la economía y el comercio. El virus de Influenza Aviar ha sido aislado de una amplia variedad de especies aviares como por ejemplo los patos domésticos que pueden ser posibles portadores silenciosos del virus. El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia del virus de Influenza Aviar en patos domésticos de crianza familiar en las provincias de Huaral y Huaura. Se colectaron 600 muestras de hisopado cloacal de patos domésticos de traspatio sin distinción de sexo o edad, las cuales fueron analizadas mediante aislamiento viral en huevos embrionados de pollo SPF. La presencia del virus de la Influenza Aviar fue determinada por la actividad hemaglutinante del fluido alantoideo, y confirmada mediante un kit de diagnóstico rápido, que utiliza anticuerpos monoclonales. El 100% (600/600) de las muestras analizadas fueron negativas al virus de Influenza Aviar en este estudio con una prevalencia determinística de 0%. Se concluyó que las aves incluidas en el muestreo no se encuentran infectadas con el virus de Influenza Aviar.

Palabras claves: virus de influenza aviar (vIA), patos domésticos, aislamiento viral, prevalencia

ABSTRACT

Avian Influenza impacts on public health because it represents a potential zoonotic risk. Besides, it is a major threat to the poultry industry due to it can cause high morbidity and mortality in birds affecting the economy and trade. Avian Influenza virus has been isolated from a wide variety of avian species such as domestic ducks that could be possible silent carriers of the virus. The aim of this study was to evaluate the presence of avian influenza virus in domestic ducks of family rearing at the provinces of Huaral and Huaura. Six hundred cloacal swabs samples of domestic ducks were collected without regard of sex or age, that were analyzed by virus isolation in specific pathogen-free (SPF) chicken eggs. The presence of Avian Influenza virus was determined by the hemagglutination activity of allantoic fluid and confirmed by a rapid diagnostic kit that has monoclonal antibodies. One hundred percent (600/600) of the samples tested were negative for Avian Influenza virus in this study with a deterministic prevalence of 0%. It was concluded that the birds included in the sample are not infected with the Avian Influenza virus.

Keywords: Avian Influenza virus, domestic ducks, virus isolation, prevalence

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Número de predios de patos por distritos en las provincias de Huaral y Huaura.
Datos de programas de vacunación en patos por PRONASA del SENASA.

Cuadro 2. Distribución del tamaño de muestra en relación a la población de patos en las provincias de Huaral y sus respectivos distritos.

Cuadro 3. Distribución del tamaño de muestra en relación a la población de patos en las provincias de Huaura y sus respectivos distritos.

Cuadro 4. Resultados obtenidos mediante la prueba de hemaglutinación (pooles positivos) en patos de traspatio en las provincias de Huaral y Huaura

Cuadro 5. Resultados según las provincias evaluadas mediante las pruebas de Hemaglutinación (HA), Inhibición de la hemaglutinación (HI) y diagnóstico rápido de captura de antígeno (QuickVue)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapas de focos de la enfermedad de Influenza Aviar Altamente Patógena. Actualizado hasta el 1 de noviembre de 2014.

Figura 2. Esquema de la configuración genómica y estructural de las partículas virales de los influenzavirus A, B y C.

Figura 3. Esquema de la estructura del virus Influenza A

Figura 4. Replicación de virus de Influenza Aviar

Figura 5. Distribución de la probabilidad de prevalencia del virus de Influenza Aviar en las provincias de Huaral y Huaura, con intervalos de confianza del 95% mediante la simulación de Monte Carlo

I.- INTRODUCCION

Influenza aviar (IA) es una enfermedad infecciosa causada por los virus de influenza aviar tipo A. Este virus puede afectar a aves de crianza tecnificada, aves de traspatio, aves de compañía, aves silvestres y algunos mamíferos como el cerdo e incluso el hombre. Por lo tanto, esta enfermedad representa un problema de gran importancia en la industria avícola mundial, debido a que genera grandes pérdidas económicas y restricciones al comercio internacional.

Los virus de influenza aviar son propensos a mutar constituyendo un potencial riesgo zoonótico que podría ser altamente peligroso para el hombre. Por ello diversos organismos internacionales elaboraron manuales orientados a implementar una correcta vigilancia epidemiológica de la enfermedad (OPS, 200; Wetlands International Globalsite, 2007; OIE, 2009; FAO, 2007).

A partir de un brote ocurrido en Chile en el año 2002, el Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA), elaboró un plan de contingencia contra IA, del mismo modo elaboró un Documento Sustentatorio declarando al Perú libre de IA (2005). Sin embargo, estudios posteriormente realizados en nuestro país han aislado subtipos de Influenza Aviar de Baja

Patogenicidad (IABP) en aves silvestres (Gherzi, 2009, 2011; Segovia, 2013), lo cual implica un riesgo latente para la aparición de la enfermedad en el Perú.

Las aves silvestres acuáticas, principalmente las aves del orden Anseriformes y Charadriiformes, representan el principal reservorio natural de todos los virus de Influenza de tipo A; al ser generalmente asintomáticos no evidencian manifestaciones clínicas lo que hace casi imposible su erradicación (Spackman et al., 2005). En el año 2004, la Organización de las Naciones Unidas (ONU) para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) alertaron que los patos domésticos, pertenecientes al orden Anseriformes, podrían ser portadores silenciosos del vIA adquiriendo un papel clave en la transmisión del virus a otras aves e incluso a los humanos. La vigilancia epidemiológica en esta especie ayudaría a una posible detección temprana del virus impidiendo su pronta diseminación.

El presente estudio se realizó en patos domésticos de crianza familiar de las provincias de Huaral y Huaura. Este tipo de crianza se caracteriza por un escaso cuidado veterinario, bajos niveles de bioseguridad y generalmente un contacto significativo con las aves silvestres, exponiéndose a posibles infecciones incluidas las del virus de influenza aviar. Por todo lo anteriormente expuesto se justifica la realización de este estudio.

El objetivo principal fue evaluar la presencia o ausencia del vIA, mediante el aislamiento viral en huevos embrionados SPF a partir de hisopados cloacales de patos domésticos de crianza de traspatio, los resultados contribuyen a generar información al sistema de vigilancia epidemiológica y nos da una visión sobre la situación de los patos domésticos respecto a la influenza aviar en nuestro país.

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 INFLUENZA AVIAR

2.1.1 Importancia económica

La importancia del sector avícola en la economía de América Latina ha continuado aumentando en los últimos años y el Perú no se ha visto ajeno a este crecimiento. Para el año 2012 la población de aves de corral a nivel nacional se había incrementado en un 69% respecto al Censo Nacional Agropecuario de 1994 (INEI, 2012). Las pérdidas económicas a causa de la enfermedad de influenza aviar dependen de la cepa del virus, la especie de ave infectada, el número de explotaciones afectadas, los métodos de control y la velocidad de implementación de las estrategias de control o erradicación (Swayne y Halvorson, 2008).

Desde 1959 hasta el 1998 solo se detectaron 28 focos de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (IAAP) que afectaron a 23 millones de aves. Sin embargo, entre los años 1999 y 2004 el impacto se incrementó 100 veces, afectando a más de 200 millones de aves (Capua y Alexander, 2004). Solamente en Asia, las pérdidas económicas en el sector avícola se estiman en aproximadamente 10 mil millones de dólares (FAO/OIE/OMS, 2005)

Uno de los brotes más devastadores a nivel mundial fue el ocurrido en Italia entre 1999 y el 2000 generado por un virus IAAP subtipo H7N1 causando la muerte de 16 millones de aves y perdiéndose aproximadamente 400 millones de euros (Martins, 2003). Los costos del foco de IAAP ocurrido en Chile en el año 2002 por el subtipo H7N3 superaron los 30 millones de dólares (West, 2010).

Cuando ocurre un brote de IA la decisión de erradicación o vacunación dependen del desarrollo de la avicultura y de la economía del país en cuestión. Los programas de erradicación de la IAAP han permitido dar reportes más precisos, incluyendo la despoblación y los costos de la eliminación de las aves, de la morbilidad y mortalidad, las pérdidas de limpieza y desinfección, los costos de cuarentena y vigilancia, y las indemnizaciones pagadas por las aves. Sin embargo, los costos indirectos, tales como pérdidas no compensadas a la industria avícola como la pérdida temporal o permanente de las exportaciones de aves de corral, la pérdida de ingresos de los agricultores durante la producción el tiempo, el aumento de los costos de consumo de la reducción suministro de productos de aves de corral, y pérdidas por la disminución de compras de los consumidores puede escalar fácilmente las pérdidas por 5-10 veces (Swayne y Halvorson, 2008).

El Perú tiene la oportunidad de aprender de las lecciones de los países asiáticos con respecto a la forma de prevenir y enfrentar esta enfermedad. Banco Interamericano de Desarrollo (2006), elaboró diferentes escenarios en Latinoamérica determinando que una inversión en la preparación y la prevención de la IAAP realizada a tiempo en los sistemas de sanidad animal era conveniente y podía ahorrarle a los países de Latinoamérica por lo menos US\$1.200 millones de pérdidas en el sector avícola.

La evaluación de la patogenicidad de un virus de IA recientemente aislado es fundamental para el desarrollo de estrategias de control adecuadas y evaluar el impacto en el comercio internacional. La IAAP es una enfermedad de la lista A de la OIE y se ha utilizado como una barrera comercial legítima para proteger a los países o regiones de introducción de una enfermedad exótica aviar, es decir, la IAAP (Swayne y Suarez, 2000).

2.1.2 Importancia en salud pública

Se conoce históricamente que el origen de las pandemias de influenza se debe a la transmisión del virus de aves al hombre o la transferencia de genes de éstos a los virus de la influenza estacional. En las aves acuáticas silvestres, tanto migratorias como costeras, se mantiene una gran diversidad de subtipos de virus de influenza, los cuales se introducen eventualmente en aves domésticas, donde algunos virus adquieren la capacidad de infectar a mamíferos, incluido el hombre. El proceso de adaptación de los virus aviarios a hospederos mamíferos requiere tiempo, por lo que la presentación de estos casos puede tardar varios años (García y Ramos, 2006).

Las pandemias de gripe se producen por la convergencia de dos factores clave: la aparición de un virus de la gripe capaz de causar una transmisión sostenida de persona a persona, y una escasa o nula inmunidad de la mayoría de las personas frente a ese virus (OMS, 2014). Los virus de la influenza A, incluyendo los que producen epidemias en los humanos, se encuentran bien adaptados para eludir las defensas inmunológicas del huésped al que infectan, debido a que carecen de sistemas genéticos de reparación de su material genético durante la replicación en el humano, por lo que la cepa existente puede ser remplazada con una variante antigénica nueva. Estos pequeños pero permanentes cambios antigénicos requieren de una vigilancia constante de la situación mundial de la influenza, con ajustes anuales de la composición de las vacunas contra la influenza (Echániz, 2004).

La capacidad que tienen los virus que provienen de diferentes especies de "rearreglar" su material genético, da como resultado un subtipo diferente al de los dos virus originales. Debido a que las poblaciones susceptibles carecen de inmunidad contra este nuevo subtipo y no existen vacunas producidas contra él, estos cambios genéticos han generado pandemias altamente letales. Para que esto suceda, el nuevo serotipo debe contener genes de virus de influenza humanos para que se transmita fácilmente entre la población durante un tiempo determinado (Echániz, 2004).

La introducción de virus de aves acuáticas silvestres a los humanos requiere un proceso complicado de adaptación viral en hospederos intermediarios y de evolución genética para lograr la eficiente transmisión entre humanos (García y Ramos, 2006).

La primera descripción de un padecimiento identificable como influenza la realizó Hipócrates en el año 492 a.C. No obstante, la primera pandemia reconocida ocurrió en 1580, que fue llamada “influenza planetaria”, por la asociación que hicieron con una serie de fenómenos astrales observados antes del brote, de donde se derivó el nombre actual de influenza. En 1918-1919 otra pandemia denominada “Influenza española” causó la muerte de 20 a 40 millones de personas a nivel mundial, lo que representó de 2.5 a 5% de la población global, y se calcula que al menos 20% de la población mundial se infectó con el virus H1N1. Los casos de influenza de los cerdos, identificados de manera simultánea durante la pandemia y con el mismo subtipo de virus H1N1, sugirieron la posibilidad de que este animal haya desempeñado un papel importante en la adaptación del virus para infectar a humanos (García y Ramos, 2006).

Las cepas pandémicas subsiguientes fueron el subtipo H2N2 en 1957 y H3N2 en 1968, estas cepas variantes contenían genes de virus de influenza humana y aviar: tres en 1957 (HA, NA, y la ARN polimerasa PB1) y dos (HA y PB1) en 1918 (Kawaoka et al., 1989). En 1997 un nuevo virus de influenza aviar de alta patogenicidad (H5N1) adquirió la capacidad de causar infección en humanos en Hong Kong (García y Ramos, 2006). Aunque no se demostró científicamente la transmisión concreta entre humanos para considerar a estos casos como problemas epidémicos, el número de personas infectadas aumenta la probabilidad de que sirvan como “tubo de ensayo” para que emerja un nuevo subtipo que posea los suficientes genes humanos y se transmita fácilmente entre individuos (Taubenberger et al., 2005).

Desde 1998 se ha comprobado que los humanos se infecten directamente de las aves, sin que el virus necesite un periodo de adaptación en la especie porcina como los brotes gripales de H5N1 y H9N2 (Godoy, 2006). Paralelamente, la amenaza de una pandemia de influenza se hizo presente en 2003 cuando cepas altamente patógenas del virus de la influenza aviar, incluyendo los subtipos H5N1 y H7N7, cruzaron la barrera entre aves y humanos y causaron la muerte de varias personas. Todos los genes son de origen aviar y no han adquirido genes humanos (Echániz, 2004). La falta de métodos de diagnóstico apropiados y el comercio insalubre de aves domésticas permitió la difusión del virus con rapidez a diferentes países (García y Ramos, 2006).

Desde su reaparición generalizada en 2003 y 2004, este virus aviar se ha propagado de Asia a Europa y África, y se ha arraigado en las aves de corral de algunos países, produciendo no solo millones de casos de infección en estos animales, sino también varios cientos de casos humanos y la muerte de muchas personas (OMS, 2014).

La circulación continua de virus H5N1 en las aves de corral, especialmente cuando es enzoótica, sigue suponiendo una amenaza para la salud pública, dado que estos virus pueden causar enfermedad grave en el ser humano; además, cabe la posibilidad de que sufran cambios que los hagan más transmisibles entre las persona. En un mundo tan interconectado como el actual, una epidemia local puede convertirse rápidamente en una pandemia, dejando poco tiempo para preparar una respuesta de salud pública que detenga la propagación de la enfermedad (OMS, 2014).

El virus de la gripe aviar H5N1 sigue siendo uno de los virus de la gripe con potencial pandémico, puesto que sigue circulando ampliamente en algunas poblaciones de aves de corral, que la mayoría de los seres humanos probablemente no son inmunes a él y que puede ser causa de enfermedad grave y muerte en las personas (OMS, 2014).

Además del H5N1 hay otros subtipos de virus de la gripe de los animales que han infectado al ser humano, tales como los virus aviares H7 y H9, y los virus porcinos H1 y H3 (OMS, 2014). La vacunación de las personas con alto riesgo de exposición a las aves infectadas, usando las vacunas más eficaces contra las cepas circulantes de la influenza humana, permite reducir la probabilidad de coinfección del ser humano con cepas aviares (Echániz, 2004).

En febrero del año 2013 se inició una epidemia de enfermedad respiratoria en humanos provenientes de las ciudades de Shanghái y Anhui en la China; después de realizar las pruebas diagnósticas se determinó que se trataba de un rearrreglo genético de Influenza A (H7N9). El origen de este virus involucra aves silvestres y domésticas. Varios estudios han postulado que el lugar más posible donde ocurrió la transmisión pudo estar relacionado con ambientes acuáticos, que facilitaron el encuentro de aves migratorias con aves domésticas que se comercializan en los mercados de las ciudades. Se presentan algunos aspectos relacionados con el origen de la enfermedad, su difusión y

algunos interrogantes sobre el comportamiento del agente que quedan pendientes como consecuencia de la emergencia de H7N9 (Ortiz y Villamil, 2013).

2.1.3. Historia

En 1878, el científico italiano Edoardo Perroncito describe por primera vez la influenza aviar de alta patogenicidad como una enfermedad de las aves, extremadamente grave y de elevado índice de letalidad. Fue llamada originalmente “tifoidea epizootica de aves de corral” (Perroncito, 1878). En 1880, Rivolto y Delprato diferenciaron ambas enfermedades en base a hallazgos clínicos y patológicos. El primer aislamiento del virus de Influenza fue documentado por Centanni y Savonuzzi, en 1901, quienes identificaron al causante de la enfermedad como un agente filtrable (Swayne y Halvorson, 2008). Sin embargo, la enfermedad no fue clasificada como un virus de influenza hasta 1955, año en el que Shafer demostró que el virus de la peste aviar era un miembro de los virus Influenza A (Horimoto y Kawaoka, 2001).

Anteriormente, en 1941, Hirst descubrió la capacidad hemaglutinante de los virus de Influenza y en 1943 Lush introdujo la prueba de la Inhibición de la Hemaglutinación para la diferenciación de los virus de la plaga aviar y de la enfermedad de Newcastle (Horimoto y Kawaoka, 2001; Lupiani y Reddy, 2009).

A partir de las pandemias humanas ocurridas en los años 1957 y en 1968 se optó por realizar un amplio estudio de la ecología de los virus de influenza aviar para obtener mayor información sobre el origen de las cepas pandémicas, estos estudios llevaron a la conclusión de que el vIA está ampliamente distribuido entre las aves y probablemente de forma ubicua en las aves acuáticas. En Escocia se aislaron cepas altamente patógenas pertenecientes a los subtipos H5 en pollos y en golondrinas de mar. Ambas especies padecieron graves problemas de enfermedad lo que llevó a clasificar al vIA en dos tipos en base a su virulencia: cepas altamente virulentas que pueden causar plagas en aves y cepas de baja patogenicidad que pueden provocar enfermedades leves o asintomáticas (Horimoto y Kawaoka, 2001).

Los aislamientos ocurridos entre esas fechas condujeron a la especulación de que todos los virus H7 y H5 eran altamente patógenos, pero se verificó que esto no es verdad, como lo demuestra el caso de Oregón en 1971 cuando se aisló un virus con una H7 en pavos, avirulento para pollos. Desde entonces, se han aislado muchos otros virus con H5 Y H7 de aves en diferentes partes del mundo, siendo muchas de éstas avirulentas para cualquier especie, sin embargo es cierto que históricamente, los problemas de enfermedad más intensos se han debido a virus de los subtipos H5 y H7 (Easterday et al.,1997).

A inicios de la década del 70 fue reconocida la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel como el estándar internacional para el diagnóstico serológico y de vigilancia. Años después se demostró que el principal reservorio y huésped natural del virus de Influenza aviar eran las aves acuáticas silvestres del orden Anseriformes, y a finales de los 70 fue identificado que el sitio de corte de la hemaglutinina era el mayor determinante de virulencia del virus de Influenza Aviar altamente patógena (Buscaglia, 2004).

En 1981 se realizó el primer Simposio Internacional de la enfermedad de Influenza Aviar, cambiando el nombre de peste aviar por Influenza aviar de alta patogenicidad, a ello le siguieron otros simposios en los años 1986, 1992, 1997, 2002 (Buscaglia, 2004) que continúan hasta la fecha. Los países de Centroamérica también reportaron presencia de IABP por la cepa H5N2, afectando Guatemala en el 2000, el Salvador en el 2002, y presentándose un foco en República Dominicana y Haití; sin embargo actualmente se encuentran libres de IAAP (Organismo Internacional de Sanidad Agrícola, 2010).

En Sudamérica, la primera vez que ingresó una cepa de alta patogenicidad fue en Chile en el año 2002 generado por el subtipo H7N3. En menos de tres meses se controlaron los dos focos desarrollados, evitándose la difusión de la enfermedad al resto del país. Sólo seis meses después se declaró oficialmente a Chile libre de la enfermedad (Rojas y Moreira, 2002). Como respuesta al primer brote acontecido en Chile, el SENASA aprobó el Plan de acción para la prevención de Influenza Aviar en el Perú (SENASA, 2002).

En el 2005 se expandió un brote en Asia iniciado en el 2003 causado por el subtipo H5N1 que afectó a la industria avícola con tasas históricas sin precedentes, llegando por primera vez a producir brotes en varios países de Europa y África (Alexander, 2006).

El Programa Nacional de Sanidad Avícola del SENASA, elaboró un Documento Sustentatorio para la Declaración del Perú como país libre de Influenza Aviar (SENASA 2005). Ese mismo año, se detectaron anticuerpos contra el virus H9N2 en pollos durante el desarrollo de vigilancia epidemiológica de rutina realizado en Colombia (Ortiz et al., 2006)

En nuestro país, se han realizado estudios en aves migratorias aislándose 7 cepas de virus de IABP del subtipo H12N5 en los humedales de Puerto Viejo, (Segovia, 2010) y 9 cepas de virus de IABP de los subtipos H3N8, H4N5, H10N9 y H13N2 en la costa central (Gherzi et al., 2009). La FAO, OIE y OMS alertaron que los patos domésticos podrían representar una nueva amenaza de gripe aviar siendo posibles portadores silenciosos del virus de la influenza aviar H5N1 altamente patógeno para los pollos y por lo tanto pueden haber adquirido un nuevo e importante papel en la transmisión del virus a otras aves de corral y, posiblemente, a los seres humanos (FAO, 2004). Los primeros informes de aislamientos del virus de la influenza A de patos domésticos se realizaron en Checoslovaquia e Inglaterra en 1956, siendo uno de los primeros reconocimientos de infecciones de la Influenza A de aves (Koppel et al., 1956). En Norfolk, Inglaterra, entre el agosto de 1979 y marzo de 1980, se realizó una investigación en patos domésticos con enfermedad respiratoria de una granja comercial, aislando 10 virus de la influenza aviar y un virus de Newcastle (Alexander et al., 1981).

Apenas en lo que va del presente año 2014, se han presentado varios casos de IAAP en diferentes países del mundo, principalmente China y Vietnam, datos que se van actualizando a medida que la OIE recibe información sobre la existencia de nuevos focos (OIE, 2014). En la Figura 1, se observan los diversos brotes en aves domésticas reportados entre el 1 de enero del 2013 al 1 de noviembre del 2014. En América se han reportado brotes de influenza aviar en aves domésticas en México, estos casos han sido resueltos. Mientras que no es así en China y Corea, en donde existen

brotos no resueltos, siendo el continente asiático el que más casos de brotes de influenza aviar reporta.

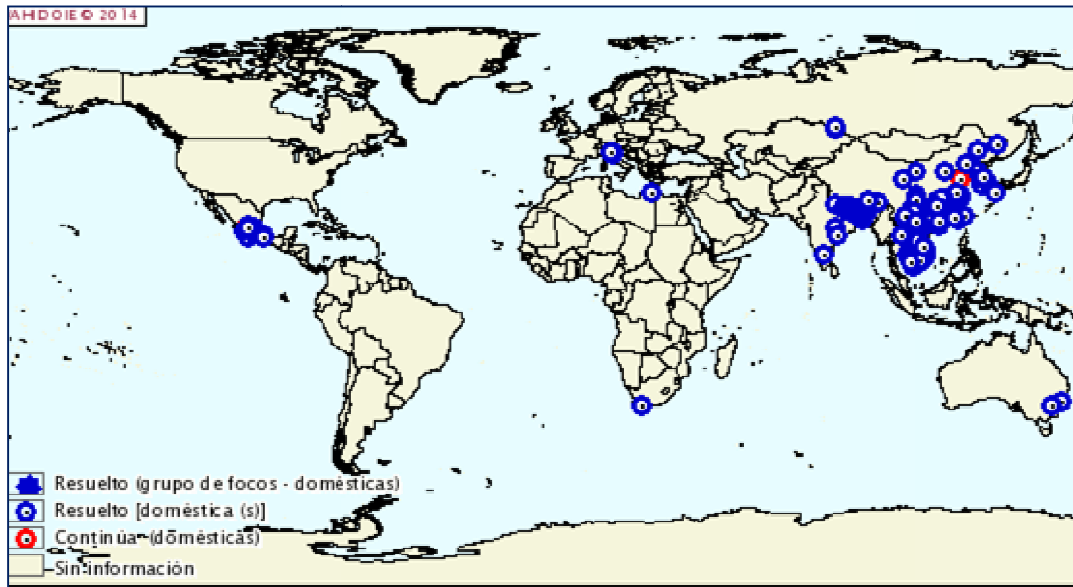


Figura 1. Mapas con los focos de la enfermedad de Influenza Aviar Altamente Patógena actualizado hasta el 1 de noviembre de 2014. Fuente: OIE, 2014.

2.1.4 Etiología

2.1.4.1 Taxonomía

El virus de influenza es un miembro de la familia *Orthomyxoviridae*, y se distribuyen en tres géneros: *Influenzavirus* A, B y C (OIE, 2008). Los virus de la influenza tipo A son los únicos ortomyxovirus conocidos que afectan a las aves; sin embargo, pueden también infectar a otras especies como cerdos, caballos, ballenas, lobos de mar y otros incluyendo los humanos. Mientras que los tipos B y C solo infectan a los humanos (Herrero, 2008).

Además de su especificidad de infección en las distintas especies de animales, los influenzavirus pueden distinguirse principalmente por las variaciones antigénicas entre las proteínas M2 y NP que se utilizan para la caracterización del virus y que son específicas para cada género (Wright y Webster, 2001). El grado de variabilidad antigénica en sus glicoproteínas de superficie y el

número de segmentos del RNA son también características distintivas entre los virus de influenza. Así, los virus de influenza tipo A presentan la mayor diversidad de proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) y contienen 8 segmentos de ARN al igual que el virus de influenza tipo B, mientras que el tipo C solo contiene siete segmentos (Strauss y Strauss, 2008).

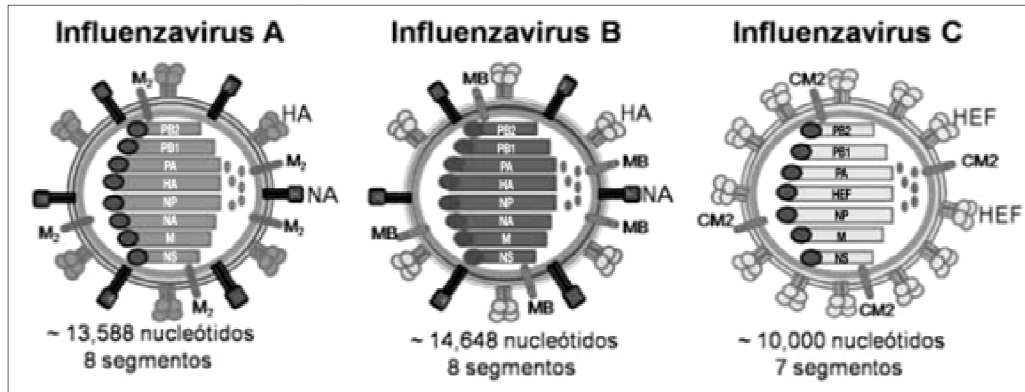


Figura 2. Esquema de la configuración genómica y estructural de las partículas virales de los influenzavirus A, B y C. Fuente: Perret y Dabanch, 2008.

2.1.4.2 Estructura viral

Los viriones de influenza presentan formas esféricas o varas cortas de 80-120 nm de diámetro, aunque también pueden ser filamentosos alcanzando un tamaño de 400-800 nm de largo (Buscaglia, 2004).

Presentan además una envoltura conformada por una bicapa lipídica proveniente de la célula infectada, en cuya superficie interna se encuentran dos antígenos internos: la proteína matriz M1 y la nucleoproteína (NP); mientras que en su superficie externa se insertan los antígenos externos: Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) (Figura 3) (Suarez, 2006; Herrero, 2008).

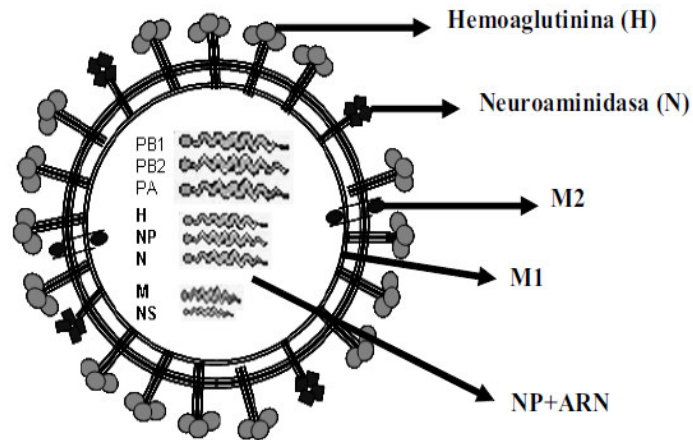


Figura 3. Esquema de la estructura del virus Influenza A. Fuente: Noda, 2006.

El virus influenza aviar se clasifican en subtipos en base a dos proteínas estructurales en su envoltura: los antígenos de hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N) que son importantes en la patogenia y variación del virus. Actualmente se reconocen 16 subtipos de hemaglutininas (H1-H16) y 9 subtipos de neuraminidasas (N1-N9). Estos dos tipos de proyecciones de glicoproteína miden de 10 -14 nm de longitud y 4-6 nm de diámetro respectivamente, siendo la HA un trímero en forma de vara mientras que la NA un tetrámero en forma de hongo (Swayne, et al., 2003).

Los antígenos H se adhieren a los receptores celulares, tienen actividad hemaglutinante con glóbulos rojos (Buscaglia, 2004). La HA es una glicoproteína muy inmunogénica, generan anticuerpos protectores. Estos anticuerpos específicos neutralizan al virus, ya que interfieren con el reconocimiento de los receptores en el nivel celular que son residuos de ácido siálico. La neuraminidasa (N) es una enzima que elimina residuos de ácido siálico de la membrana celular y tiene la función de liberar el virus de las células. Estas dos glicoproteínas son las que más sufren de variaciones antigénicas, ya que los anticuerpos producidos contra las variantes anteriores no son tan específicos ni ávidos para las nuevas, por lo tanto, son menos protectores (Herrero, 2008).

Hasta la fecha, los virus muy virulentos de la gripe tipo A, que producen una enfermedad clínica aguda en los pollos y pavos, solamente se han asociado con los subtipos H5 y H7 (OIE, 2008).

La nucleocápside viral es segmentada con simetría helicoidal y consta de diferentes tamaños que varían de 30 a 120 nm de longitud (Noda, 2006). Su genoma viral está compuesto por 8 segmentos génicos de ARN monocatenario de polaridad negativa (Suarez, 2006). El ácido nucleico codifica para 10 proteínas, de las cuales ocho son proteínas estructurales (HA, NA, M1, M2, NP, M1, PB1, PB2 y PA) y dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2) ubicadas en el citoplasma de la célula huésped (Easterday et al., 1997). Las proteínas HA, NA y M2, por su enlace superficial en el virión y su carácter antigénico, condicionan con preferencia la relación virus-hospedador, así como la capacidad infecciosa del virus (Suarez, 2006).

La M2 es un canal de protones que sirve para acidificar el virus con el fin de que pueda desnudarse de su cápside y liberar los segmentos de ribonucleoproteína (RNP) para que vayan al núcleo celular y sean replicados. Posee, además, tres proteínas ligadas a la RNP que tienen su función en la transcripción y la replicación del ácido nucleico viral (Herrero, 2008).

2.1.4.3 Nomenclatura científica

Se ha estandarizado una nomenclatura para describir al virus de influenza proporcionando de forma coherente información acerca de la cepa viral, esta nomenclatura está basada en el tipo antigénico (A, B o C), el origen del hospedero, sitio geográfico de origen de la cepa que puede ser una ciudad, estado, provincia, país o designación; número de la cepa aislada, año de aislamiento del subtipo y los subtipos de la hemaglutinina y neuraminidasa designada entre paréntesis; por ejemplo: A / tern / Sur Africa/1/61 / (H5N3) (Swayne, 2008).

2.1.4.4 Composición

Los viriones de influenza están compuestos por 0.8-1.0% de ARN, 5-8% de carbohidratos, 20% de lípidos y 70% de proteína (Easterday et al., 1997).

2.1.5 Replicación

La infección viral se inicia por la ingestión o inhalación de viriones infecciosos de baja o alta patogenicidad. Posteriormente se da el reconocimiento entre la HA viral y el receptor celular que

contiene ácido siálico, iniciando de esta forma la endocitosis mediada por receptor. (Swayne y Halvorson, 2008).

La especificidad de la HA viral al receptor depende de la especie huésped. Rogers y Paulson (1983) indicaron que la HA de virus humanos se adhiere al ácido siálico unido al penúltimo azúcar galactosa por un enlace (α -2,6); mientras que la HA de virus aviáres se adhiere al ácido siálico mediante enlaces (α -2,3). Lo anterior es la base bioquímica por la cual los virus no pueden traspasar las barreras inter-especies, esto solo sucedería ante cambios antigénicos shift, para lo que se requiere de un intermediario, el cerdo, que es susceptible a virus aviáres y humanos debido a que presenta estructuras sialiladas en α -2-3 como en α -2-6. Sin embargo, actualmente existen cepas que son capaces de transmitirse directamente del ave al humano sin necesidad de un intermediario (Flores et al., 2007).

El virus ingresa por endocitosis al interior de la célula, cuando en la vacuola endocítica se produce una disminución drástica del pH gracias a la proteína M2 que permite el ingreso de iones dentro del virión, lo cual causa un cambio conformacional de la HA (Steinhauer, 1999; Pinto y Lamb, 2007), que consiste en la partición de la HA en H1 y H2, lo que es un prerrequisito para la fusión e infectividad. El flujo de iones H⁺ dentro del endosoma favorece la disociación de la proteína M1 de las RNPs quedando libres en el citoplasma (Palesse y Shaw, 2007) y siendo transportadas al núcleo donde el complejo de transcriptasas sintetiza ARNm (Krug, 1981).

La transcripción es iniciada con 10-13 nucleótidos de fragmentos de ARN generados del ARN nuclear del huésped vía actividad viral de endonucleasas del PB2. Posteriormente, 6 ARNm monocistrónicos son producidos por el núcleo y transportados al citoplasma para la traducción en proteínas: HA, NA, NP, PB1, PB2 y PA (Rocancio, 2005).

El ARNm de los genes NS y M sufren un corte obteniéndose dos ARNm para la traducción de proteínas (NS1, NS2 y M1 y M2) las cuales llegan al sitio de liberación de los nuevos viriones por diferentes rutas. Las proteínas HA, NA y mínimas cantidades de M2, se sintetizan en el retículo

endoplasmático y se insertan en la membrana plasmática. Los 8 segmentos de genes virales y las proteínas virales internas se ensamblan y migran también hacia la membrana plasmática (Figura 4).

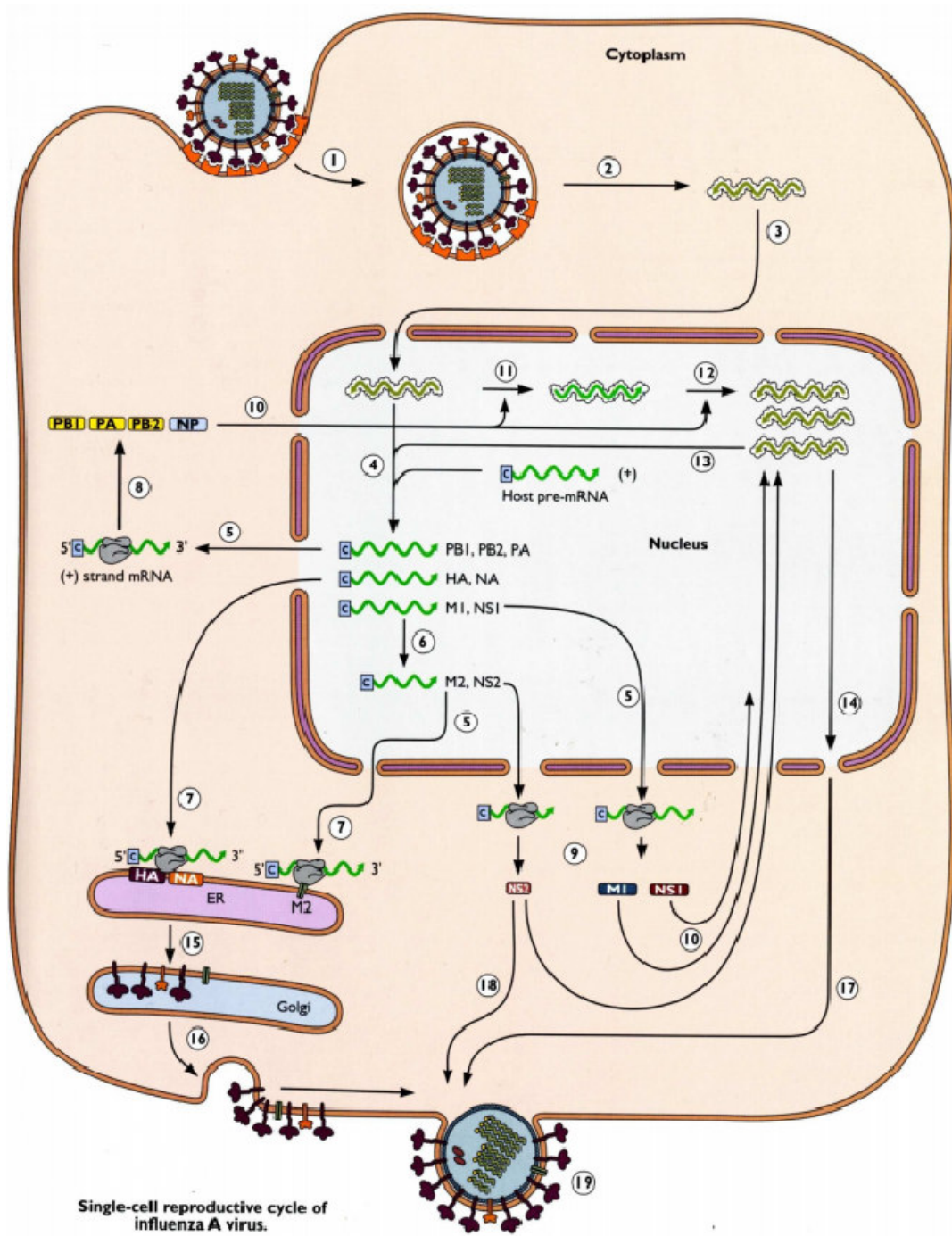


Figura 4. Replicación de virus de Influenza Aviar. Fuente: Rodríguez, 2006.

Finalmente, la proteína M1 promueve la unión de las nucleocápsides a los extremos citoplasmáticos de las glicoproteínas (Lamb y Krug ,1996). Posterior al ensamblaje de las proteínas virales, la actividad enzimática de la NA es la encargada de remover el ácido siálico de la HA, para la eficiente liberación de las partículas virales y la infección a otras células hospederas (Lamb y Krug, 1996).

2.1.6 Patogenicidad viral

El gen HA es el principal determinante del cambio en la patogenicidad de los vIA(Bosch *et al.*, 1979). Un precursor HA0 es cortado enzimáticamente dividiéndose en HA1 y HA2, el corte produce cambios en la región del ligando que exponen los aminoácidos de unión al receptor, permitiendo que el virus se adhiera fácilmente a la célula (Easterday *et al.*, 1997).

Los virus IABP se caracterizan por contener al menos dos aminoácidos básicos del tipo lisina y arginina en la región terminal de la HA1, que son cortadas por la enzima tripsina, la cual se encuentra sólo en células del tracto respiratorio y digestivo de las aves (Swayne y Halvorson, 2008). Mientras que los virus IAAP sufren una serie de cambios puntuales en su conformación estructural que pueden generar sustituciones e inserciones de múltiples aminoácidos básicos en la región terminal de la HA1. Los aminoácidos de la HA de la IAAP son reconocidos por enzimas celulares del tipo furina que están presentes en muchas células de numerosos órganos viscerales, favoreciendo la replicación sistémica del virus (Suarez, 2006).

2.1.7 Variación antigénica

Los virus de IA poseen dos mecanismos primarios de dar diversidad en la población viral. Uno de ellos es la alta tasa de mutaciones puntuales en los genes que codifican a los antígenos hemaglutinina y la neuraminidasa, ya sea espontánea o debido a presión inmunológica (antigenicdrift). El otro fenómeno es conocido como cambio antigénico mayor (antigenicshift) y es causado por la redistribución de segmentos genéticos entre cepas humanas y animales llegándose a producir un intercambio genético entre diferentes especies de virus de la influenza, con

reordenamiento del genoma y generación de un nuevo subtipo viral (Easterday et al., 1997 y Rocancio, 2005).

Lo anterior se debe principalmente a las fallas del ARN polimerasa durante la transcripción cuya fidelidad en la lectura no es buena y a la fragmentación de genoma viral en 8 segmentos favoreciendo el intercambio genético entre ellos. Estos dos posibles acontecimientos se traducen en cambios de aminoácidos generando proteínas diferentes a las originales (Perret y Dabanch, 2008).

2.1.7.1. Drift antigénico

Ocurre por la acumulación de mutaciones puntuales de nucleótidos, que se presentan como sustituciones de nucleótidos, inserciones y deleciones de tripletes que son causados principalmente por errores de la enzima polimerasa de RNA durante la transcripción, en particular en el segmento que codifica para la HA y que resulta en sustituciones de aminoácidos en los determinantes antigénicos; de ello se deriva la imposibilidad para que puedan unirse los anticuerpos generados por infecciones o inmunizaciones previas (García y Ramos, 2006).

Estas mutaciones puntuales ocurren de manera impredecible y conducen a cambios menores en estas proteínas de superficie. Las mutaciones se van acumulando en cada ciclo de transcripción y generan variantes de estructura o función de las proteínas que expresan (García y Ramos, 2006).

Estudios realizados con el subtipo H5N13 demuestran que mutaciones puntuales en determinados genes codificadores de proteínas internas, junto con una mayor capacidad de la HA a ser procesada por diferentes proteasas del organismo y no exclusivamente por las de tracto respiratorio, se hallan asociadas a la elevada virulencia de este subtipo aviar en el hombre. Es decir, la variabilidad genética de los virus de la gripe no tan sólo influirá en la capacidad de respuesta del sistema inmunitario frente a la infección, sino que también será un factor determinante de la virulencia de determinadas cepas virales (Pumarola et al., 2002). Así mismo, se ha sugerido que los virus aviares muestran menos derivación antigénica que las cepas de mamíferos; la razón no es muy clara, pero puede ser debido a la menor presión inmunológica en aves de vida corta (Easterday et al., 1997).

2.1.7.2 Shift antigénico

Ocurre cuando una célula es infectada por dos virus de influenza A de distintas especies cuyos segmentos genómicos se reasocian durante el ensamble en una sola partícula viral, resultando en la aparición de un nuevo subtipo desconocido para el sistema inmune. Algunas de estas reasociaciones le pueden conferir al virus ventajas para infectar a otras especies (García y Ramos, 2006; Webster y Hulse, 2004).

El cambio antigénico mayor puede ocurrir mediante contagio directo entre animales (aves de corral) y humanos, pudiendo generar en este último caso una pandemia global, como las ocurridas en 1957 y 1968 las que fueron ocasionadas por nuevos subtipos de influenza A: H2N2 y H3N2, respectivamente. Estos nuevos subtipos fueron concebidos por el mecanismo del shift antigénico, reordenándose genes de un virus H2N2 aviar con un H1N1 humano (pandemia de 1957) y un H2 humano con un H3 aviar (pandemia de 1968) (Belshe R, 2005).

2.1.8 Epidemiología

2.1.8.1 Periodo de incubación

El periodo de incubación del virus de Influenza aviar varía desde pocas horas como en las aves inoculadas por vía intravenosa, 24 horas en los pollos inoculados por vía intranasal, 3 días en aves infectadas naturalmente individuales y hasta 14 días en una parvada. El periodo de incubación depende de la dosis viral, ruta de exposición, especie hospedera y la capacidad para detectar signos clínicos (Easterday *et al.*, 1997). Sin embargo este criterio puede no ser aplicable a todos los virus, especialmente si es un virus de baja patogenicidad debido a que muchas de las infecciones por virus de baja patogenicidad no causan la enfermedad clínica en todas las edades y todas las especies de aves (Swayne y Halvorson, 2008).

Para fines de control y erradicación puede ser más aplicable el término periodo infeccioso, es decir el tiempo desde la exposición o la detección del virus hasta que el virus ya no se detecta.

Mientras que para términos internacionales la Organización Mundial de Salud Animal (OIE) determina que el período de incubación del virus es de tres a cinco días, sin embargo el atestado en el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE menciona que puede ser más largo siendo el tiempo máximo de 21 días (Cordero, 2014)

2.1.8.2 Excreción viral

La excreción del virus se produce antes de la aparición de signos clínicos y puede durar más que la enfermedad aparente (Swayne y Halvorson, 2008). La excreción viral puede comenzar 1 ó 2 días después de la infección (OIE, 2009).

Se ha observado que los patos excretan virus durante un periodo tan prolongado como de 30 días, esto significa que se requerirán pocos ciclos de transmisión para conservar los virus. Parece posible que los virus permanezcan en la población de patos silvestres por un pase en aves susceptibles, aun a un nivel bajo, durante el año, hasta que la nueva estación de cría produzca un grupo nuevo de aves jóvenes susceptibles (Easterday *et al.*, 1997).

En estudios experimentales, el virus de IA se ha demostrado que se replican y se excreta de pollos individuales para un máximo de 36 días y pavos de hasta 72 días (Swayne y Halvorson, 2008)

Sin embargo, el virus IA se puede mantener durante periodos de tiempo mucho más largos como lo que ocurre en las operaciones agrícolas o puede reaparecer después de un acontecimiento estresante de manera significativa. Por ejemplo, el virus de baja patogenicidad H7N2 en Pennsylvania durante 1997-1998 fue recuperado de la mortalidad diaria de una parvada clínicamente normal 6 meses después de la recuperación de la enfermedad aguda IABP clínico y de otro parvada 8 semanas después de la enfermedad aguda IABP clínica, pero después de la inducción de la muda. Por lo tanto, una vez que un parvada se diagnostica como infectada con el virus IA, se debe considerar una fuente potencial de virus hasta que las aves sean eliminadas y la granja se limpie y desinfecte, sea nuevamente repoblada y no se hallen valores de IA (Swayne y Halvorson, 2008).

2.1.8.3 Persistencia viral

Los virus de influenza aviar son poco resistentes en el medio ambiente. Son inactivados rápidamente por los rayos ultravioletas. Cuando el virus es expuesto a altas temperaturas es poco resistente, es por ello que los brotes son más frecuentes en invierno por las bajas temperaturas y humedad (Buscaglia, 2004), pudiendo inactivarse al aplicarle 56°C/3 horas o 60°C/30 minutos (Cordero, 2014).

De acuerdo con la Organización Mundial de Salud (OMS), el virus es sensible al calor (70°C) por ello mencionan que no hay peligro por transmisión de carne de ave o sus productos si están debidamente cocinados. Por el contrario, el virus es estable a bajas temperaturas llegando a sobrevivir hasta un mes en la carne congelada o refrigerada. Por eso, es necesaria una buena higiene al preparar alimentos con carne de ave provenientes de lugares donde han ocurrido brotes de IAAP, ya que sería fácil que se diera una contaminación cruzada entre órganos afectados con el virus y los no afectados (Cordero, 2014)

Los vIA son relativamente estables sólo con valores de pH comprendidos entre 6 y 8. Por lo tanto los virus son sensibles a pH ácidos, además son sensibles a los desinfectantes viricidas tales como agentes oxidantes y disolventes de lipídicos, también se inactivan por la acción de la formalina y compuestos de yodo (SENASA Argentina, 2009)

La mayoría de los estudios sobre persistencia ambiental del virus de IA han sido llevados a cabo en América del Norte bajo condiciones climáticas frías, con los siguientes hallazgos:

- a. Los virus de IA pueden sobrevivir en las heces por al menos 35 días a 4 °C.
- b. El virus de IA puede sobrevivir en el medio ambiente del galpón por más de 5 semanas (Webster et al., 1978).
- c. Los virus de IA pueden permanecer infectivos en el agua de los lagos por más de 4 días a 22 °C y más de 30 días a 0 °C (Webster et al., 1978).
- d. El virus de patos salvajes naturalmente infectados se conserva infectante en las heces a 4°C durante 30 días y a 20°C durante 7 días

- e. Los virus de influenza aviar pueden ser aislados de aguas de lagos donde las aves acuáticas están presentes (Hinshaw et al., 1979).
- f. La acidificación del agua de bebida potencialmente contaminada hasta un pH de 2.5 o clorinación, puede ayudar a minimizar la difusión de la enfermedad (SENASA Argentina, 2009)

2.1.8.4 Transmisión viral

El vIA es expuesto al medio ambiente mediante las secreciones de las narinas, conjuntiva y cloaca. La transmisión puede darse por contacto directo de un ave infectada a otra susceptible y de forma indirecta mediante aerosoles o por exposición a fomites en donde la intervención del hombre juega un rol importante (Easterday et al., 1997). Todas estas secreciones pueden contaminar los diversos materiales y equipos empleados en la avicultura transformándose en los principales elementos diseminadores de la enfermedad (SENASA Argentina, 2009)

La transmisión también puede producirse directamente por aves en mercados, exhibiciones, crianza de traspatio, y actividades de entretenimiento como las peleas de gallos. Los mercados de aves vivas actúan como un reservorio de infección del virus ya que son un punto focal en el que se juntan y alojan muchas especies de aves (Buscaglia, 2004).

Muchas de las cepas que circulan en las aves silvestres no son patógenas o lo son moderadamente para las aves de corral. Sin embargo, puede surgir una cepa virulenta por mutación genética o reorganización de otras cepas menos virulentas (FAO, 2014). Generalmente la mayoría de fuentes inmediatas de contagio de las aves domésticas se deben al contacto directo o indirecto de las aves de corral con aves acuáticas. Las aves acuáticas pueden excretar el virus en sus heces contaminando el ambiente acuático, si el agua contaminada entra en contacto con las aves de corral pueden infectarse, siendo en algunos países el método más eficiente de transmisión del virus (Buscaglia, 2004).

En el caso de que el virus llegue a una bandada de aves puede diseminarse a través del movimiento de las aves infectadas, aunque esta propagación es irregular. Puede haber transmisión

aérea cuando las aves están en proximidad y mediante un desplazamiento adecuado del aire (FAO, 2014).

El virus de IA puede permanecer activo en los tejidos, las heces y el agua durante mucho tiempo. Pero si el virus llegase a infectar a aves domésticas podría volverse altamente contagioso, por lo que se perdería el papel de las aves silvestres en la dispersión de la enfermedad. Entonces, el virus se dispersaría por toda la zona de crianza con el simple movimiento de aves infectadas y de los equipos contaminados (Cordero, 2014).

La capacidad que tiene el virus para diseminarse es determinada por la sumatoria de secreciones respiratorias y digestivas. Los virus IAAP en aves comerciales, tienden a mostrar una transmisión más pobre que los virus de IABP debido a que en estas aves causan muertes rápidas liberando poca cantidad de virus durante el corto curso de la infección (Swayne y Pantin-Jackwood, 2008).

2.1.9 Hospedadores y reservorios

Los virus de influenza aviar se encuentran diseminados a nivel mundial mostrando un amplio rango de hospederos dentro de los cuales están incluidas las aves comerciales y las aves silvestres, observándose diferencias por especies en los grados de susceptibilidad a la enfermedad (Alexander et al., 1978).

Los virus de Influenza Aviar se han aislados de más de 105 especies de aves silvestres de 26 familias diferentes (Olsen et al., 2006). Las aves silvestres acuáticas migratorias, son los reservorios naturales de toda la constelación genética de los virus de influenza, en particular las especies de los órdenes Anseriforme (como patos, por ejemplo), Passeriforme (por ejemplo, gansos), ambas aves silvestres migratorias de lagos, y las del orden Charadriiforme (gaviotas y golondrinas marinas, entre otras), que son aves acuáticas migratorias de las costas (Dennis, 2007). En todos estos órdenes de

aves, los virus han alcanzado un estable estado de adaptación evolutiva; y por lo general, la infección no cursa con sintomatología clínica (Taubenberger y Morens, 2006).

Anseriformes y Charadriiformes se distribuyen a nivel mundial, con excepción de las regiones más áridas del mundo (Olsen et al., 2006). Patrones estacionales de infección han emergido en Anseriformes con mayor prevalencia durante el otoño e invierno (Sinnecker et al. 1982). Las aves acuáticas silvestres en cuyo tracto digestivo se multiplican estos virus, para ser expulsados con las heces y difundirse ampliamente en el medio ambiente acuático (SENASA Argentina, 2009). Los patos domésticos pueden estar infectados en forma inaparente con virus de la influenza, y contagiar a otras especies de aves domésticas.

Las aves domésticas son consideradas especies aberrantes, debido a que ocurren mutaciones en los virus como un mecanismo de adaptación para una óptima replicación y transmisión en la nueva especie (Suarez, 2000). Entre las especies aviares domésticas, los pavos han sido los más frecuentemente implicados en brotes de la enfermedad influenza, mientras que los pollos lo han sido con menor frecuencia (Easterday et al., 1997).

La gran mayoría de los virus encontrados en las aves son IABP; los virus IAAP generalmente son detectados principalmente en las aves de corral. Las aves gallináceas incluyendo pollos, pavos, codornices, y faisanes tienen a menudo graves infecciones con virus IAAP, pero los mismos virus pueden causar enfermedad de menor importancia cuando infectan patos, gansos y otras aves acuáticas. Entre los pájaros de jaula, la mayoría de las infecciones por virus de la influenza aviar se han registrado en aves passerine. Las aves psitácidas rara vez son afectadas (CFSPH, 2009).

También los patos domésticos pueden estar infectados en forma inaparente con virus de la influenza, y contagiar a otras especies de aves domésticas (SENASA Argentina, 2009), de forma general se han aislado más virus de influenza de patos que de cualquier otra especie (Easterday et al., 1997).

Un estudio de laboratorio en patos domésticos infectados por virus H5N1 en el 2004, reveló que los patos domésticos estaban eliminando mayor cantidad de virus durante un tiempo más largo y

la sin presentar signos en la mayoría de casos, siendo las cantidades excretadas de virus similares a las cantidades excretadas por los pollos visiblemente muy enfermos. Los resultados de este estudio mostraron que en comparación con los virus de la gripe aviar hiperpatogénica de brotes anteriores, los virus H5N1 aislados sobrevivieron durante más días en el ambiente. Se concluyó que los patos domésticos podrían actuar como reservorio silente del virus H5N1. Se informó que es preocupante para la salud pública que los patos puedan infectarse y difundir virus por períodos largos, incluso sin mostrar señales alarmantes, en forma de signos visibles, que alerten a tomar precauciones a los responsables sanitarios y al público en general (FAO, 2004).

El virus de la gripe aviar de patogenicidad baja ha causado epidemias de enfermedades respiratorias en visón, focas y ballenas. El virus de la influenza aviar altamente patógena H5N1 ha causado infecciones esporádicas en tigres, leopardos, gatos de casa, civetas de palmera de Owston, la mayoría de estos casos se trataba de contacto o consumo de aves infectadas. En estudios experimentales, virus de influenza aviar se ha demostrado para infectar cerdos, hurones, ratas, conejos, cobayas, ratones, gatos, visones, no humanos primates, y seres humanos (Swayne y Halvorson, 2008). Perros, cerdos y zorros han sido infectados experimentalmente con los virus aviarios H5N1 a través de exposición respiratoria. Los cerdos y los zorros también se han inoculado mediante alimentación de tejidos de aves de corral infectadas. El ganado puede ser infectado por la inoculación intranasal de los virus H5N1 aislados de gatos (CFSPH, 2010).

Es muy importante reconocer que el aislamiento de un virus a partir de una especie en particular no indica que el huésped es un huésped natural o especies reservorio. Muchas especies aviarias no son huéspedes naturales, incluyendo los pollos y pavos. Sin embargo, en los casos en que un virus de influenza aviar se adapta a estas especies, pueden convertirse en reservorio. Actualmente se sabe que los virus H5 y H7 se introducen a bandadas en su forma de baja patogenicidad. Al estar en constante circulación en las poblaciones avícolas, los virus pueden adquirir nuevas capacidades convirtiéndose en cepas altamente patógenas mediante mutaciones genéticas espontáneas. A pesar de ello, es importante mencionar que la transmisión de ave a ave dependerá mucho de la especie infectada (Cordero, 2014).

También se reconoce el papel del cerdo como hospedador intermedio, adaptador y amplificador de algunos subtipos virales para infecciones en humanos (Gaydos et al., 1977). Estudios genéticos del virus de influenza H1 y H3 en cerdos y en humanos, indican que ambos tienen un origen común aviar y una relación filogenética cercana entre ellos (Brown, 2000).

2.1.10 Manifestaciones clínico-patológicas

Los signos clínicos de infección por IA son variables y fuertemente influenciados por la virulencia de los virus involucrados, las especies infectadas, la edad, las enfermedades virales o bacterianas concurrentes y el medio ambiente (Martin et al., 2006)

El periodo de incubación es variable y depende de la dosis viral, la ruta de exposición, especie susceptible y la habilidad de detectar los signos clínicos (Buscaglia, 2004). Generalmente las infecciones por influenza en aves de corral, pueden ser asintomáticas, sin embargo puede generar disminución en la producción y diversos signos clínicos que van desde leves a graves (Swayne y Halvorson, 2008), pudiendo presentarse desde muerte súbita sin síntomas por presentarse como infección hiperaguda como lo que sucede generalmente en el caso de gallinas y pavos, hasta infecciones subclínicas como puede ser el caso de patos y de avestruces (Sanchez et al., 2011). En los patos, cuando no son asintomáticos, los signos más frecuentes son sinusitis, diarrea y aumento de la mortalidad (Berrios, 2002).

El virus de influenza aviar se puede dividir en dos grupos: los virus que causan mucointección, ya sea en el sistema respiratorio y/o el tracto entérico, y los virus que causan infecciones sistémicas. Los primeros son generalmente los de baja patogenicidad o levemente patógenos que no causan una elevada mortalidad en las aves afectadas. Por otra parte, los virus que causan infecciones sistémicas suelen causar una alta mortalidad y se conocen como altamente patógenos (Swayne y Halvorson, 2008).

Los signos de la enfermedad de la influenza aviar pueden ser compatibles con otras enfermedades, no existen signos patognomónicos (Sanchez et al., 2011). Dependiendo de la edad y tipo de ave y de los factores ambientales, la enfermedad altamente patógena puede variar desde una muerte súbita sin signos evidentes hasta una enfermedad más característica con signos respiratorios, lagrimeo excesivo, sinusitis, edema de la cabeza, cianosis de la piel y diarrea. Sin embargo, ninguno de estos signos puede considerarse patognomónico (Swayne y Halvorson, 2008).

2.1.10.1. Signos clínicos y lesiones causados por vIABP

En aves silvestres, la mayoría de infecciones producidas por virus de baja patogenicidad no causa signos clínicos (Laudert et. Al., 1993. En pollos y pavos los signos pueden ser inaparentes o presentarse como una enfermedad respiratoria leve y en ocasiones grave (Swayne y Halvorson, 2008).

Comúnmente pueden confundirse con laringotraqueitis infecciosa u otras infecciones de las vías respiratorias (Martin et al., 2006, Swayne y Halvorson, 2008). Cuando se presentan los signos clínicos se inician con estornudos, progresando a disnea asociada a inflamación de senos infraorbitales y conjuntivitis, habrá una completa pérdida de apetito, condición febril, plumas erizadas y marcada depresión y a nivel del tracto digestivo pueden ocurrir leves diarreas, siendo menos frecuente la sintomatología a nivel del tracto urinario y reproductivo (Capua et al., 2000).

En las grandes parvadas existen pequeños aumentos en la mortalidad diaria, se puede observar como el virus se propaga a través de la parvada. En algunas situaciones, la infección con virus de baja patogenicidad puede dar lugar a una mortalidad elevada, generalmente en asociación con agentes patógenos concurrentes o secundarios y/o pobres condiciones ambientales (Swayne y Halvorson, 2008).

De acuerdo a Buscaglia, (2004) y Martin et al., (2006) en aves domésticas sobretodo en pollos y pavos, la enfermedad de alta, mediana y baja patogenicidad puede presentar los siguientes signos clínicos:

- a) Morbilidad y mortalidad del 0 al 100% (dentro de las 24 a 48 horas ó hasta una semana) sobretodo en los cuadros altamente patógenos.
- b) Disminución en la producción de huevos (perdida de la pigmentación, huevos deformes ó fragilidad de la cáscara).
- c) Problemas respiratorios (sinusitis, tos, estornudos, estertores y lagrimeo).
- d) Edema peri orbital, de la cara, cresta, y barbillas cianóticas (especialmente en pavos).
- e) Depresión (hacinamiento, inactividad).
- f) Anorexia y emaciación.
- g) Desordenes nerviosos.
- h) Diarreas (verdosas ó blancas en algunas aves).
- i) Equimosis en zancas y patas.

En raras ocasiones, los virus de baja patogenicidad pueden causar lesiones específicas en los órganos internos, ya sea a través de la infección directa u otras causas indirectas. En la necropsia, las lesiones más resaltantes se evidencian a nivel respiratorio (Capua *et al.*, 2000), los senos se caracterizan por inflamaciones catarrales, serofibrinosa, mucopurulenta o caseosa. Se han encontrado casos en los que la mucosa traqueal puede encontrarse edematosa con exudados que varían de serosa a caseosa y los sacos aéreos engrosados con exudado fibrinoso a caseoso (Martin *et al.*, 2006).

Además de cuadros neumónicos, los virus IABP a pueden producir pancreatitis asociada a necrosis de las células acinares en aves comerciales (Capua *et al.*, 2000), y exudados en los oviductos en aves ponedoras (Easterday *et al.* 1997).

Sin embargo en estudios realizados experimentalmente en patos ánades reales, los virus de IABP suprimieron la función de la célula T y causaron depresión de una semana en la producción de huevos (Laudert *et. Al.*, 1993)

2.1.10.2 Signos clínicos y lesiones causados por vIAAP

Los signos clínicos reflejan la replicación viral y el daño que ello produce en múltiples órganos viscerales, cardiovasculares y sistema nervioso, en la mayoría de casos, en pollos y pavos, la

enfermedad es fulminante sin observarse sintomatología previa (100% de mortalidad entre las 48-72 horas), no obstante si la enfermedad es menos fulminante, las aves sobrevivientes a los 3 a 7 días, manifiestan desórdenes neurológicos con incoordinación y temores de cabeza y cuello, tortícolis y opistótonos antes de la muerte (Capua *et al.*, 2000).

Se han reportado que las tasas generales de mortalidad de casos sobreagudos son cercanas al 100% (Martin *et al.*, 2006)

En los casos sobreagudos que incluyen muerte súbita, los signos clínicos pueden no ser visto y muertes se producen horas después de la aparición de la depresión. En los casos agudos, las mortalidades pueden ocurrir 24 horas después de los primeros signos de la enfermedad, aunque más frecuentemente dentro de las 48 horas. En otros casos, las mortalidades pueden retrasarse hasta una semana pudiendo observarse diversos signos clínicos (Martin *et al.*, 2006).

En gallináceas, los virus IAAP producen una variedad de lesiones edematosas, hemorrágicas y necróticas en órganos viscerales y piel, sin embargo en casos donde la muerte es hiperaguda no hay lesiones macroscópicas significativas (Capua *et al.*, 2000).

Las lesiones a la histopatología cursan, con inflamación y necrosis multisistémica. Los órganos afectados son cerebro, corazón, pulmones, páncreas y órganos linfoides primarios y secundarios generalmente. Las lesiones en el cerebro y corazón se encuentran asociadas a la presencia de proteínas virales en neuronas y miocitos, respectivamente (Capua *et al.*, 2000).

2.1.11 Patogénesis e inmunidad

El virus ingresa al huésped por inhalación o digestión de los viriones de IA debido a la presencia de la enzima tripsina en las células respiratorias e intestinales, que permiten el clivaje de la hemaglutinina de superficie. Los virus replicados se liberan en los exudados nasales y heces de las aves infectadas (Swayne y Halvorson, 2008).

En el caso de los virus de baja patogenicidad, la muerte principalmente al daño respiratorio acompañado por infecciones bacterianas secundarias. Solo en algunas excepciones los virus de baja

patogenicidad han logrado diseminarse sistémicamente, causando daños en túbulo renales, epitelio pancreático acinar y otros órganos que contienen la enzima tripsina en sus células epiteliales (Swayne y Halvorson, 2008).

Por otro lado, los virus de alta patogenicidad invaden la submucosa y los capilares para replicarse en las células endoteliales y diseminarse vía los sistemas vasculares o linfáticos, llegando a una variedad de órganos, los cuales presentan de manera ubicua a la enzima furina, responsable de la replicación pantrópica (Swayne y Halvorson, 2008).

Los daños producidos por los vIA responden a 4 procesos: daño directo por replicación viral en las células, tejidos y órganos infectados; efectos indirectos por la producción de mediadores celulares tales como las citoquinas, isquemia por trombosis vascular y colapso cardiovascular por coagulopatía o coagulación intravascular diseminada (Swayne y Halvorson, 2008).

La inmunidad en las aves ante una infección natural incluye una respuesta por anticuerpos (inmunoglobulina A) (Suarez y Shultz ,2000). La respuesta sistémica en pollos y pavos es similar a otras especies con la producción de inmunoglobulinas M a los 5 días post infección; y la producción de inmunoglobulina Y es detectada en un período un poco más largo que el anterior (Suarez y Shultz ,2000).

En la respuesta humoral, los anticuerpos neutralizantes son producidos contra las proteínas superficiales HA, NA y M2; actuando contra la infección y la enfermedad (Tollis y Triani, 2002). La variación en la secuencia de aminoácidos de la HA y NA resultan en diferencias en su antigenicidad, por ejemplo, los anticuerpos contra el subtipo H1 sólo neutralizarán virus H1 y no otro virus de influenza (Suarez, 2008).

Los anticuerpos inducidos por la M2 aunque no son neutralizantes reducen la penetración viral y por tanto pueden producir protección parcial (Noda, 2006).

En los test de diagnóstico es de utilidad la respuesta de anticuerpos a las proteínas internas como NP y proteínas de la matriz, porque tienen una alta secuencia de conservación y permiten la detección de anticuerpos de aves infectadas con cualquier subtipo viral (Suarez y Shultz, 2000).

2.1.12 Diagnóstico

2.1.12.1 Diagnóstico diferencial

El cuadro clínico de la enfermedad puede ser común a otras enfermedades que cursen con signos respiratorios. El diagnóstico diferencial va a depender de la patogenicidad del virus de influenza. Así, los cuadros de baja patogenicidad pueden ser confundidos con otras enfermedades frecuentes que causen signos entéricos o respiratorios. Mientras que para el virus de IAAP, deben considerarse principalmente enfermedades que causen elevada mortalidad súbita como: enfermedad de Newcastle, Laringotraqueítis infecciosa, Plaga del pato, intoxicaciones agudas (Martin et al., 2006).

2.1.12.2 Toma de muestras y conservación

Para que el diagnóstico de laboratorio sea fiable es muy importante tanto la técnica y los reactivos utilizados como la experiencia del operario, pero principalmente de las muestras correctas, tomadas y conservadas adecuadamente (Sanchez et al, 2007).

En las aves vivas se deben tomar necesariamente hisopos traqueales/bucofaríngeos e hisopos cloacales, se pueden recolectar heces frescas que no hayan sido expuestas a contaminación, porque la mayoría de virus se replican en las vías respiratorias y tractos intestinales (Swayne et al., 2008). En cualquier caso, con el fin de asegurar el aislamiento del virus, se recomienda que al menos se disponga de un gramo de heces, bien sean heces directamente o tomadas con el hisopo (Sanchez et al, 2007). Los hisopos se colocan en un transporte de medio estéril que contiene altos niveles de antibióticos para reducir el crecimiento bacteriano (Swayne et al., 2008).

En el caso de aves muertas y dependiendo del tiempo transcurrido desde la muerte y el estado del cadáver, se deben tomar al menos las mismas muestras que en el caso de los animales vivos, hisopos traqueales/bucofaríngeos e hisopos cloacales o contenido intestinal también se pueden tomar muestras de tráquea, pulmón, sacos aéreos, intestino, bazo, riñón, cerebro, hígado y corazón (Sanchez et al, 2007) siendo recogidas y procesadas por separado o en pools. En el caso de los intestinos, siempre deben ser recogidos y embalados al último y por separado para evitar la contaminación bacteriana (Martin et al., 2006)

En el caso de que el envío se realice en menos de 48 horas, las muestras deben ser conservadas a 4° C desde su obtención hasta la llegada al laboratorio. También es importante que los hisopos se transporten en posición vertical con el fin de que el algodón siempre vaya incluido en el PBS. En el caso de que no sea posible garantizar el transporte al laboratorio en menos de 48 horas desde la toma, las muestras se deben congelar a -70° C y ser transportadas sin romper la cadena de frío (Sanchez et al, 2007).

2.1.12.3 Aislamiento e identificación viral

El método estándar de referencia para diagnosticar al virus de IA es el aislamiento viral que se realiza mediante el procesamiento de muestras provenientes de hisopado cloacal, traqueal o de otros tejidos (Spackman et al., 2008).

El sistema utilizado generalmente para aislamiento del virus de la IA es mediante la inoculación de huevos embrionados de pollos SPF a los 9 – 11 días de edad, aunque existe otros sistemas que se usan como cultivos de células a menudo de origen aviar, líneas celulares de riñón canino MadinDarby entre otras líneas celulares (Spackman et al., 2008).

Aunque el aislamiento del virus en embriones en pollos es caro y puede tomar varias pocas semanas es ampliamente usado debido a que es el sistema más sensible para detectar los virus viables de IA (Spackman et al., 2009).

Si bien tiene una alta sensibilidad no sucede lo mismo con su especificidad por lo que numerosos agentes pueden replicarse en los embriones de pollo, incluyendo los paramixovirus, por lo cual necesita ser confirmada mediante otras pruebas, para lograr esto los fluidos alantoideos de los huevos se recolectan para la realización de pruebas de HA (Spackman et al., 2009) para detectar su actividad hemaglutinante lo cual indica una alta probabilidad de la presencia de vIA tipo A o paramixovirus aviare. Si los fluidos resultan negativos debe ser nuevamente inoculados (Easterday et. al, 1997).

El líquido alantoideo positivo para hemaglutinación se utiliza para la identificación del virus. Es importante determinar si la actividad hemaglutinante detectada en el fluido alantoideo se debe a virus de la influenza u otros virus hemaglutinantes, tales como paramixovirus como el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). Por tanto, el aislamiento se comprueba mediante pruebas de IH contra antisuero de enfermedad de Newcastle. Si es negativo, entonces el virus se prueba para la posible presencia de NP para establecer que existe el virus de influenza A (Easterday et. al, 1997).

La proteína NP tipo-específica (nucleoproteína) o la matriz proteínica pueden ser detectadas por la prueba de inmunodifusión doble, la prueba de hemólisis radial simple o inmunoensayo de captura de antígeno comercial. Los anticuerpos monoclonales que reaccionan con las nucleoproteína o las proteínas de la matriz han demostrado ser útiles en la identificación de estos antígenos en ELISA (Swayne et al., 2008).

Para realizar el subtipado del virus, se debe poseer antisueros monoespecíficos preparados frente a los antígenos aislados de cada uno de los 16 subtipos de hemaglutinina (H1- H16) y 9 subtipos de neuraminidasa (N1-N9) de los virus de gripe tipo A, los cuales pueden utilizarse en ensayos de inmunodifusión. Alternativamente, el virus recién aislado puede examinarse mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación y de la neuraminidasa frente a una serie de anticuerpos policlonales contra un amplio rango de cepas de todos los subtipos (OIE, 2005).

La presencia de virus influenza en muestras biológicas o ambientales con fines de screening rápido se pueden detectar mediante técnicas eficacia, sensibilidad y factibilidad variables, como la

inmunofluorescencia directa en cortes de tejidos, los ELISA de detección de antígeno, y los «pen-site test» o pruebas factibles «a pie de granja» mediante kits fácilmente transportables, basados en técnicas inmunoenzimáticas o inmunocromatográficas. Sin embargo, la técnica más versátil, sensible y específica para el «screening» de virus de la IA es RT-PCR, que es por ello la prueba recomendada para este fin en el manual de la OIE (Sánchez et al, 2007).

2.1.12.4 Inmunodifusión en Agar Gel (AGID)

El principio de esta prueba es observar la reacción de inmunoprecipitación de los antígenos del virus de IA y anticuerpos frente a éstos después de la difusión en agar gel (Swayne *et al.*, 1998), demostrando la presencia de los antígenos de la nucleocápside o los de la matriz del virus debido a que todos los virus de la gripe poseen una nucleocápside y antígenos de la matriz similares antigénicamente (OIE, 2005). Para la realización del AGID, los antígenos pueden prepararse concentrando el virus a partir del líquido alantoideo de embriones infectados que contiene tanto proteína NP como proteína matriz.

El AGID detecta anticuerpos en gallinas y pavos, pero no es tan efectivo para el diagnóstico de influenza aviar en otras especies, especialmente los patos, debido a que no todas las especies aviares producen anticuerpos precipitantes (Sánchez et al, 2007).

La sensibilidad de esta prueba es moderada, puede detectar anticuerpos post-infección más tempranamente (5 días post infección) que otras pruebas debido a que detecta Ig M en vez de Ig G, el cual puede seguir siendo detectado por varias semanas o meses post infección. Sin embargo, la respuesta y duración del anticuerpo este influenciado por el huésped y el subtipo viral (Swayne et al., 1998).

Si bien la prueba de AGID es barata y simple de ejecutar, la preparación de los reactivos con aseguramiento de la calidad adecuada es cara y consume mucho tiempo. Además la prueba de AGID requiere de una moderada habilidad para interpretar los resultados de las pruebas (Spackman et al., 2008).

2.1.12.5 Kits comerciales de Inmunoensayos

Esta prueba detecta anticuerpos contra las proteínas virales de la nucleocápside (NP y M) (Swayne et al., 1998). Diversos kits comerciales de ELISA están disponibles para la detección de anticuerpos tipo específicos contra el virus de IA en suero, plasma y yema de huevo de pollos. La prueba de ELISA puede ser más sensible que la prueba de AGID, pero puede dar resultados falsos positivos debido a la pobre especificidad. Las pruebas ELISA positivas son confirmadas rutinariamente por la prueba de AGID (Swayne y Halvorson, 2008).

Las ventajas de esta prueba es que puede ser empleada para procesar gran cantidad de muestras en forma automática, sin embargo los resultados deben ser interpretados en muestras de lotes y no en forma individual; también se pueden validar kits comerciales para propósitos específicos (OIE, 2009). Se ha descrito una ELISA de captura de antígeno para detectar antígenos virales en muestras por coloración con inmunoperoxidasa, en el cual se emplean anticuerpos monoclonales. Se encuentran disponibles como un sistema comercial. Su principal ventaja es que es una prueba rápida, mientras que sus desventajas son su baja sensibilidad y que no se consigue el subtipo del virus (OIE, 2009).

2.1.12.6 Técnicas moleculares

En recientes años la aplicación de métodos moleculares para la detección del ácido nucleico viral ha comenzado a ser una importante medida para la detección de los virus de IA. La RT-PCR ó RT-PCR tr, usa una nucleoproteína específica o cebador conservado específico para las nucleoproteínas o la matriz (Rose et al., 2007). Las pruebas de RT-PCR en tiempo real y RT-PCR convencional también han demostrado la presencia de subtipos virales H5 ó H7 usando cebadores específico (Munchet *al.*, 2001).

La técnica del PCR consiste en la amplificación de un segmento específico del genoma del virus. Por ser un virus ARN, debe convertirse previamente en ADN con la ayuda de la enzima transcriptasa reversa. Al finalizarse la reacción se debe visualizar si se amplificó el segmento

deseado, en el caso de PCR en tiempo real las curvas de amplificación son visualizadas en la pantalla de una computadora (Spackman *et al.*, 2002)

El RT-PCR en tiempo real es ampliamente usado porque es la más rápida prueba molecular, los resultados pueden ser obtenidos en menos de tres horas; es más específico y el riesgo de contaminación cruzada es reducida (Munch *et al.*, 2001).

El PCR es el procedimiento tamiz más sensible para detección viral; comparado con el aislamiento viral su sensibilidad puede llegar a un 96 a 97%; (Swayne y Halvorson, 2003); así mismo, los métodos basados en PCR son los de más alta sensibilidad comparado con la Elisa de captura de antígeno para la detección de virus en infecciones de campo y experimentales. Sin embargo, el uso de controles eficientes y confiables, y la falta de sensibilidad apropiada en muestras de campo son las limitantes para su aplicación (Suárez *et al.*, 2007; Spackman *et al.*, 2008).

2.1.13 Prevención y control

La prevención, manejo y erradicación son tres diferentes enfoques en el control de la IA (Swayne, 2008). La bioseguridad es fundamental para el control de esta enfermedad. El manejo de lotes “todo adentro-todo afuera” supone la prevención de la difusión dentro de lotes de aves. Por otra parte, todos los equipos, materiales y personal deben ser desinfectados adecuadamente al entrar y salir de las granjas (Buscaglia, 2004).

Una medida básica para la prevención del vIA es la separación de aves susceptibles de aves infectadas y de sus secreciones y excreciones (Easterday *et al.*, 2000.) Es importante realizar estudios en los sitios en el lugar donde las aves migratorias se reproducen, se alimentan, y conviven con otras especies migratorias o locales. Es importante observar si existe contacto con especies domésticas o no, para determinar el riesgo de transmisión, así como la importancia de hacer vigilancia epidemiológica activa para intentar realizar aislamientos virales en estas especies que permitan contribuir en el control de la IA (Uhart, 2006).

Teniendo conocimiento de que hay un reservorio del virus en las aves silvestres, todo esfuerzo debe estar concentrado en prevenir el contacto directo entre avicultura de traspatio y aves silvestres acuáticas, además el estiércol debe tratarse antes de ser utilizado en terrenos de cultivo (Munir, 2009).

Otra de las medidas para prevenir y controlar la IA en aves de traspatio está enfocada en la educación de las comunidades rurales de los países en desarrollo (FAO, 2004). Por ende la información debe estar dirigida en divulgar las características de la enfermedad y brindar asesoría en medidas de bioseguridad con la finalidad de que los pequeños avicultores reconozcan la enfermedad en el campo y utilicen medidas de bioseguridad simples y de bajo costo (FAO, 2006).

La vigilancia contra la IA demanda la organización de un sistema estructurado, que involucre a todos los productores en cualquier escala, a fin de aumentar la sensibilidad para la alerta precoz y el inicio inmediato de las acciones de respuesta. Por consiguiente en los sistemas de producción intensiva, el monitoreo continuo de los indicadores bioproductivos de las aves y de los factores que en ellos influyen deben constituir un objetivo del sistema de vigilancia (vigilancia pasiva), para que ante alguna desviación de sus patrones normales, se dirijan acciones al diagnóstico de sus causas, y mediante el empleo combinado de técnicas serológicas y virológicas aumentar la detectabilidad de una probable infección (Zamora *et al.*,2008).

Además en los sistemas de producción familiar la detección de síntomas clínicos y mortalidades anormales deben ser interpretados como sospecha de la enfermedad, esa detección debe basarse en la relación estrecha y rutinaria con los productores a fin de detectar eventos anormales (Zamora *et al.*,2008).

La vacunación contra los virus de IAAP en la avicultura de traspatio es difícil de implementar y mantener a largo plazo. Esto se debe a que la mayoría de países en desarrollo afectados por el subtipo H5N1 no tienen los recursos necesarios para considerar a esta medida como una opción viable, por lo cual, es un desafío la protección vacunal en este tipo de crianza (Munir, 2009).

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El presente estudio se realizó con muestras obtenidas mediante hisopado cloacal de patos procedentes de crianza de traspatio en las provincias de Huaral y Huaura. Estas dos provincias se ubican en la zona costa del departamento de Lima, en donde es conocida la gran afluencia de patos de crianza casera debido a la importancia de esta especie dentro de la gastronomía de la zona, lo que asegura que el muestreo se realicé en su totalidad.

Así, según datos no publicados del SENASA, la población total aproximada de patos en ambas provincias es de 45 521 patos y 3080 predios. Además, de la concentración de aves de crianza casera, existen planteles industriales de aves, lagunas e irrigaciones en donde habitan especies de aves silvestres.

La provincia de Huaral está entre las latitudes 11° 90' y 11°42' y longitudes 76° 20' y 77° 30', su temperatura media anual es de 19.4°C y está conformada por doce distritos: Huaral, Chancay, Aucallama, Ihuari, Sumbilca, San Miguel de Acos, Lampian, Atavillos Bajo, Atavillos Alto, 27 de Noviembre, Pacaraos y Santa Cruz de Andamarca (Municipalidad Provincial de Huaral, 2013). Mientras que la provincia de Huaura (latitud 11°06'y longitud 77°36') presenta una temperatura media anual de 19.1°C, y al igual que Huaral, cuenta con doce distritos: Ambar,

Carquín, Leoncio Prado, Paccho, Checras, Santa Leonor, Huacho, Hualmay, Huaura, Santa María, Sayán y Végueta (Municipalidad Provincial de Huara, 2013).

Según la información obtenida durante la ejecución de programas de vacunación en patos por PRONASA del SENASA (J. Pastor, datos no publicados), en la provincia de Huaral, solo se tiene información registrada de la población de patos domésticos en los distritos de Huaral, Chancay y Aucallama, mientras que en la provincia de Huaura han registrado una considerable cantidad de patos en los distritos de Huaura, Sayán, Santa María, Végueta Huacho y Hualmay (Cuadro 1), por lo cual se decidió realizar el muestreo en los distritos señalados.

Cuadro 1. Número de predios de patos por distritos en las provincias de Huaral y Huaura. Datos de programas de vacunación en patos por PRONASA del SENASA

Provincia	Distrito	N° predios de patos*
Huaral	Aucallama	405
Huaral	Chancay	535
Huaral	Huaral	736
Huaura	Huacho	79
Huaura	Hualmay	40
Huaura	Huaura	436
Huaura	Santa María	304
Huaura	Sayán	337
Huaura	Vegueta	208
Total		3080

Fuente: J. Pastor (SENASA, datos no publicados)

Los lugares de muestreo, dentro de los distritos, fueron escogidos al azar, dándose prioridad a las zonas cercanas a humedales y a las zonas más rurales, generalmente asentamientos humanos debido a la mayor concentración de patos de crianza casera y en ocasiones crianza de otros animales como cerdos y otras especies aviares.

3.2. Animales muestreados

Se muestrearon patos domésticos criados en el traspatio de viviendas ubicadas en las provincias de Huaral y Huaura. No se consideraron variables cualitativas como edad o sexo.

En nuestro país se han realizado estudios que evidencian la presencia del virus de Influenza Aviar en aves silvestres, cumpliendo un papel importante en la diseminación del virus, siendo importante realizar estudios en las aves domésticas.

El motivo de utilizar patos se sustenta en que estas aves pertenecientes a la especie *Anas*, género *Anatidae*, del orden *Anseriformes* son las aves más susceptibles a la infección natural por el virus de Influenza Aviar. Los patos domésticos son más accesibles de manejar que los patos silvestres. Según una alerta lanzada por la FAO y la OIE, los patos domésticos son comúnmente portadores silenciosos del virus por ello tienen un papel clave en la transmisión horizontal del virus a otras aves e incluso a los humanos.

3.3. Materiales y equipos

3.3.1. Materiales y equipos para la colección de muestras

- a) Tubos UTM de 2.5 ml con tapa rosca
- b) Hisopos estériles
- c) Caja térmica y gradillas
- d) Geles refrigerantes y termómetro digital
- e) Guantes estériles de látex
- f) Alcohol en gel
- g) Bolsas plásticas rojas de riesgo biológico.

3.3.2. Materiales y equipos para las pruebas de diagnóstico

- a) Cámara de bioseguridad con flujo laminar de nivel tipo 2
- b) Guantes de látex y mascarillas estériles
- c) Agua destilada
- d) Centrífuga con fuerza de 2000 x g
- e) Vórtex
- f) Micropipetas graduadas y tips estériles
- g) Crivoviales estériles de 2ml

- h) Algodón, yodo y alcohol
- i) Punzón, tijeras y pinzas estériles
- j) Jeringas de 1 ml tipo insulina
- k) Huevos embrionados SPF de 9 a 11 días de edad
- l) Ovoscopio
- m) Glóbulos rojos de ave (lavados con PBS)
- n) Solución salina buferada (PBS)
- o) Placa laminada para la prueba de HA
- p) Placa microtitulada con 96 pozos para la prueba de IH
- q) Kit de diagnóstico rápido de ELISA
- r) Refrigerador (4°C) y congelador (-70°C)

3.4. Método de evaluación

3.4.1. Tamaño de muestra

Para el presente estudio trabajó con un total de 300 muestras de heces frescas para cada provincia. Este número se obtuvo asumiendo que la prevalencia de detección viral para esta especie es de al menos 1%, en base a estudios anteriores en otras aves. El tamaño de la muestra se determinó al aplicar el modelo teórico de la distribución binomial (González, 1986):

$$n = \frac{\text{Log } \alpha}{\text{Log } (1-p)}$$

Donde:

- n=número de muestras
- p=prevalencia crítica del 0.5%
- q=1-p
- α = probabilidad de cero éxitos (1-IC) de 0.05

Reemplazando: n = 298.07

El tamaño muestral mínimo (n=298) fue establecido para cada provincia (Huaral y Huaura). Por otra parte, el tamaño de la muestra final para cada distrito se determinó de manera proporcional a la población aproximada de predios según datos no publicados de programas de vacunación en patos por PRONASA del SENASA. Sin embargo el tamaño de muestra final para cada distrito dependió de la participación y del acceso permitido por los criadores (Cuadro 2 y 3).

Cuadro 2. Distribución del tamaño de muestra en relación a la población de patos en las provincias de Huaral y sus respectivos distritos.

Provincia	Distrito	N° predios de patos*	N° de muestra esperado	N° de muestra real
Huaral	Aucallama	405	73	78
	Chancay	535	96	98
	Huaral	736	131	100
	27 de Noviembre	No registrado	-	24
Total		1676	300	300

Cuadro 3. Distribución del tamaño de muestra en relación a la población de patos en las provincias de Huaura y sus respectivos distritos.

Provincia	Distrito	N° predios de patos*	N° de muestra esperado	N° de muestra real
Huaura	Huacho	79	17	24
	Hualmay	40	9	10
	Huaura	436	93	82
	Santa María	304	64	43
	Sayán	337	73	101
	Vegueta	208	44	40
Total		1404	300	300

3.4.2. Recolección de las muestras

Previamente a la visita a cada distrito, se prepararon los materiales colocando los tubos UTM en cajas termoaislantes con geles refrigerantes en su interior. Se utilizó un termómetro para controlar que la temperatura del material se mantenga a una temperatura de refrigeración.

En cada distrito se ubicaron las zonas con mayor población de patos de crianza de traspatio, posteriormente con el permiso de sus propietarios se recolectaron muestras de hisopado cloacal de

patos escogidos al azar. Las aves analizadas fueron sujetadas cuidadosamente a fin de exponer su cloaca para la inserción de un hisopo estéril en su conducto cloacal, se frotó la pared del conducto procurando arrastrar la superficie mucosa y así asegurar que el hisopo contenga restos fecales.

Para evitar una posible contaminación de la muestra, se colocó prontamente el hisopo dentro del tubo UTM homogenizando la muestra con el medio de transporte viral. Se cortó la parte distal del hisopo de tal forma que cupiera en el interior del tubo para poder cerrarlo herméticamente. Los tubos fueron rotulados y colocados en forma ordenada en una gradilla al interior de la caja térmica junto con el gel refrigerante para conservar la temperatura de refrigeración. Al concluir el día, todas las muestras eran transportadas al Laboratorio de Patología Aviar de la UNMSM en donde se conservaron en congelación.

Con la finalidad de ampliar la dispersión de la muestra se evitaron muestrear aves de viviendas contiguas. Dentro de cada predio, se registró la cantidad de patos, la presencia o ausencia de otras aves u otras especies animales y la presencia o ausencia de manifestaciones clínicas de alguna enfermedad con el objetivo de evaluar la relación de estos datos con los resultados del estudio; asimismo se anotó la ubicación de la vivienda y nombre de los propietarios para mantener registros en caso de diagnosticar la presencia del vIA y ser necesaria su notificación.

3.4.3 Procesamiento de las muestras

3.4.3.1 Aislamiento viral

El aislamiento viral se realizó mediante la inoculación de huevos embrionados SPF de 9 – 11 días de edad vía cavidad alantoidea, haciendo uso de guantes, mascarillas y mandiles descartables. La inoculación de los huevos embrionados se realizó al día siguiente del muestro, mientras tanto las muestras fueron mantenidas bajo refrigeración, registrándose las mismas en una base de datos. El aislamiento viral se realizó en un área de acceso restringido ubicado dentro el Laboratorio de Patología Aviar de la UNMSM, el cual cuenta con una cabina de bioseguridad de tipo 2.

Para el aislamiento viral se llevaron a cabo los siguientes pasos:

a. Preparación del inóculo:

1. Los tubos UTM se descongelaron a 37°C en baño María.
2. Con la ayuda de un vórtex se homogenizaron las muestras por 20 segundos, se colocaron en gradillas y se llevaron a la cámara de bioseguridad.
3. Se colectó asépticamente 250 ul de sobrenadante de cada tubo UTM formando pooles de 10 muestras cada uno, colectando un total 2,5 ml por pool.
4. Los viales de pooles fueron centrifugados a 1000 g por 10 minutos, se retiraron los viales cuidadosamente y se vació el sobrenadante en otro vial correctamente rotulado.
5. Se aplicó una solución de antibiótico en un volumen de 0.05 ml de penicilina-estreptomicina al 20% por ml de muestra y se incubaron por 2 horas en refrigeración
6. Se recolectó 1ml de cada pool en jeringas estériles para su posterior inoculación.

b. Preparación de los embriones:

1. Se determinó la viabilidad de los huevos embrionados mediante un ovoscopio.
2. Se identificó el punto de inoculación marcando el área menos vascularizada, precisamente a 2 mm por encima del borde de la cámara de aire, en el lado opuesto a la ubicación del embrión.
3. Cada huevo se rotuló con el número de pool y la fecha de inoculación.

c. Inoculación de huevos embrionados

1. La zona de inoculación del huevo SPF fue desinfectada con alcohol yodado, posteriormente se perforó la cáscara con la ayuda de un punzón.
2. Se inyectó 0.2 ml del inóculo, en el saco alantoideo del embrión, empleándose 5 huevos embrionados por cada grupo formado.
3. Los orificios se sellaron con parafina y fueron llevados a la incubadora por 6 días a 37°C
4. La viabilidad de los embriones se revisó diariamente con un ovoscopio. Los huevos con embriones muertos fueron mantenidos en refrigeración, registrándose la mortalidad y el tiempo de muerte transcurrido tras la inoculación.

5. Al sexto día, todos los embriones viables fueron llevados a refrigeración para su sacrificio.

3.4.3.2 Prueba diagnóstica

Un día después de haber llevado los huevos SPF a refrigeración se realizó la cosecha del fluido alantoideo y se analizó su capacidad hemaglutinante con eritrocitos de pavo al 0.7%. Brevemente el procedimiento se describe de la siguiente forma:

1. Con una tijera se removió la cáscara que conforma la cámara de aire.
2. Con la ayuda de una pipeta se extrajo 45 ul de líquido alantoideo de cada embrión y se colocó en una placa de vidrio dividida en cuadrantes para enfrentarla con otros 45 ul de glóbulos rojos al 0.7%.
3. Se homogenizó la muestra realizando movimientos circulares de la placa y se esperó unos minutos para observar si existía hemaglutinación.
4. Las muestras que mostraron capacidad hemaglutinante fueron analizadas mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación con suero anti vENC Newcastle para descartar Paramixovirus aviar tipo I.
5. Las muestras con HA positivas fueron sometidas a la prueba de diagnóstico rápido mediante el uso de un kit comercial de ELISA de captura de antígeno (QuickVue®Influenza A+B), que es una prueba de inmunoanálisis de flujo lateral, que utiliza anticuerpos monoclonales de alta sensibilidad y especificidad para los antígenos de la influenza A y B, descartando la presencia del virus de Influenza Aviar.
6. A las muestras con hemaglutinación negativa, se les realizó un segundo pasaje en huevos SPF repitiendo el mismo procedimiento mencionado anteriormente.
7. Todos los restos de materiales biológicos y no biológicos utilizados fueron autoclavados y posteriormente desechados.

3.4.3.3 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron sometidos a la técnica de evaluación de riesgo por simulación de Monte Carlo, las proporciones se expresaron con un intervalo de confianza al 95%. El cálculo de los intervalos se obtuvo al emplearse simulaciones estocásticas basadas en la distribución beta, la cual está implementada en el paquete estadístico @Risk en el entorno de una planilla electrónica Excel XP

IV.- RESULTADOS

De los 60 pooles analizados, 10 fueron positivos a la prueba de hemaglutinación; si bien esta prueba es eficiente para detectar virus hemaglutinantes no es específica para confirmar la presencia del virus de influenza aviar debido a que existen otros virus que pueden hemaglutinar, entre ellos los paramixovirus tipo 1 y el ataadenovirus 3.

El resultado del estudio fue que el 100% (600/600) de las muestras analizadas provenientes de hisopados cloacales de patos de traspatio de las provincias de Huaral (Chancay, Aucallama y Huaral) y Huaura (Huaura, Sayán, Santa María, Vegueta y Hualmay), fueron negativas al virus de Influenza Aviar dando una prevalencia determinística de 0%.

En el cuadro 4 se presentan los resultados del presente estudio detallando el número de muestras recolectadas y el número de pools positivos a HA por provincias y distritos. Como se puede observar 10 pools de 10 muestras de hisopado cloacal fueron HA positivas, según nuestros resultados, los pools de muestras que tuvieron hemaglutinación positiva procedieron de los distritos de Chancay, Vegueta, Aucallama, Sayán, Huaral y Huaura.

Cuadro 4. Resultados obtenidos mediante la prueba de hemaglutinación (pooles positivos) en patos de traspatio en las provincias de Huaral y Huaura

Provincia	Distrito	Muestras recolectadas	N° Pool HA+
Huaral	Aucallama	78	1
Huaral	Chancay	98	4
Huaral	Huaral	100	1
Huaral	27 de Noviembre	24	0
Huaura	Huacho	24	0
Huaura	Hualmay	10	0
Huaura	Huaura	82	1
Huaura	Santa María	43	0
Huaura	Sayán	101	1
Huaura	Vegueta	40	2
Total		600	10

Al realizarse la prueba de Inhibición de la hemaglutinación para el descarte del virus de Newcastle, se determinó que ninguna muestra fue positiva a este virus por lo cual existía la posibilidad de que se tratara del vIA. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante el kit de Elisa de captura de antígeno (QuickVue® Influenza test) arrojaron resultados negativos al vIA (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados según las provincias evaluadas mediante las pruebas de Hemaglutinación (HA), Inhibición de la hemaglutinación (HI) y diagnóstico rápido de captura de antígeno (QuickVue)

Provincia	Muestras recolectadas	N° Pool HA+	N° Pool HI+	N° Pool QuickVue+
Huaral	300	6	0	0
Huaura	300	4	0	0
Total	600	10	0	0

+ número de pooles positivos

Al evaluarse el riesgo mediante la simulación de Monte Carlo (programa @risk) en el entorno de una planilla Excel XP se determinó que en caso de presentarse la enfermedad de la IA, se presentaría actualmente con una prevalencia estocástica máxima de 0.33% con un intervalo de confianza de 0.00% a 1.5% (Figura 5).

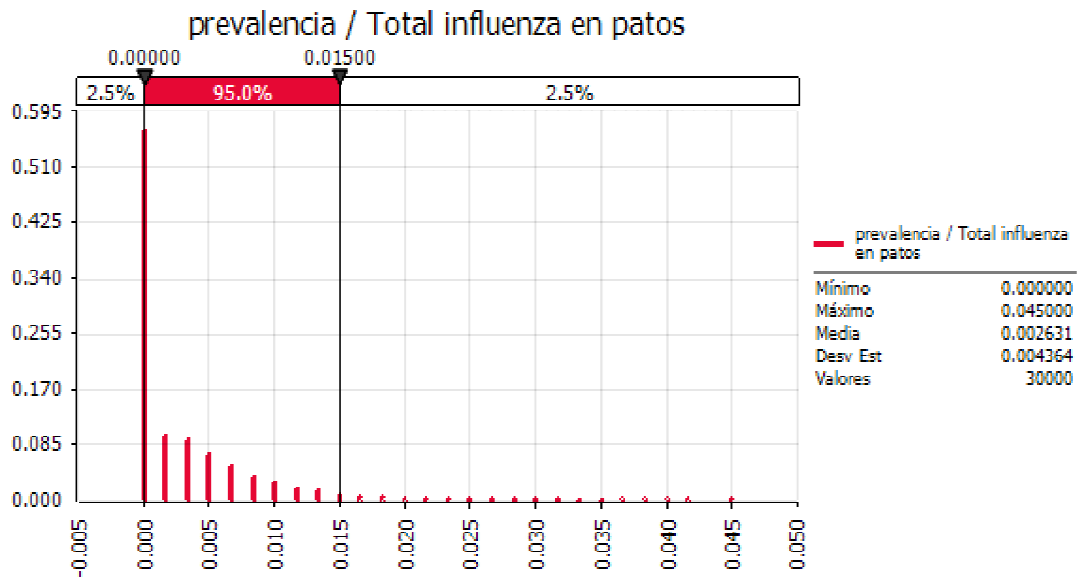


Figura 5. Distribución de la probabilidad de prevalencia del virus de Influenza Aviar en las provincias de Huaral y Huaura, con intervalos de confianza del 95% mediante la simulación de Monte Carlo.

V.- DISCUSION

Diversos reportes permiten aseverar que los virus de Influenza Aviar de Baja Patogenicidad (IABP) se encuentran circulando en las aves silvestres en Sudamérica. Así, en nuestro país entre junio del 2006 a diciembre de 2007 se aislaron nueve subtipos de virus de IABP en aves silvestres mediante aislamiento viral a partir de muestras fecales de colectadas en zonas de la costa (Gherzi et al., 2009). En otro estudio similar realizado en el 2008, se aisló un virus de IABP del subtipo H7N3, a partir de muestras de heces frescas de patos colorados (Anascyanoptera) en los Pantanos de Villa, (Gherzi et al., 2011). Posteriormente, Segovia (2010) aisló siete cepas de virus de IABP del subtipo H12N5 en aves silvestres en los Humedales de Puerto Viejo.

Si bien, las aves migratorias juegan un rol principal en la transmisión y difusión de la infección debido a que pueden transportar el virus desde territorios infectados a territorios libres de la enfermedad por ser reservorios naturales (Stallknecht y Brown 2003), en la epidemiología de la IA juegan también un rol importante las aves de traspatio, debido a que son criadas sin ninguna medida de bioseguridad y en estrecho contacto con aves silvestres.

El objetivo del presente estudio de investigación fue evaluar la presencia o ausencia del vIA, en patos domésticos mediante el aislamiento viral en huevos embrionados SPF a partir de 600 muestras de hisopado cloacal colectadas en Huaral y Huaura, debido a que son dos de las provincias

con mayor población de patos, según registros manejados por el SENASA. El acceso a los patos dependía de la voluntad de los propietarios por lo cual el diseño experimental no permitía realizar una completa selección aleatoria de las muestras. Como resultado de este estudio se obtuvieron 10 muestras positivas mediante la prueba de hemaglutinación. Sin embargo, al emplearse el test de diagnóstico rápido quickVue® se descartó la presencia del virus de Influenza Aviar en las muestras analizadas.

Por otro lado, si bien se obtuvieron pooles positivos a la prueba de hemaglutinación, esto puede deberse a que los patos muestreados pudieron haber estado infectados con otros virus de propiedades hemaglutinantes como los Paramixovirus aviares propios de patos o el Adenovirus tipo 3 causante del Síndrome de baja postura. Por lo tanto si bien todas las muestras analizadas en el presente estudio fueron negativas a la presencia del virus de Influenza Aviar, éstas deben ser evaluadas para descartar la presencia de los dos agentes mencionados anteriormente.

El SENASA realizó una serie de estudios en granjas tecnificadas, aves de combate y aves de traspatio durante los años 2004 y 2005 como parte de una vigilancia para declarar al Perú como “Libre de Influenza Aviar”. En este estudio se recolectaron 3900 muestras de suero, 600 de ellas en el departamento de Lima. Las muestras fueron analizadas mediante la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel, resultando todas negativas (SENASA, 2005). Los resultados obtenidos coinciden con los de nuestra investigación, a pesar de las diferencias entre el tipo de muestras y el método de diagnóstico.

El test de diagnóstico rápido quickVue® ha sido usado anteriormente para diagnósticos rápidos en humanos con la finalidad de prevenir la propagación viral. Esta prueba de uso humano se ha usado en los últimos años en animales, por lo cual un estudio evaluó la eficacia del test de diagnóstico rápido quickVue® en humanos, cerdos y aves, detectando todos los virus de influenza A sin falsos positivos. Concluyéndose que el QuickVue® gripe A + B fácilmente detecta todos los virus de la influenza A, sin embargo esto depende también de la carga viral (Kilic et al., 2008),

Los resultados obtenidos en nuestro estudio concluyen que el virus no estuvo presente en patos de traspatio en las provincias evaluadas. Sin embargo, existe la posibilidad de que no coincidiera tiempo de eliminación viral con el periodo en el que se tomaron las muestras o que no se haya logrado aislar el virus debido a una baja carga de eliminación viral. Durante nuestro muestreo todos los patos analizados fueron aparentemente sanos y no manifestaron ningún signo clínico compatible con la enfermedad. Durante el aislamiento viral, tampoco se detectaron lesiones en los embriones inoculados con las muestras de hisopados de cloaca. Si bien el tamaño muestral se obtuvo al asumirse una prevalencia viral de al menos 1%, la prevalencia pudo ser más baja sugiriendo que el virus de influenza aviar puede encontrarse presente en menos del 1% en patos de crianza de traspatio de las provincias de Huaral y Huaura. Se determinó que en caso de presentarse la enfermedad de la IA, se presentaría actualmente con una prevalencia estocástica máxima de 0.33% con un intervalo de confianza de 0.00% a 1.5%, al evaluarse el riesgo mediante la simulación de Monte Carlo (programa @risk).

En otros estudios, además de los reportados por el SENASA, se determinó que pollos broiler analizados entre 1998 y 1999 en Chancay (Monasi, 1999) y pavos de crianza de traspatio de las provincias de Lima, Huaral, Huaura, Canta y Barranca analizados entre los años 2008 y 2009 (Saenz, 2010) obtuvieron una prevalencia de 0% para Influenza aviar mediante pruebas serológicas. Si bien las muestras fueron tomadas en diferentes especies, los resultados concuerdan con que el virus de influenza aviar no se ha establecido en el Perú. Por otra parte, Rondón (2011) utilizó patos domésticos como centinelas para realizar vigilancia epidemiológica en aves silvestres, si bien no se encontraron resultados positivos, esto no desmiente que los patos actúen como reservorio. Todos estos resultados contribuyen para generar información al sistema de vigilancia epidemiológica en nuestro país. La FAO señala que es importante monitorear los virus de campo para su detección temprana mediante el muestreo sistemático de aves (Martin et al., 2006), por lo cual esta investigación ofrece una visión al panorama en un país libre que intenta detectar tempranamente la incursión del virus de IA en sitios de alto riesgo, más aún al confirmarse que aves migratorias analizadas fueron positivas al vIA (Segovia, 2010; Ghersi et al, 2011).

Generalmente se ha aceptado que los patos y aves silvestres son los reservorios naturales de los virus de la influenza A. Sin embargo, el papel de los patos domésticos, en comparación con los patos migratorios, en la interacción y la prevalencia de los diferentes subtipos de virus de la influenza, no se han definido completamente. Un estudio realizado en China, sugirió que los patos domésticos son mediadores en la interacción de los virus entre diferentes fuentes de genes facilitando la generación de nuevas variantes del virus de la Influenza Aviar que circulan en las aves de corral (Huang et al., 2010).

Estudios en Asia concluyeron que los patos domésticos aparentemente sanos pueden excretar los virus durante largos periodos de tiempo (Capua y Alexander, 2005; CENAVECE, 2012). Tradicionalmente, se conoce que el virus de IA en patos es excretado en altas cantidades en las heces debido a que el sitio más importante de replicación del vIA es a nivel de su intestino, como lo demuestran los primeros estudios en patos en donde los aislamientos virales provenientes de hisopados cloacales eran mayores a los aislamientos de hisopados del tracto respiratorio. Por todo lo anterior, en nuestro estudio se consideraron tomar muestras de hisopado cloacal. Sin embargo, en los últimos años los títulos más altos del subtipo H5N1 se han encontrado en muestras provenientes del aparato respiratorio. A pesar de lo anterior, se han realizado diversos estudios para determinar el mejor tipo de muestra para la detección del virus de influenza aviar, arrojando diferentes conclusiones.

Así, en el estudio realizado por Huang et al. (2010), se aislaron cepas H6 encontrando que del total de cepas positivas en aves acuáticas (16/911) solo el 2% fueron provenientes de hisopados traqueales, mientras que el restante 98% fueron aislados de hisopados cloacales o heces (Huang et al., 2010), confirmando lo anteriormente propuesto. Por otra parte, en un estudio realizado por Pabilonia (2012) en patos domésticos se determinó un 50% de casos positivos en muestras provenientes de orofaringe, un 27.7% de casos positivos en muestras cloacales y un 22.7% de casos positivos provenientes de ambas muestras. Del total de aislamientos, solo el 15.6% de los casos positivos dieron positivos para el virus H5, lo cual genera dudas acerca de la vía de excreción del resto de subtipos.

Durante el tiempo que duró la fase de colección de muestras, se pudo constatar en los predios del estudio diversos factores de riesgo para la transmisión horizontal del virus. Algunos de los predios muestreados colindaban con granjas de porcinos, e incluso en algunas ocasiones se criaban ambos animales en un mismo predio, siendo un factor de riesgo para la mutación del virus debido a que los cerdos actúan como intermediarios del vIA. En las provincias evaluadas existen humedales donde confluyen aves silvestres que pueden intervenir en la diseminación del virus, en muchas ocasiones se pudo observar la presencia de aves silvestres en los patios traseros de los predios manteniendo amplio contacto con los patos.

VI.- CONCLUSION

Se concluyó que las aves incluidas en el muestreo no se encontraban infectadas con el virus de influenza aviar. Por lo cual su prevalencia en las provincias de Huaral y Huaura en muestras de hisopado cloacal de patos domésticos evaluados mediante la prueba de aislamiento viral fue de 0%.

VII.- LITERATURA CITADA

- Alexander D, Spackman D, Gough R, Borland E, Stuart J. 1981. Isolation of influenza A viruses from commercial ducks on a farm in Norfolk between August 1979 and March 1980. *Avian Pathol* 10: 263-272
- Alexander D. 2006. Summary of Avian Influenza activity in Europe, Asia, Africa and Australasia 2002-2006. *Avian Dis* .51:161-166.
- Berrios EP. 2002. Influenza Aviar en Chile. *RevTenovet*. 8(3). Dic 2002.
- [BIAD] Banco Interamericano de Desarrollo. 2006. Impacto económico potencial de la influenza aviar en el sector avícola de América Latina y el Caribe. Washington, D.C. Serie de informes técnicos del Departamento de Desarrollo Sostenible.
- Bosch F, Orlich M, Klenk D, Rott R. 1979. The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology* .95: 197-207.
- Brown I. 2000. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *VetMicrobiol* .74: 29-46.
- Belshe R. 2005. The origin of pandemic influenza-Lessons from the 1918 virus. *N Engl J Med* 2005; 353: 2209-11.
- Buscaglia C. 2004. Influenza Aviar. En *Vet. Artículos de Revisión. Fac. Ciencias Veterinarias. Univ. Nac. De la Plata. Bs As. Argentina. In Vet* 2004. 6 (1): 71-84
- Capua I, Mutinelli F, Marangon S, Alexander D. 2000. H7N1 Avian Influenza in Italy (1999 to 2000) in intensively reared chickens and turkeys. *Avian Pathology* 29, 537– 543.
- Capua I, Alexander DJ. 2004. Avian Influenza: recent developments. *Avian Pathol*. 33(4):393-404

- Capua I, Alexander DJ. 2005. The proposed new OIE Chapter on Avian Influenza. Oficina International of Epizooties and National Reference Laboratory for Avian Influenza, InstitutoZooprofiláctico. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/a_00037.htm
- CENAVECE. Influenza Aviar. Se modifica el papel de los patos domésticos en Asia.
- México. [Internet], [9/8/2012]. Disponible en: <http://www.cenavece.salud.gob.mx/emergencias/interior/flu-aviar.htm>
- Cordero M. 2014. Influenza Aviar en las Américas. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) [Internet], [10 octubre 2014]. Disponible en:
 - <http://www.iica.int/Esp/prensa/Comuniica/Comuniica/2006/n6-esp/n1.aspx>
- [CFSPH] The Center Food Security & Public Health. 2010. Influenza Aviar de Alta Patogenicidad. Peste Aviar, Gripe Aviar. [Internet], [8/12/2012]. Disponible en:http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/influenza_aviar_de_alta_patogenicidad.pdf
- Dennis JA. 2007. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 74:3-13.
- Easterday B, Hinshaw V, Halvorson D. 1997. Influenza. En: Calnek B.W, eds. *Diseases of Poultry*, 10a ed. IowaState University Press: Ames, IA. p 583–605.
- Echaniz G.2004. Influenza aviar: ¿debemos preocuparnos?. *Salud pública Méx* 46(2):186-187
- [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.2004. Gripe aviar: Los patos domésticos podrían representar un nuevo peligro.Roma: FAO [Internet], [18/08/2012]. Disponible en:<http://www.fao.org/newsroom/es/news/2004/51443/index.html>
- FAO/OIE/OMS. 2005. Estrategia Global para el Control Progresivo de la Influenza Aviar Altamente Patógena (IAAP). p 1. [Internet], [15/09/2013]
 - <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd61/estrategia.pdf>

- [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. 2006. Guía para la prevención y control de la Gripe Aviar en la avicultura de pequeña escala en Latinoamérica y El Caribe.
- [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. 2007. Guía para la vigilancia que permita la detección temprana de Influenza aviar de Alta patogenicidad en América Latina y el Caribe. Conceptos y Directrices. Proyectos FAO de Cooperación Técnica.
- [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. 2014. Sanidad Animal. Influenza Aviar. [Internet], [5 setiembre 2014]. Disponible en:http://www.fao.org/avianflu/es/animalhealth_es.html
- Fatunmbi, O; Newman, A; Sivanandan, V; Halvorson, D.1989. A broadspectrum Avian Influenza subtype antigen for indirect ELISA. *AvianDiseases*33:264-269.
- Flores M, Vázquez L, Ramos G. 2007. Glicobiología del virus de la influenza A. *RevLatinoamMicrobiol* 49 (3-4)
- García-García J, Ramos C. 2006. La influenza, un problema vigente de salud pública. *Salud Publica Mex*; 48: 244-267
- Gaydos J, Hodder R, Top F.1977. Swine influenza A at Fort Dix, NewJersey (January-February 1976). *Infect Dis*. 136: 363-368.
- Ghersi BM, Blazes DL, Icochea EA, González RV, Kochel T, Tinoco YF, Sovero. MM, Lindstron S, Shu B, Klimov A, Gonzales A, Mongtgomery JM. 2009. Avian Influenza in Wild Birds, Central Coast of Peru. *Emerging Infect Dis* 15(6): 935-938.
- Ghersi BM, Sovero M, Icochea E, González R, Blazes D, González A, Montgomery J. 2011. Isolation of lowpathogenic H7N3 Avian Influenza from wild bird in Peru. *J Wild Dis* 47: 792-795.
- Godoy P. 2006. Avian influenza pandemics: a new challenge for public health. *Gaceta Sanitaria*. 20(1):4-8

- González A. 1986. Presencia de anticuerpos de Influenza A en aves. Tesis Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Herrero L. 2008. El virus influenza y la gripe aviar(Influenza virus and avianflu). Acta Médica Costarricense. Acta Méd Costarricense 50(1): 13-19
- Horimoto T, Kawaoka Y. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. Clin. Microbiol Rev. 14:129-149
- Huang K, Bahl J, Fan X, Vijaykrishna D, Cheung C, Webby R, Webster R, Chen H, Smith G, Peiris J, Guan Y. 2010. Establishment of an H6N2 Influenza Virus Lineage in Domestic Ducks in Southern China. Journal of Virology. 84 (14): 6978-6986
- [INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2012. Resultados definitivos:IV Censo Nacional Agropecuario. 20 p
- Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG .1989. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. J. Virol, 63 (11):4603–4608
- Kilic S, McCarthy T, C Gray G. 2008. Evaluation of the QuidelQuickVue® Influenza A+B Kit in Detecting Avian and Swine Influenza Virus. Options for the Control of Influenza VI. University of IOWA. College of PublicHealth.
- Koppel Z, Vrtiak J, Vasil M, Spiesz S.1956. Mass illness of ducklings in Eastern Slovakia with a clinical picture of infectious sinusitis. Veterinarstvi, 6: 267-268
- Krug R. 1981. Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. Current Topics of Microbiology and Immunology 93:125–149.
- Lamb R, Krug R.1996. Orthomyxoviridae: Los virus y su replicación .En Fields B et al. eds.3ªed . EE.UU: Lippincot –Raven .p 1447–1471.
- Lamichhance C.M, Kirkeggard L. 1997. Comparison of serological methods for the detection of antibodies to avian influenza virus in chicken sera. Proceeding of the fourth international symposium on Avian Influenza Pp 366- 372.
- Lupiani B, Reddy S. 2009. The history of avian influenza. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 32(4):311-323

- Martins P. 2003. Impacto Económico de las Enfermedades Avícolas de la lista “A” de la OIE. En: II Seminario Internacional OIE ALA sobre Influenza Aviar y Enfermedad de Newcastle. 13-15 Agosto. 2003. Lima Perú.
- Martin V, Forman A, Lubroth, J. 2006. Preparing for Highly Pathogenic Avian Influenza: A Manual for Countries at Risk. [OIE]. 16 de febrero de 2006. [Internet], [4/1/2013]. Disponible en:
 - http://www.adap.hawaii.edu/adap/avian_flu/AI_Manuals/FAO_OIE_%20HPAImanual.pdf
- Monasí F. 1999. Seroprevalencia del virus de la Influenza Aviar en broilers en la provincia de Huaral, Lima. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 10(2)
- Munch, M; Nielsen, P; Handberg, K; Jorgensen P. 2001. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. Archives of Virology 146:87–97.
- Municipalidad Provincial de Huaura. Datos 2013. Geografía y territorio. Huaral-Perú. [Internet], [12/10/2013]. Disponible en: <http://www.munihuacho.gob.pe/>
- Municipalidad Provincial de Huaral. Datos 2013. Geografía y territorio. Huaral-Perú. [Internet], [12/10/2013]. Disponible en:
 - [\http://pomu.munihuachal.gob.pe/Huaral/Geografia_Territorio
- Munir ,I. 2009. Controlling Avian Influenza Infections :The challenge of Backyard Poultry. J Mol Genet Med, 3(1), 119-120
- Noda J. 2006. Virus de la Influenza Aviar: Características Genéticas Antigenicas y Diagnóstico Actual. Rev Salud Anim. Cuba. 28(3): 147-57.
- [OIE] Oficina Internacional de Epizootias. 2005. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Gripe Aviar. [Internet] [13/11/2012]. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/2.1.14_Gripe_aviar_2007.pdf

- [OIE] Oficina Internacional de Epizootias. 2008. Terrestrial Manual. Avian Influenza. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. [Internet], [15/10/2013]. Disponible en:
http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.03.04.%20Influenza_aviar.pdf
- [OIE] Oficina Internacional de Epizootias. 2009. Terrestrial Manual. Avian Influenza. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. [Internet], [15/08/2009]. Disponible en:
http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.04_AI.pdf
- [OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2014. Actualización sobre la Influenza Aviar Altamente Patógena en animales (tipo H5 y H7). [Internet], 19 octubre 2014]. Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/actualizacion-sobre-la-influenza-aviar/2014/>
- Olsen B, Munster V, Wallensten A, Waldenström J, Osterhaus A, Fouchier R. 2006. Global patterns of Influenza A virus in wild birds. *Science* 312:384-388
- [OMS] Organización Mundial de la Salud. 2014. Gripe aviar.
- Organismo Internacional de Sanidad Agrícola. 2010. Influenza Aviar. México, Belice, Guatemala, el Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, República Dominicana. Copyright 2010. Sistema Integrado de Información. [Internet], [18/12/2012]. Disponible en: http://www.oirsa.org/portal/Influenza_Aviar.aspx
- Ortiz EJ, Kochel TJ, Capuano AW, Setterquist SF, Gray GC. 2007. Avian Influenza and Poultry Workers, Peru, 2006. *Influenza OtherRespiViruses* 1(2): 65-69.
- Ortiz M, Villamil L. 2013. El virus de la influenza aviar H7N9, una nueva variante que afecta seres humanos. *Rev. Lasallista Investig.* 10 (2): 1794-4449
- Pabilonia K. 2012. The role of domestic ducks in the maintenance and spread of avian. Degree of Doctor of Philosophy Colorado State University Fort Collins, Colorado.
- Palese P, Shaw M. 2007. Orthomixoviridae: The virus and their host. En: knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 5° ed. Lippincott Williams & Wilkins. P 1647.

- Pastor J. 2012. Número de predios y población de patos en las provincias de Huaral y Huaura. Datos no publicados. SENASA, Lima- Perú
- Perret C, Dabanch J. 2008. Influenza Aviar y Riesgo de Pandemia. *RevChilPediatr.* 79 (4): 358-363
- Perroncito CE. 1878. Epizootiatifoideneigallinacei. *Ann AccadAgric.* 21:87.
- Pinto, L y Lamb, R. 2007. Control de la replicación del virus de Influenza Aviar por la inhibición del canal de protones. *Molecular Biosystems* 3:18–23.
- Pumarola T, Marcos M, Jiménez de Anta M. 2002. Variaciones antigénicas del virus de la influenza como determinante epidemiológico clave. *Vacunas. Investigación y Práctica España.* 3(Supl 1):1-4
- Rocancio VG. 2005. *Infectio. Revista de la Asociación Colombiana de Infectología.* 9(3): 139-147.
- Rojas H, Moreira R. 2002. Influenza Aviar en Chile: Una Sinopsis. Ministerio de Agricultura. División de Protección Pecuaria. Salud Animal e Inocuidad de los Alimentos. Gobierno de Chile. [Internet], [30/11/2006]. Disponible en: http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_6_numero_especial_oct_2006/articulos/sinopsis_IA_2002.pdf
- Sáenz E. 2010. Detección del virus de Influenza Aviar en pavos de crianza familiar en las provincias de Lima, Huaral, Huaura, Canta y Barranca. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos.
- Salazar M, López O, León G, Ramírez J. 2010. El origen de la variabilidad genética de los virus de la influenza. *GacMédMéx* 146 (3): 199-205
- Sánchez, A; Agüero, M; Jiménez, M; Gómez-Tejedor, C. 2007. Influenza aviar: Diagnóstico de laboratorio. Laboratorio Central de Veterinaria. Laboratorio Nacional de Referencia para Influenza Aviar. [Internet], [29/12/2012]. Disponible en: <http://analesranf.com/ranf/index.php/mono/article/viewFile/586/603>

- Sánchez A, Agüero M, Jiménez M, Gómez C. 2011. Influenza aviar: Diagnóstico de laboratorio. Laboratorio Central de Veterinaria. España: Real Academia Nacional de Farmacia [Internet], [29 agosto 2013]. Disponible en: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/586/603>
- Segovia K. 2010. Presencia del virus de influenza aviar en las aves silvestres de los humedales de Puerto Viejo. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos.
- [SENASA] Servicio Nacional de Sanidad Agraria. 2002. Aprueban Plan de acción para la prevención de la enfermedad de Influenza Aviar en el Perú. Resolución Jefatural N° 230-2002-AG-SENASA. [Internet], [18 Agosto 2011]. Disponible en: http://www.senasa.gob.pe/RepositorioAPS/0/0/JER/SAN_AVI/1175.pdf
- [SENASA] Servicio Nacional de Sanidad Agraria. 2005. Resolución Jefatural N°273-2005-AG-SENASA. [Internet], [19 Agosto 2011]. Disponible en: http://www.senasa.gob.pe/RepositorioAPS/0/1/JER/SANIAVI_NORMATIVI/RJ%20273-2005-AG-SENASA.pdf
- [SENASA] Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. 2009. Manual de Procedimientos Influenza Aviar. Argentina: SENASA. p 9-13
- Sinnecker H, Sinnecker R, Zilke E. (1982) Detection of influenza A viruses by sentinel ducks in an ecological survey. *ActaViroológica* 26: 102-104
- Spackman, E; Senne, D; Myers, T; Bulaga, L; Garber, L; Perdue, M; Lohman, K; Daum, L; Suarez, D. 2002. Development of a realtime reverse transcriptase PCR assay for type A Influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (9), 3256-3260.
- Spackman E, Suarez D, Senne D. 2008. Avian Influenza Diagnostics and Surveillance Methods. En: Swayne D, ed. *Avian Influenza*. 1st Edition. Blackwell Publishing. p.299-308.
- Spackman E, Pantin-Jackwood M, Swayne D, Suarez D. 2009. An Evaluation of Avian Influenza Diagnostic Methods with Domestic Duck Specimens. *Avian Diseases* 53:276–280.

- Stallknecht DE, Brown JD. 2007. Wild Birds and the Epidemiology of Avian Influenza. *J Wild Dis* 43 (3) p: 515-520.
- Steinhauer DA. 1999. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258 (1), 1-20.
- Strauss J, Strauss E. 2008. *Viruses and human disease*. Second edition. San Diego, CA: Elsevier. p 162-174
- Sturm-Ramírez K, Hulse-Post D, Govorkova E, Humberd J, Seiler P, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen T, Chaisingh A, Long H, Naipospos T, Chen H, Ellis T, Guan Y, Peiris J, Webster R. 2005. Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia? *Journal of Virology* 79:11269-11279
- Suarez DL. 2000. Evolution of avian influenza viruses. *Vet Microbiol*;74:15-27
- Suarez D, Schultz, C. 2000. Immunology of avian influenza virus: a review. *Dev Comp Immunol*. 24:269-283.
- Suarez G. 2006. Historia natural de la influenza aviar o gripe del pollo: análisis sanitario actual y prospectivo. En: Grisolia S, eds. *La gripe aviaria: un reto de salud pública*. España: Ed. de la Univ.de Castilla-La Mancha. p 23
- Suarez DL, Das A, Ellis E. 2007. Revisión de pruebas moleculares rápidas de diagnóstico para el virus de influenza aviar. *Avian Dis* 51(s1): 201-208.
- Suarez D. 2008. Influenza A virus. En: Swayne D, ed. *Avian Influenza*. 1st Edition. Blackwell Publishing. p.3-22
- Swayne D, Senne D, Beard C. 1998. Avian influenza. En: Swayne D, Glisson J, Jackwood M, Pearson J, Reed W, eds. *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th ed. American Association of Avian Pathologists: Kennett Square, PA, pp. 150–155.
- Swayne DE, Suarez DL. 2000. Highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech*. 19(2):463-82.

- Swayne DE, Halvorson DA. 2003. Influenza. En: Calnek BW. Diseases of Poultry. 11a ed. Iowa State Press, USA. p135- 160.
- Swayne D. 2008. Avian Influenza Control Strategies .En: Swayne, ed. Avian Influenza. 1th Ed. Blackwell Publishing. pp. 287-297.
- Swayne D, Halvorson D. 2008. Influenza. En: Saif YM, eds. Diseases of Poultry, 12a ed. Estados Unidos, Iowa: Blackwell Publishing. p 153-174.
- Swayne D, Pantin-Jackwood. 2008. M. Pathobiology of Avian Influenza Virus Infections in Birds and Mammals. En: Swayne, ed. Avian Influenza. 1th Ed. Blackwell Publishing. pp. 87-122.
- Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM., Wang R, Jin G, Fanning TG. 2005. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. Nature 437(7060): 889-893.
- Taubenberger JK, Morens DM. 2006. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. Emerg Infect Dis 2006;12:15-22
- Webster R, Yakhno M, Hinshaw V, Bean W, Murti K. 1978. Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. Virology 84:268- 278.
- Webster RG, Hulse DJ. 2004. Microbial adaptation and change: avian influenza. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 23: 453-65
- West C. 2010. Determinación de diferencias en riesgo de recepción y diseminación de influenza aviar altamente patógena en zonas de prioritarias para el ingreso de esta enfermedad a Chile. Tesis de Doctor en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias. Santiago: Universidad de Chile. p 1
- Wright P, Webster R. 2001. Orthomyxoviruses. En: Knipe D, Howley P, eds Fields Virology. vol. 1. 4a. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, p 1487-1531.
- Zamora A, Percedo M, Abeledo A, Nod J. 2008. Algunas Pautas para establecer una estrategia de vigilancia epidemiológica de la Influenza Aviar. Rev. Salud Anim. Vol. 30 No. 2: 69