



UNIVERSIDAD DE VIÑA DEL MAR
Escuela de Ciencias Agropecuarias
Medicina Veterinaria

**PROTOCOLO DE CAPTURA, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN
DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN PATOS SILVESTRES DE LA
QUINTA REGIÓN DE CHILE**

**Memoria Para
Optar al Título de
Médico Veterinario**

KATHERINE DENISSE BIERKARDT ITURRIETA
Profesor Guía: Dr. Christian Mathieu Benson

VIÑA DEL MAR – CHILE
2008

I. ÍNDICE

	Pág
I. ÍNDICE	1
II. RESUMEN	3
III. SUMMARY	4
IV. INTRODUCCIÓN	5
V. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
V.1. Influenza aviar: sinónimos	8
V.2. Características generales del virus	8
V.3. Variación antigénica.....	11
V.4. Estructura del virus y función de las proteínas virales	12
V.5. Ciclo de replicación.....	14
V.6. Resistencia a la acción física y química	15
V.7. Epidemiología	16
V.8. Patogénesis	18
V.9. Transmisión.....	19
V.10 Transmisión interespecies	19
V.11. Cuadro clínico	21
V.12. Reservorio de virus influenza en la naturaleza.....	22
V.13. Mecanismos para perpetuar los virus influenza en aves	27
V.14. Aparición de la influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP).....	29
V.15. Rol zoonótico – historia	35
V.16. Inmunoprofilaxis	37
V.17. Diagnóstico clínico.....	42
V.18. Diagnóstico de laboratorio	42

	Pág
V.19. Prevención.....	48
V.20. Captura de patos silvestres	49
VI. OBJETIVOS	56
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
VII.1. Materiales Terreno.....	57
VII.2. Materiales Laboratorio.....	58
VII.3. Métodos Terreno.....	60
VII.4. Métodos Laboratorio	62
VIII. RESULTADOS	68
IX. DISCUSIÓN	70
X. CONCLUSIONES.....	74
XI. BIBLIOGRAFÍA	75
XII. ANEXOS	88
XII.1. Protocolo de toma de muestras	88

II. RESUMEN

En el presente estudio se describe la captura, toma de muestras y procedimientos de laboratorio para la detección de virus de Influenza Aviar (IA) en patos silvestres de la Quinta región de Chile.

Para la realización de este estudio fue necesario visitar los humedales de El Yali, Leyda, Los Molles y Colejuda, conocidos por la gran variedad de especies aviares presentes, tanto residentes como migratorias (destacando el primero a nivel nacional). En dichos lugares se tomaron muestras orales de distintos patos silvestres, los cuales fueron capturados al azar en jaulas portátiles. Se logró un total de 66 muestras.

Posteriormente se procesaron las muestras en la Unidad de Virología Pecuaria del Departamento de Laboratorio y Estaciones Cuarentenarias del SAG, ubicado en el sector de Lo Aguirre, Región Metropolitana.

Los procedimientos de laboratorio incluyeron aislamiento en huevos embrionados SPF y test de hemoaglutinación.

Para la obtención de los resultados fue necesario esperar una semana desde la inoculación de cada embrión de pollo SPF, tiempo necesario para una buena replicación viral (si es que existiera virus). Recién después de transcurrido este tiempo se pudo realizar la prueba de hemoaglutinación.

Los resultados indicaron que las 66 muestras obtenidas eran negativas al aislamiento del virus de la IA y a la prueba de hemoaglutinación, siendo innecesaria la realización de una prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

III. SUMMARY

The current research describes how wild ducks, from the 5th region of Chile, were captured, how samples were taken, and what laboratory procedures were followed in order to detect the Avian Influenza (AI) virus.

To successfully carry out such research, it was necessary to visit several wetlands such as El Yali, Leyda, Los Molles, and Colejuda, which are well-known places due to the wide array of not only native avian species but also of migratory class (the first recognized at national level). Oral samples from different wild ducks were taken in the aforementioned places, birds that were randomly captured in portable cages. 66 was the total number of samples taken.

Afterwards, these samples were processed at the Unidad de Virología Pecuaria del Departamento de Laboratorio y Estaciones Cuarentenarias, Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), located at Lo Aguirre, Santiago de Chile.

The procedures followed at the laboratory included the isolation on chicken SPF embryos, and haemoagglutination tests.

It was necessary to wait an entire week since SPF chicken embryos were inoculated to obtain the yieldings of these procedures. This span of time was necessary to get a proper viral replication (in case of virus existence). Only after this time has passed, the haemoagglutination test can be performed.

The results showed that 66 out of the 66 samples taken were negative to the AI virus, which meant that the inhibition of the haemoagglutination test was unnecessary.

IV. INTRODUCCIÓN

La influenza aviar (IA) es causada por un virus género A de la familia *Orthomyxoviridae* (Carter et al, 2006).

El virus influenza género A infecta a un gran número de especies animales que incluyen mamíferos marinos, cerdos, equinos, aves y el hombre.

Este virus ha sido detectado en aves acuáticas, las cuales actúan de reservorio y como propagadores para otras especies (Tollis y Di Trani, 2002; Linzitto et al, 2005).

Existen variados subtipos del virus de la influenza aviar, debido a las diferencias antigénicas en base a la hemoaglutinina (HA) y la neuroaminidasa (NA) presentes en su estructura. Para el virus influenza A se reconocen 16 diferentes antígenos HA (H1 al H16) y 9 diferentes NA (N1 a N9) (Linzitto et al, 2005).

Las infecciones en aves domésticas varían desde infecciones respiratorias leves y subclínicas hasta la presentación aguda y generalizada, con severa disminución de la producción e incluso muerte de parvadas enteras.

Es una enfermedad altamente contagiosa, que tiene como principales afectados a gallinas y pavos, aunque es probable que todas las especies aviares sean susceptibles a la infección (Linzitto et al, 2005).

La mayoría de las infecciones con virus de IA son inaparentes, especialmente en aves acuáticas y otras aves silvestres. En contraste, infecciones causadas por los subtipos H5 y H7 pueden ser responsables de devastadoras epidemias en aves domésticas.

Respecto a la captura de aves silvestres para estudios epidemiológicos de IA la obtención de muestras mediante trampas jaula es uno de los métodos más conocidos, especialmente en el caso de patos silvestres. El SAG recomienda este método de captura para el estudio de aves en humedales (SAG, 2006). En la literatura se describen estructuras bastante sencillas como la de Hunt y Dahlka (1953) que consiste en una malla de alambre redondeada; trampas con sistema de cierre automático, como la de Blums et al, en 1983; hasta estructuras más modernas, como la jaula rectangular con entradas tipo embudo descrita por Malcolm Wilson en el 2005. También existen otras técnicas como las redes niebla y las redes cañón, pero no se incluyen en este estudio debido a que no son los métodos de elección, por lo que no fueron utilizadas.

Para la identificación del agente se utilizan diferentes técnicas, tanto directas (identificación del agente) como indirectas (identificación de anticuerpos). Es importante mencionar que lo más recomendado es aislar el virus, destacando en este ámbito el aislamiento en huevos embrionados SPF, el cual va seguido por pruebas de hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación para determinar el tipo de agente presente. Otra forma bastante certera de identificar el agente es utilizando Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que es una técnica molecular con muy alta sensibilidad y especificidad. Dentro de los métodos indirectos destaca la Inmunodifusión en Gel de Agar, la cual requiere suero como muestra.

Situación nacional:

Antes del brote de Influenza Aviar ocurrido el 2002 en aves comerciales en Chile, nunca se había reportado la detección de IA en Sudamérica (Suárez et al, 2004).

Es importante destacar que en Chile las aves comerciales son constantemente monitoreadas para IA, cumpliendo así con las regulaciones de exportación; sin embargo, la vigilancia de IA en aves acuáticas silvestres ha sido históricamente mínima en Sudamérica.

Previo al brote de Chile, en una muestra de un pato colorado proveniente de Bolivia, se aisló un virus de IA H7N3 (en USA, el 2001). Este caso representó el primer reporte y el primer aislamiento de virus de IA en Sudamérica (Spackman et al, 2006).

Luego de los respectivos análisis al aislado boliviano (A/ Cinnamon Teal/ Bolivia/ 4537/ 01 [H7N3]) se procedió a comparar con la base de datos del Gen Bank. Dicho análisis filogenético determinó que cinco de los ocho segmentos del virus (entre ellos el segmento de la HA) tenían su máxima relación con los aislados de virus de IA obtenidos del brote chileno el 2002. De hecho, el sitio de división de la HA era idéntico al sitio de división de la IA de baja patogenicidad (IABP) de las aves comerciales chilenas del 2002 (Spackman et al, 2006).

Durante el brote de IA el 2002 en Chile, el virus mutó desde IABP a IA de alta patogenicidad (IAAP) dentro de un mes desde que fue introducido en las aves comerciales (Suárez et al, 2004), indicando que aunque este virus era IABP, tenía la habilidad de transformarse en IAAP cuando sufría pasajes en aves domésticas. Se postuló que la fuente de este virus fueron aves acuáticas silvestres (Jones y Suárez, 2004).

Luego de estos antecedentes queda clara la necesidad de realizar monitoreos periódicos en aves silvestres, dada su importancia como reservorio y diseminadores de virus de IA.

Cabe destacar que actualmente Chile es un país libre de IA reconocido internacionalmente, y dicho estatus sanitario debe mantenerse, para poder así ser partícipes de una economía globalizada (exportaciones) protegiendo al mismo tiempo la salud y bienestar animal.

V. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

V.1. Influenza Aviar

También conocida como gripe aviar, peste aviar, influenza aviar de alta patogenicidad.

V.2. Características generales del virus

Los virus influenza son virus ARN pertenecientes a la familia *Orthomyxoviridae* (Carter et al, 2006).

Carter et al (2006) caracteriza a la familia Orthomyxoviridae de la siguiente manera:

Esta es una familia de virus ARN de una sola hebra. Son más pequeños que los paramyxovirus, y su genoma es segmentado en vez de ser una hebra única de ARN. Los virus influenza son los únicos miembros de esta familia.

Estos virus tienen predilección por el tracto respiratorio, pero usualmente no causan enfermedades graves. Una excepción es la infección en humanos con virus de origen aviar. Los principales virus con importancia veterinaria son los virus influenza A, que causan la influenza equina, porcina y aviar

Características virales de los orthomyxovirus:

Estos virus tienen un genoma de ARN monohebra segmentado, nucleocápside helicoidal (cada segmento de ARN más sus proteínas forman la nucleocápside) y una envoltura externa de lipoproteína. El genoma segmentado facilita la recombinación genética, la cual explica los “shifts” antigénicos (cambios, mutaciones importantes). Las mutaciones puntuales en el genoma de ARN explican los “drifts” antigénicos (mutaciones menores). En cualquier caso, los cambios están frecuentemente asociados con los antígenos HA y NA.

El virus está rodeado con 2 tipos diferentes de proyecciones de superficie o espículas, la hemoaglutinina y la neuroaminidasa (HA y NA).

En el laboratorio, los virus se replican mejor en las células epiteliales que cubren la cavidad alantoídea de los embriones de pollo, y la replicación toma lugar en el núcleo.

Los virus influenza son más bien lábiles (Carter et al, 2006).

Clasificación:

La familia se divide en cuatro géneros

-Virus Influenza A: causan influenza equina, aviar y porcina. Tienen gran variabilidad antigénica en las glicoproteínas de superficie, HA y NA. Actualmente en los virus influenza A han sido identificadas 16 HA y 9 NA (Linzitto et al, 2005).

- Virus Influenza B: sus miembros sólo infectan humanos (Carter et al, 2006).

- Virus Influenza C: Estos virus causan infecciones respiratorias suaves en humanos.

Pueden afectar también a cerdos (Carter et al, 2006).

- Virus tipo “Thogoto”: Las dos especies, Thogoto y Dhori, son virus transmitidos por garrapatas y fueron recuperados desde ganado, camellos y humanos en regiones de Asia, África y Europa. No son considerados con importancia patogénica para los animales (Carter et al, 2006).

En 1931 Richard Shope aisló por primera vez el virus de influenza porcina A. En 1940 se aisló e identificó un nuevo agente, denominándosele virus de influenza B, y en el año 1949 se identificó el C (Linzitto et al, 2005).

Composición antigénica:

Las proteínas internas consisten principalmente en una proteína de la nucleocápside (NC), algunas proteínas de matriz (M1) y tres polimerasas (PA, PB1 y PB2). Las proteínas NC y M1 determinan la especificidad del tipo. Incluso siendo internas, estas proteínas pueden estimular las células T citotóxicas, que son importantes en la recuperación de la infección (Carter et al, 2006).

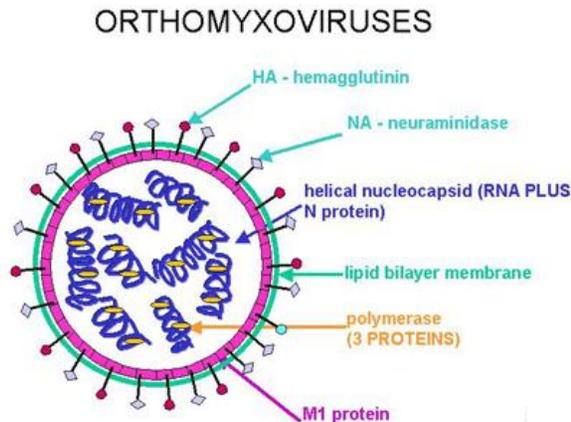
El antígeno de la nucleoproteína (A, B, C) determina el tipo (género) de virus. Los antígenos HA y NA determinan los subtipos (Carter et al, 2006)

La HA es un antígeno de superficie (espícula) que se puede unir a los eritrocitos y causar aglutinación. Es la responsable de la unión del virión a los receptores celulares de superficie (ácido neuroamínico, ácido siálico). La unión del virus a una célula susceptible es impedido si hay un bloqueo por un anticuerpo. Por eso, es muy importante la inmunidad protectora mediada por anticuerpos neutralizadores (Carter et al, 2006).

La NA es una proteína de superficie cuya actividad enzimática resulta en la licuefacción del mucus, contribuyendo de esta forma a la propagación del virus. Los anticuerpos específicos demoran la propagación del virus. La NA también divide el ácido neuroamínico para liberar la progenie del virus desde la célula infectada (Carter et al, 2006).

Los virus influenza se designan así: tipo/ lugar/ año del aislamiento/ contenido de HA y NA. Por tanto, un virus A: A/ Bangkok/ 3/ 79 (H3N2) significa respectivamente tipo A, aislado en Bangkok, laboratorio local designado con el número 3, aislado por primera vez en 1979, y cubierto por los antígenos H3N2 (Carter et al, 2006).

Figura 1. Estructura de un *Orthomyxovirus*



Fuente: Microbiología e Inmunología online, Universidad de Carolina del Sur, Escuela de Medicina

V.3. Variación Antigénica

Hay dos tipos de cambios antigénicos:

- *Shifts* antigénicos: Estos son cambios mayores basados en la recombinación de segmentos del genoma. En la recombinación, segmentos completos de ARN son intercambiados entre dos virus que infectan el mismo huésped; los cuales codifican una sola proteína, por ejemplo, la hemoaglutinina. Como resultado de esta coinfección por dos virus, puede surgir un tercero (Carter et al, 2006).
- *Drifts* antigénicos: Estos son cambios menores causados por mutaciones puntuales en la decodificación de genes de las glicoproteínas HA y NA (Carter et al, 2006).

Los genes de la HA y NA de la influenza A son polimórficos, susceptibles a grandes variaciones. Este no es el caso de los tipos B y C (Carter et al, 2006).

V.4. Estructura del virus y función de las proteínas virales

Los virus influenza A, B y C son envueltos, segmentados, con una monohebra de ARN de polaridad negativa y pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Los virus de influenza A son los únicos orthomyxovirus conocidos que infectan aves (Tollis y Di Trani, 2002).

Los virus influenza son clasificados como miembros de la familia *Orthomyxoviridae* (del griego *orthos*, “standard, correcto”; y *myxo*, “mucus”) por su habilidad de unirse a mucosa (Linzitto et al, 2005).

Son esféricos, pero también pueden observarse formas filamentosas al microscopio electrónico. Los esféricos son de 50 – 120 nm de diámetro, los filamentosos de unos 20 nm de diámetro y unos 200 – 300 nm de largo (Linzitto et al, 2005).

Existen ocho segmentos genéticos de ARN que codifican para diez proteínas, las cuales son internas y de superficie (Tollis y Di Trani, 2002).

La HA, la NA y la matriz 2 (M2) son las tres proteínas de superficie. Las proteínas internas incluyen la nucleoproteína (NP), el complejo de polimerasas (PB1, PB2 y PA), la proteína de matriz 1 (M1) y las proteínas no estructurales 1 y 2 (NS1 y NS2). La HA y la NA, espículas incorporadas en la membrana del virus en proporción 8:1, son los antígenos más importantes porque son capaces de estimular la respuesta inmune protectora contra la infección (Ruigrok, 1998).

La glicoproteína HA está incrustada en la membrana viral como un homotrímero. El monómero de HA consiste en una región con cabeza globular conectada a un dominio fibroso, y está compuesta de 2 segmentos polipeptídicos denominados HA1 y HA2 (Wiley and Skehel, 1987).

La proteína HA parece ser la proteína más importante en la determinación de la virulencia de los virus de IA.

El segmento HA1 forma los sitios de unión con el ácido siálico y media el acoplamiento de la HA a la superficie de la célula huésped. El segmento HA2 forma el péptido de fusión. Para que el virus se vuelva infeccioso, es necesaria la división del precursor de la HA (HA0), en las subunidades HA1 y HA2, esto porque la fusión celular es mediada por el terminal amino libre de la subunidad HA2 (Rott, 1992).

El proceso de división se logra usando proteasas producidas por el huésped. Estas proteasas se dividen en 2 grupos: el primero incluye las enzimas tipo tripsina, localizadas en lugares y tejidos específicos del huésped (como el tracto intestinal y respiratorio); el segundo representa las proteasas ubiquitinas, las que reconocen y dividen la HA con múltiples residuos básicos en el sitio de división. La HA de los virus influenza de mamíferos y aves es dividida por proteasas extra celulares del tracto respiratorio o intestinal del huésped. Además de esto, la división de la HA0 de la Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (IAAP), es mediada por proteasas ubiquitinas (Tollis y Di Trani, 2002).

La presencia de aminoácidos básicos múltiples situados en el sitio de división de la HA del virus de IA, y la ausencia de una cadena lateral de carbohidratos cercana al sitio de división, permite que la segmentación (división) de la HA sea realizada por una o más propeptidasas (endoproteasa relacionada con subtilisina), entre las cuales, la furina pareciera ser la principal (Horimoto et al, 1994; Senne et al, 1996). Ambos factores activan la replicación del virus de IA en la mayoría de los tejidos y órganos del huésped y caracterizan la virulencia de los diferentes tipos de IA en aves de corral. A la fecha, la presencia de aminoácidos básicos múltiples (arginina y lisina) en sus sitios de división en la HA ha sido demostrada sólo por un número limitado de aislados de campo de virus de IA pertenecientes a los subtipos H5 o H7. Estos virus han sido asignados al grupo específico de virus IAAP, con el fin de distinguirlos de los otros tipos de virus los cuales, en cambio, son responsables de la Influenza Aviar de Baja Patogenicidad (IABP) (Wood et al, 1993).

La NA de los virus influenza es una glicoproteína tetramérica que consiste en un péptido hidrofóbico (como un pedículo), responsable del anclado a la membrana, y una cabeza

globular, la cual contiene el sitio activo de la enzima y el sitio antigénico de la molécula. La NA divide el ácido siálico terminal de las glicoproteínas o glicolípidos, permitiendo así que las partículas virales se liberen de los receptores de la célula huésped y nuevos viriones sean liberados desde la célula (Palese et al, 1974).

V.5. Ciclo de Replicación

La partícula del virus influenza, con el sitio de división de la HA activado, es unida a la célula por la interacción entre el receptor de unión de la HA y el terminal de ácido siálico del receptor de glicoproteína o glicolípido que está en la superficie celular. Seguido de la unión, el virión adjunto es endocitado por la célula. El pH bajo de la vesícula endocítica provoca un cambio conformacional en la HA activada, lo cual facilita la inserción del terminal hidrofóbico amino libre de la HA2 en la membrana vesicular, iniciando la fusión de las membranas viral y vesicular dentro de la célula. La fusión libera el contenido del virión hacia el citoplasma de la célula (Webster et al, 1992).

La nucleocápside del virus original migra hacia el núcleo de la célula huésped, y su complejo asociado de polimerasa comienza la transcripción primaria del RNA mensajero. Los transcritos primarios son usados para la traducción de proteínas virales, las cuales, en la etapa temprana de infección, son predominantemente la NP y la NS1. La traducción del ARN mensajero del huésped es bloqueada. La NP y NS1 recién sintetizadas migran al núcleo. El aumento en la concentración de NP libre provoca un cambio en el genoma celular infectado, disparando la síntesis de ARN viral. El ARN viral recién sintetizado es encapsulado por la NP dentro del núcleo y funciona como molde para la transcripción secundaria de ARN mensajero viral. Tardíamente en la infección, los principales productos de la traducción son las proteínas M1, HA y NA. Estas dos últimas son procesadas y transportadas a la superficie celular, donde se integran a la membrana celular. La acumulación de proteína M1 en el núcleo está asociada con la migración de la nucleocápside fuera del núcleo para reunirse con las partículas virales de la progenie en el citoplasma. Las nucleocápsides son encerradas en una vaina de proteína M1 y salen al exterior a través de la membrana celular, dentro de una burbuja de membrana, rodeadas con

las glicoproteínas de superficie viral. Las interacciones entre M1 y los dominios citoplasmáticos de la HA, NA o M2 han sido propuestas como señales la replicación (Webster et al, 1992)

La NA de los viriones de la progenie tiene una función enzimática, eliminando los restos de ácido siálico de la superficie de la célula infectada, lo que facilita así su liberación al medio extracelular, y por tanto, la infección de nuevas células (Pérez-Breña y Casas, 2004).

En la mayoría de los virus influenza, el paso final de maduración es extracelular; esto es la división de HA0 en HA1 y HA2 gracias a las proteasas del huésped. La división de la HA es relativamente inestable a pH bajo; por lo tanto, en los virus de influenza aviar, los cuales son transmitidos principalmente por vía fecal – oral, la división probablemente ocurre después de que los viriones excretados han ingresado a sus nuevos huéspedes y han pasado a través del estómago. Las HA de los IAAP son probablemente divididas intracelularmente. Las HA de los virus influenza de mamíferos son divididas probablemente por proteasas extracelulares del tracto respiratorio del huésped original o del nuevo (Webster et al, 1992).

V.6. Resistencia a la acción física y química según la OIE (2002)

Temperatura: Inactivación por 56°C/3 horas; 60°C/30 min

pH: Inactivado a pH ácido

Productos químicos: Inactivado por agentes oxidantes, dodecil sulfato de sodio, disolventes de lípidos, β-propiolactona

Desinfectantes: Inactivado por formalina y compuestos de yodo

La supervivencia del virus en el ambiente es variable, encontrándose presente principalmente en tejidos animales, heces y agua. En esta última se ha visto que algunos virus pueden mantenerse infecciosos unos 207 días a 17° C (Webster et al, 1992).

V.7. Epidemiología

Hay 3 características principales que influyen la presentación de IA en especies susceptibles: la probabilidad de exponerse al agente causante, la virulencia del virus, y la habilidad del huésped de contrarrestar los mecanismos patogénicos (Tollis y Di Trani, 2002).

Los virus influenza A parecen bien adaptados a las aves acuáticas silvestres, que son consideradas como sus huéspedes naturales. Sin embargo, la ecología completa de la influenza en estas especies huéspedes no es conocida, y debido a la compleja interacción del virus con numerosas aves acuáticas, es poco probable que sea completamente comprendida. Todos los subtipos conocidos de virus influenza A circulan en aves acuáticas y representan la fuente original de todos los genes virales para los virus influenza de mamíferos y de aves. La variada distribución de los subtipos de HA y NA puede variar según la especie huésped y el año y época de aislamiento (Sharp et al, 1993).

Una característica importante de cualquier aislado de campo de virus IA es su habilidad de diseminarse y producir progenie infecciosa en diferentes tejidos, lo cual, en términos prácticos, refleja la variación de los grados de virulencia de los tipos de campo.

La diferencia entre IAAP e IABP ha sido determinada por la Unión Europea (UE), basados en el “índice de patogenicidad intravenosa del aislado” (IVPI) y en la secuencia de aminoácidos en el sitio de división de la HA. Un criterio similar ha sido adoptado por el United States Department of Agriculture’s Animal and Plant Health Inspection Service (USDA – APHIS) para definir virus IAAP. Según la legislación de la UE, “influenza aviar es una infección de las aves domésticas causada por cualquier virus de influenza A el cual tiene un IVPI mayor que 1,2 en pollos de seis semanas de edad, o cualquier infección con virus influenza A de los subtipos H5 o H7 para los cuales la secuencia de nucleótidos ha demostrado la presencia de múltiples aminoácidos básicos en el sitio de división de la HA” (Council Directive, 1992).

La USDA – APHIS define que un virus influenza A es altamente patógeno si cumple con uno de los siguientes criterios:

1. Mata al menos seis de ocho pollos susceptibles de seis semanas de edad, inoculados de forma experimental.
2. Cualquier subtipo H5 o H7 que mate menos de seis de ocho pollos, pero tenga una secuencia de aminoácidos en el sitio de clivaje de la HA que sea compatible con los virus del tipo IAAP.
3. Cualquier otro subtipo de HA (excepto H5 o H7) el cual mate entre 1 y 5 pollos (de ocho) y se desarrolle en un cultivo celular en ausencia de tripsina

La mayoría de los aislados de aves silvestres han sido virus avirulentos, exceptuando los virus H5N3 y H7N1 IAAP, aislados, respectivamente, de charranes o gaviotín golondrina (*Sterna hirundo*) en Sud África (Becker, 1966) y de aves silvestres presentes en las cercanías de brotes causados por IAAP en aves domésticas (Capua et al, 2000a).

Los virus IAAP e IABP pueden infectar aves domésticas, aunque los pollos y pavos son especialmente afectados. Los patos migratorios son considerados la fuente primaria de infección para las aves domésticas, aunque otras especies aviares pueden jugar el mismo rol ocasionalmente. Los mamíferos pueden ser sólo considerados como fuente potencial de infección para las aves domésticas (Wood et al, 1997).

Como el virus de IA se replica tanto en el tracto respiratorio como digestivo, el virus es diseminado a través de secreciones respiratorias y las heces. Indirectamente, la diseminación del virus ocurre vía fomites contaminados como el agua de bebida, equipamiento, jaulas o vehículos. Los humanos juegan un papel importante en la diseminación del virus a través de ropa contaminada, el movimiento individual de aves y huevos, o entregando alimento (Tollis y Di Trani, 2002).

V.8. Patogénesis

La patogenicidad de los virus de IA sigue el patrón de los orthomyxovirus, es extremadamente variable y se basa en las características del subtipo del virus. A menudo se ha observado que un virus patógeno para una especie avícola no necesariamente lo es para otra. Una importante característica de los virus de IA es su capacidad de mutación, de manera que subtipos no patógenos pueden convertirse en patógenos (SENASA, 2003).

La patogenicidad de los virus de IA radica principalmente en la HA de superficie. Cuando en la misma existe una cadena de aminoácidos básicos que son fácilmente reconocidos por proteasas celulares, el virus puede penetrar cualquier tipo de célula, invadiendo diferentes tejidos y órganos, provocando un cuadro clínico que puede ser mortal. Cuando no existe esta cadena de aminoácidos básicos, la HA de superficie solamente es reconocida por la tripsina, proteína que se encuentra en el tracto respiratorio y digestivo de las células del huésped, de manera que el virus solamente invade estos tejidos, dando un cuadro semejante a una gripe sin mayor gravedad para las aves (Linzitto et al, 2005).

Los virus IAAP parecen ser menos transmisibles desde las aves infectadas a aves susceptibles que los virus IABP. Una razón que explica esto puede ser la rápida muerte de las aves que sigue a la infección con virus virulentos que, en parte, reduce la cantidad de virus excretado. El período de incubación luego de la infección son usualmente 3 días o menos. Los blancos primarios de la replicación viral son los pulmones, tejido linfoide y órganos viscerales que contienen células epiteliales como los riñones y el páncreas (Tollis y Di Trani, 2002).

La diferencia principal entre los virus IAAP e IABP se refleja en la replicación local versus la sistémica la cual, hasta cierto punto, está correlacionada con la presencia de lesiones en varias partes del cuerpo. Los virus IABP parecen ser caracterizados por una capacidad restringida de replicación y producción de lesiones en tejidos y órganos individuales. En contraste, los virus IAAP parecen ser pantrópicos con respecto a la replicación sistémica del virus y su habilidad de producir lesiones severas (Mo et al, 1997).

Las diferencias en el tropismo por los tejidos de los virus IABP e IAAP reflejan la diversidad en los mecanismos patógenos que llevan a la enfermedad clínica y la muerte de pollos infectados, y están relacionadas con diferencias en el sitio proteolítico de división de la HA (Swayne, 1997a). Las infecciones con virus IABP pueden ser asintomáticas o causar un amplio rango de signos clínicos, variando desde signos muy suaves hasta signos severos de enfermedad respiratoria, urogenital o entérica. Infecciones concurrentes con otros patógenos pueden influir en la severidad de los signos clínicos causados por virus IABP (Easterday y Beard, 1984).

Estudios experimentales han demostrado que la severidad de la enfermedad causada por virus IABP está influenciada por del tipo de virus, especie del huésped y edad (Laudert et al, 1993). Durante el brote de virus IABP subtipo H7N1 (Italia), esas diferencias fueron también demostradas en terreno (Capua et al, 2000b).

V.9. Transmisión

La transmisión puede ocurrir vía contacto directo con secreciones de aves infectadas, especialmente heces. Alimentos, agua, equipo y ropa contaminados. Las aves acuáticas y marinas clínicamente normales pueden introducir el virus en las granjas avícolas. Los huevos rotos contaminados pueden infectar a los pollitos en la planta de incubación (OIE, 2002).

V.10. Transmisión interespecies

La transmisión de virus de IA desde aves acuáticas a mamíferos ha ocurrido, aunque la especificidad del virus de IA restringe tal fenómeno a un acontecimiento relativamente raro y a una circulación limitada solamente de pocos subtipos durante un largo periodo. Un caso está representado por el aislamiento de virus con los subtipos H7N7, H4N5, H4N6 y H3N3 desde focas que murieron de una severa pulmonía. Todos los aislados demostraron ser antigénica y genéticamente relacionados al virus de IA (Callan et al, 1995).

La transmisión accidental de un virus de influenza de foca que resultó en una infección humana, indica el potencial de los virus aviáres para infectar humanos utilizando otros huéspedes de la naturaleza (Webster et al, 1981a).

También se han aislado virus de IA de ballenas: un aislado del subtipo H1N3 mostró estar antigénicamente muy relacionado con virus aviáres, mientras que aislados de los subtipos H13N2 y H13N9 también estaban genéticamente muy relacionados a virus aislados de gaviotas (Chambers et al, 1989).

La aparición de virus de IA en focas y ballenas representaron eventos independientes de transmisión desde especies aviáres, en vez de una circulación verdadera de virus de IA entre mamíferos marinos (Tollis y Di Trani, 2002).

Durante una severa epizootia de influenza que ocurrió en diversas granjas de visones en Suecia en 1984, fueron aislados virus influenza del subtipo H10N4 de origen aviar (Berg et al, 1990).

Entre 1989 y 1990, durante un brote severo de enfermedad respiratoria que afectó caballos en China, fue aislado un virus H3N8. Los análisis de secuencia y antigénicos indicaron el origen aviar de esa variedad, con una derivación diferente comparada con el virus H3N8 de los equinos que estaba circulando en ese momento (Guo et al, 1995).

Los cerdos también son susceptibles a la infección con virus influenza de diferentes orígenes (Kida et al, 1994). Virus aviáres H1N1 han sido transmitidos a cerdos en Europa (Scholtissek et al, 1983) y en China (Guan et al, 1996). Virus de IA de los subtipos H4N6 y H9N2 fueron aislados desde cerdos en Canadá en 1999 (Karasin et al, 2000) y en China entre 1998 y el 2000 (Peiris et al, 2001).

En 1993 fueron aislados virus recombinados en cerdos, que presentaban la proteína interna viral con genes de un virus aviar H1N1 y la glicoproteína de superficie con genes de un virus humano H3N2 (Castrucci et al, 1993). A partir de entonces esta recombinación fue

aislada de niños en los Países Bajos (Class et al, 1994). Estos hallazgos muestran el rol de los cerdos como “vasijas de mezcla” de virus influenza, y también demuestran que las recombinaciones aviares – humanas pueden cruzar la barrera cerdo – humana, con el potencial de causar una pandemia de influenza humana.

Durante el brote de IA en Asia entre 2003 y el 2004, hubo reportes anecdóticos de infecciones fatales por virus H5N1 en gatos domésticos y felinos del zoológico luego de haber ingerido pollos infectados (ProMED Mail, 2004). Para determinar la patogenicidad de este virus en gatos domésticos, se infectaron experimentalmente gatos europeos de pelo corto de 4 a 6 meses de edad con virus H5N1 ocupando diferentes rutas. Primero se inocularon tres gatos vía intratraqueal. Dichos gatos mostraron signos clínicos y lesiones tanto macro como microscópicas, incluso excretaron el virus a partir del tercer día post infección. Uno de ellos falleció inesperadamente al sexto día post infección. Seguido, se probó si podía existir transmisión horizontal, ocupando dos gatos centinelas en contacto con los inoculados intratraquealmente. Finalmente se determinó si los gatos podían infectarse con virus H5N1 alimentándose de aves infectadas. Tanto en el segundo como tercer caso se produjo la excreción del virus, signos clínicos y cambios pulmonares similares al primer grupo inoculado intratraquealmente (Kuiken et al, 2004)

V.11. Cuadro Clínico

Los signos y síntomas de la IAAP son muy variables. Las aves enfermas pueden reflejar alteraciones en los sistemas respiratorio, digestivo, reproductor y nervioso. Los signos más frecuentes de IAAP en pollos (gallinas) o pavos son: disminución en la producción de huevos, signos respiratorios, crépitos, lagrimación excesiva, sinusitis, cianosis de la piel sin plumas (especialmente la cresta y la barbilla), edema de la cabeza y cara, plumaje erizado, diarrea y desórdenes nerviosos (Webster et al, 1992).

La OIE describe los siguientes signos en pollos:

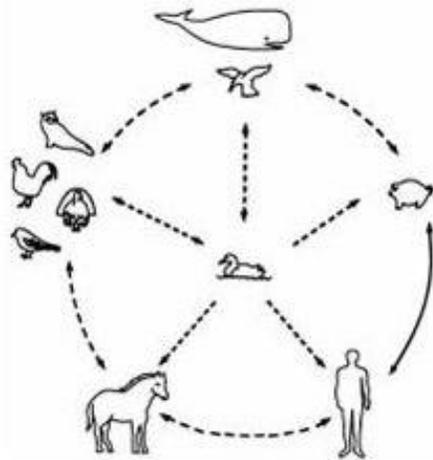
- Congestión grave de la musculatura.
- Deshidratación.
- Edema subcutáneo de la cabeza y del cuello.
- Secreciones nasales y orales.
- Congestión grave de la conjuntiva, a veces con petequias.
- Exudación mucosa excesiva en el lumen de la tráquea o traqueítis hemorrágica grave.
- Petequias en el interior del esternón, en la grasa serosa y abdominal, en las superficies serosas y cavidades corporales.
- Congestión renal severa, a veces con depósito de uratos en los túbulos.
- Hemorragia y degeneración de los ovarios y exudación en los oviductos.
- Hemorragias en la superficie de la mucosa del proventrículo, particularmente en la unión con el estómago muscular.
- Hemorragias y erosiones de la mucosa del estómago muscular.
- Focos hemorrágicos en los tejidos linfoides de la mucosa intestinal

En los pavos las lesiones son similares a las de los pollos, pero pueden ser menos marcadas. Los patos infectados por IAAP y que excretan el virus pueden tener ausencia de signos y lesiones (OIE, 2002).

V.12. Reservorios de Virus Influenza en la Naturaleza

Los virus influenza A infectan a una gran variedad de animales, incluyendo humanos, cerdos, caballos, mamíferos marinos y aves. Estudios filogenéticos de virus influenza A han revelado linajes especie específicos de genes virales y han demostrado que la prevalencia de la transmisión interespecies depende de la especie animal. También ha sido revelado que las aves acuáticas son la fuente de todos los virus influenza de otras especies (Gorman et al, 1991).

Figura 2. Reservorio de Virus Influenza A.



Fuente: Gorman et al, 1991.

Las aves acuáticas silvestres son el reservorio principal de todos los virus influenza de aves y mamíferos. La transmisión de virus influenza ha sido demostrada entre cerdos y humanos. Existe gran cantidad de evidencia sobre la transmisión entre patos silvestres y otras especies, y los cinco grupos de huéspedes diferentes (figura 2) están basados en análisis filogenéticos de las NP's de un gran número de diferentes virus influenza (Gorman et al, 1991).

Virus Influenza en aves: Patos silvestres, Aves costeras, Gaviotas, Aves domésticas y Aves passeriformes

La gran vigilancia de aves durante un brote de enfermedad de Newcastle en California mostró que muchos virus influenza A no patógenos pueden ser aislados de las aves (Slemons et al, 1974). Subsecuentemente, virus influenza fueron aislados de aves silvestres, aves cautivas, patos domésticos, pollos y pavos, llevando a la conclusión de que los virus de influenza aviar no patógenos son ubicuos, principalmente en aves acuáticas (Alexander, 1986), y que todos los diferentes subtipos de virus influenza son perpetuados en aves acuáticas, particularmente en las migratorias (Hinshaw et al, 1980).

Los signos de enfermedad asociados a la infección con virus Influenza A en aves varían considerablemente según el tipo de virus.

En patos silvestres, los virus influenza se replican especialmente en las células que cubren el tracto intestinal, sin causar signos de enfermedad, y son excretados en altas concentraciones por las heces (Webster et al, 1978). Se han aislado virus de IA desde material fecal fresco y desde agua de lago. Esta información indica que las aves acuáticas tienen una manera muy eficiente de transmitir virus, por ejemplo, vía material fecal en las fuentes de agua (Webster et al, 1992).

Si se considera el gran número de patos susceptibles que se reúnen cada año en los lagos canadienses, es comprensible que muchas aves sean infectadas debido a la diseminación del virus dentro del agua del lago. Esto podría explicar la gran incidencia de infecciones virales en patos canadienses, particularmente juveniles. La transmisión por heces también proporciona una vía para que los patos, en cuanto migren a través de cierta área, diseminen sus virus a otras aves domésticas o salvajes (Webster et al, 1992).

La naturaleza avirulenta de la infección con IA en patos puede ser el resultado de la adaptación del virus a este huésped a través de los siglos, creando un reservorio que asegure la perpetuación del virus. Esta especulación sugiere fuertemente que los patos ocupan una posición única y muy importante en la historia natural de los virus influenza. Los virus influenza de origen aviar han sido implicados en brotes de influenza de mamíferos, como en focas (Webster et al, 1981a; Webster et al, 1981b), ballenas (Halvorson et al, 1983) y cerdos (Scholtissek et al, 1983) en Europa, así como en aves domésticas, especialmente en pavos (Halvorson et al, 1983).

Estudios longitudinales en patos silvestres en Canadá entre 1976 y 1989 revelaron que un gran porcentaje (sobre el 20%) de aves juveniles tenían la infección viral influenza al congregarse antes de la migración, ninguna de ellas mostró algún síntoma de la infección. Múltiples subtipos de virus influenza resultaron enzoóticos (Hinshaw et al, 1980)

En los patos silvestres del hemisferio norte, los virus influenza son predominantes en Agosto y Septiembre (Stallknecht et al, 1990).

Una gran variedad de subtipos de virus influenza también ha sido aislada en aves acuáticas silvestres en otros lugares del mundo, incluyendo Rusia (Lvov, 1987), el sur de China (Shortridge, 1982), el oeste de Europa (Alexander, 1892; Sinnecker et al, 1985; Stunzer et al, 1980), Israel (Lipkind et al, 1984), y Australia (Dawnie y Laver, 1973; Mackenzie et al, 1984), demostrando el alcance mundial de los pools genéticos de la IA en la naturaleza.

Estudios filogenéticos indican que los virus influenza en Europa Oriental y Australia son genéticamente diferentes a los de Norte América (Donis et al, 1989; Gorman et al, 1990), presumiblemente debido al confinamiento de las aves a las diferentes rutas de migración de cada hemisferio. Estos estudios demostraron que la evolución de los virus influenza puede estar influenciada por barreras físicas que previenen la mezcla de sus huéspedes.

Esporádicamente también han sido aislados virus influenza desde aves costeras, incluyendo gaviotas, charranes, petreles, frailecillos (araos) y zarapitos (Becker, 1966; Hinshaw y Webster, 1982).

Un estudio sistemático de aves costeras y gaviotas en la Bahía de Delaware, en la costa este de Estados Unidos reveló que los virus influenza A son prevalentes en primavera (mayo y junio) y otoño (septiembre y octubre) (Kawaoka et al, 1988). Los subtipos predominantes en estas aves difieren a los de los patos. Virus H3 y H6 son prevalentes en patos; sin embargo, sólo unos pocos virus H3 y H6 han sido aislados de aves costeras y gaviotas. En contraste, los subtipos de virus predominantes en aves costeras y gaviotas (H4, H9, H11 y H13) representan sólo una pequeña fracción de los virus presentes en patos. La gran mayoría de estos virus son non patogénicos en pollos y patos, pero el aislado original de charranes (*Sterna hirundo*) en Sud África (A /tern /S.A/ 61 [H5N3]) (Becker, 1966) es altamente patógeno para aves domésticas. Infecciones experimentales en Patos Pekín con aislados de aves costeras y gaviotas mostraron que sólo la mitad de los aislados de dichas aves tenían el potencial de replicarse en patos. Estos estudios establecieron que el pool

genético de virus influenza en aves costeras y gaviotas es diferente al pool de los patos (Webster et al, 1992).

Con menor frecuencia se han aislado virus influenza desde aves paseriformes; sin embargo, estudios durante el brote de IAAP H7N7 en Australia en 1986 establecieron que estorninos y gorriones son susceptibles a la infección y son potenciales diseminadores de virus de IA (Cross, 1988; Nestorowicz et al, 1987).

Estos estudios han establecido la existencia de un vasto reservorio de virus influenza A en aves acuáticas. La evidencia de que todos los virus influenza A de mamíferos son probablemente derivados de aves acuáticas indica que existe un enorme pool genético de influenza en la naturaleza para los futuros virus influenza de mamíferos (Webster et al, 1992).

Es importante mencionar que a pesar de todos los datos anteriormente citados, y del claro papel que juegan las aves silvestres como reservorio del virus, a finales del año 2002, los brotes de IAAP H5N1 causaron muertes entre aves migratorias y aves acuáticas, incluidos patos, en dos parques de Hong Kong. Este nuevo aislado de H5N1 (que resultó ser antigénicamente diferente a los virus H5N1 aislados en 1997 y el 2001) causó una infección sistémica en los patos, con altos títulos virales y lesiones en múltiples órganos, particularmente en el cerebro. Los patos desarrollaron una enfermedad aguda, incluyendo una severa disfunción neurológica y la muerte (Sturm-Ramírez et al, 2004).

Posteriormente se realizaron estudios de inoculación con 23 diferentes tipos de H5N1 aislados en Asia entre el 2003 y el 2004. Estos estudios demostraron que todos los virus aislados se replicaban eficientemente en patos silvestres.

Los virus se replicaron a niveles mayores en la tráquea (en vez de la cloaca) sugiriendo que el tracto digestivo no es el principal sitio de replicación de virus influenza H5N1, y que la vía fecal no sería la principal ruta de transmisión (Sturm-Ramírez et al, 2005).

V.13. Mecanismos para Perpetuar los Virus Influenza en Aves

Existe evidencia convincente de que todos los subtipos de virus influenza A son perpetuados en las poblaciones de aves acuáticas del mundo, especialmente en patos, aves costeras y gaviotas; no existe evidencia de que los virus influenza persistan por largos períodos en animales individuales. Esto indica que se ha desarrollado algún mecanismo para la mantención del virus influenza en las especies aviares acuáticas (Webster et al, 1992).

La mantención de virus influenza en la población de aves acuáticas difiere de la mantención de virus influenza en los humanos dado el gran número de juveniles susceptibles que son introducidos anualmente después de la eclosión primaveral. La mayoría de las aves infectadas son presumiblemente inmunes a la reinfección son el subtipo predominante de influenza. Esto probablemente inflencie los cambios en el subtipo predominante en alguna ruta de migración en particular de año en año. Diversas posibilidades han sido sugeridas para la perpetuación de virus influenza en las poblaciones acuáticas del mundo:

- Circulación continua en especies aviares acuáticas. La información anteriormente discutida sugiere que cada subtipo de virus influenza puede ser mantenido en la población de patos silvestres en Norte América. La detección de bajos niveles de virus influenza durante los meses de invierno en Norte América y Japón, y la detección de virus en patos al regresar a Canadá al inicio de la época de reproducción, apoyan esta idea (Webster et al, 1992).
- Circulación entre diferentes especies aviares. Desde que los virus influenza son prevalentes en las aves costeras en primavera y en patos silvestres en otoño, debe existir transmisión interespecies. Cerca de la mitad de los virus influenza aislados desde gaviotas y aves costeras infectaron patos experimentalmente (Kawaoka et al, 1988).

- Persistencia en agua o hielo. Cuando hay patos silvestres en agosto y septiembre (Norte América) se pueden aislar virus influenza desde el agua del lago sin necesidad de concentrarla. Es posible que virus influenza sean preservados congelados en hielo o en agua del lago y reinfecten a los patos en primavera. La infectividad de los virus influenza en el agua depende del tipo de virus, la salinidad, pH y temperatura del agua. A 17° C algunos tipos se mantienen infectantes por más de 207 días, y a 4° C se mantienen infectantes por mucho más tiempo (Stallknecht et al, 1990), dejando la posibilidad de la persistencia de virus influenza en el agua cuando los patos no están presentes.

- Persistencia en animales individuales. Aunque la diseminación del virus desde el tracto intestinal de algunos patos puede durar 2 ó 4 semanas (Hinshaw et al, 1980), no hay evidencia de que exista una diseminación continua.

Existe abundante evidencia de diversos laboratorios (De y Nayak, 1980; Frielle et al, 1984; Robinson y Easterday, 1979) de que los virus influenza pueden producir infecciones persistentes en cultivos celulares. Las condiciones que permiten esta condición aún no son bien comprendidas. Existe mucha menos evidencia acerca de la persistencia de infecciones en animales, aunque existen reportes de una amplia emisión de virus influenza desde animales inmunocomprometidos incluidos ratones sin pelo (Wyde et al, 1977).

Hay evidencia de que el virus influenza H3N2 puede persistir en cerdos después de haber desaparecido de la población humana (Haesebrouck et al, 1985; Shortridge et al, 1977), pero es más probable que algunos de esos subtipos H3N2 deriven de infecciones recientes con virus de IA (Kida et al, 1988).

- Circulación continua en regiones tropicales y subtropicales. Existe un aumento en la evidencia de que en regiones tropicales y subtropicales, los virus influenza de humanos son aislados durante todo el año (Reichelderfer et al, 1989), mientras que en climas templados, la influenza es una enfermedad invernal y el virus es aislado con muy baja frecuencia en los meses de verano. Los virus influenza han sido

aislados durante todo el año en patos domésticos en Hong Kong (Shortridge, 1982). Se debe considerar la posibilidad de que el epicentro de la perpetuación de virus influenza sean las regiones tropicales del mundo y que patos, aves costeras y gaviotas transporten virus desde las regiones tropicales a regiones templadas durante la migración de primavera. El argumento que refutaría la teoría de las regiones tropicales como epicentro es que no se encuentran aglomeraciones de aves silvestres en una alta densidad en estas regiones del mundo (Webster et al, 1992).

Hasta ahora, la información obtenida sitúa la primera alternativa como la más convincente, vale decir la circulación continua en especies aviares acuáticas.

V.14. Aparición de la Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (IAAP)

La peste aviar fue descrita y reportada por primera vez como una grave enfermedad de las aves de corral en Italia en 1878. El virus causante de la peste aviar fue descubierto por Centanni y Savunozzi en 1901, pero no fue hasta 1955 que los virus fueron caracterizados e identificados como virus de influenza tipo A. Estos virus se encuentran en la mayoría de los países del mundo donde se producen aves de corral (SAG, 2002).

Antes de 1959, cuando el primer brote de IAAP subtipo H5 fue certificado en Escocia, sólo los virus de IAAP del subtipo H7 habían sido identificados (Tollis y Di Trani, 2002).

No existe evidencia directa que apoye la hipótesis que los virus de IAAP hayan emergido desde virus de IABP en aves silvestres. Sin embargo, estudios experimentales han demostrado que virus avirulentos mantenidos en aves acuáticas silvestres que mostraban la secuenciación del tipo avirulento, tienen el potencial de volverse altamente patógenos, mientras se repliquen en pollos, y sea insertada una secuencia de aminoácidos básicos en el sitio de división (Ito et al, 2001).

Los mecanismos para la aparición de virus virulentos desde virus avirulentos no está completamente aclarada, aunque es seguro que la adquisición de la capacidad de división de la HA, junto con los cambios moleculares en otros genes virales, están entre los factores responsables de esta evolución (Tollis y Di Trani, 2002).

Un mecanismo postulado para la adquisición de múltiples residuos de aminoácidos básicos en el sitio de división de la HA es la duplicación directa de una parte de la región rica en purina, como resultado de un error en la transcripción por la polimerasa viral de ARN o por el complejo de polimerasas (Perdue y Suarez, 2000). Sumado a esto, se ha hipotetizado que el sitio de división debe ser físicamente capaz de aceptar la adición de aminoácidos básicos, manteniendo la habilidad de dividir la HA (Tollis y Di Trani, 2002).

La presencia de un sitio de glicosilación cerca del receptor de unión de la HA también parece influenciar en la virulencia de los virus IAAP, porque bloquea el acceso de las proteasas ubiquitinas celulares al sitio de división (Kawaoka et al, 1984). Mastrosovich et al (1999) sugirieron que la glicosilación de la HA mejora el potencial virulento y esta característica estaría asociada con la adaptación del virus en los pollos. Ellos demostraron que los virus influenza de aves acuáticas experimentan una importante presión selectiva en las aves domésticas, con cambios en la secuencia nucleótida de la HA y la NA. Los virus aislados después de sufrir pasajes en pollos o pavos mostraron un aumento en la glicosilación de la cabeza globular de la HA y una delección de aminoácidos en el pedículo de la NA. De hecho, la longitud del pedículo de la NA puede también modificar las características biológicas de los virus influenza (Luo et al, 1993). Wagner et al (2000) demostraron que la propagación eficiente del virus depende de una actividad altamente balanceada de la HA y la NA.

Los subtipos H5 y H7 en pollos pueden mostrar carbohidratos adicionales en la punta de la cabeza globular de la HA, muy cercanos al sitio del receptor de unión. Estos carbohidratos adicionales se unen a la punta de la HA que, mientras disminuyen la afinidad del virus por las sialoproteínas, compensan la actividad enzimática disminuida del NA viral, mejorando así la liberación final del virus desde las células (Tollis y Di Trani, 2002).

Estudios en virus H5N1 aislados de pollos en Hong Kong han demostrado que la delección de 19 aminoácidos en el pedículo de la NA disminuye su habilidad de liberar el virus de las células, mientras que un carbohidrato en la cabeza de la HA disminuye la afinidad del virus por los receptores celulares (Mastrosovich et al, 1999).

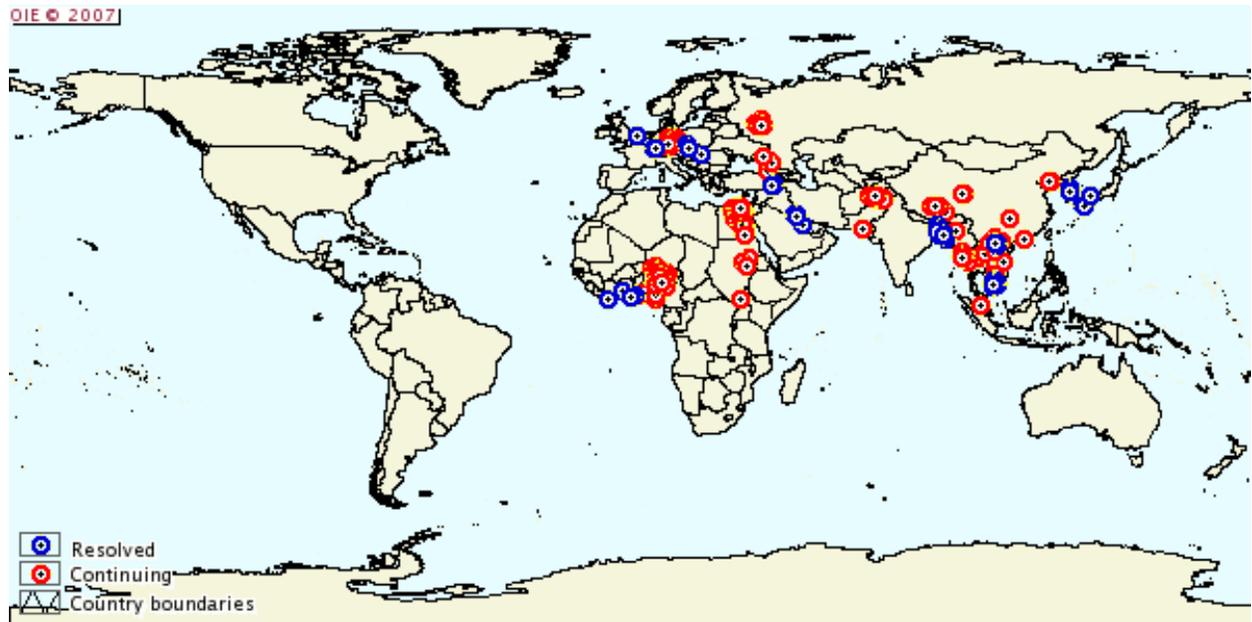
Los tres brotes de IAAP registrados en Pensilvania en 1983, en México desde 1993 a 1995 y en Italia desde 1999 al 2000, han entregado una oportunidad para estudiar los cambios genéticos asociados con la mutación de la virulencia en los aislados disponibles antes y después del evento. Durante los brotes de IABP en Pensilvania, aislados tempranos de virus H5N2 tenían una secuencia de aminoácidos básicos en el sitio de división. La presencia de una cadena lateral de carbohidrato muy cercana al sitio de división en la estructura tridimensional de la HA, bloqueaba el acceso de las proteasas ubiquitinas al sitio de división. Con la pérdida de la cadena lateral de carbohidrato, debido a la sustitución con un aminoácido, la HA se volvió altamente segmentable (dividible), llevando el virus a ser IAAP (Kawaoka et al, 1984). En 1993, virus de IABP H5N2 fueron aislados de aves comerciales en México. A finales del otoño de 1994 y a principios del invierno de 1995, fue registrado un aumento en las tasas de mortalidad (de moderadas a elevadas). La comparación de la secuencia completa de HA de dos tipos de virus responsables de diferentes grados de severidad de la enfermedad, demostró que la patogenicidad adquirida era determinada por la inserción y sustitución de residuos básicos en el péptido conector de la HA (Horimoto et al, 1995; García et al, 1996).

El trabajo en aislados italianos H7N1 ha confirmado la aparición de IAAP desde IABP, debido a la adquisición de una secuencia de aminoácidos básicos en el sitio de división. En este caso, se ha hipotetizado que la delección de 22 aminoácidos básicos en el pedículo de la NA, seguido de la adquisición de sitios adicionales de glicosilación cerca del sitio del receptor de unión de la HA1, representa el resultado de la presión de selección ocurrida durante la replicación en aves domésticas de virus de IA originarios de aves silvestres (Banks et al, 2001).

Países que han notificado a la OIE influenza aviar H5N1 en aves domésticas/silvestres entre enero 2003- agosto 2007

- Afganistán, Albania, Alemania, Arabia Saudí, Austria, Azerbaiyán
- Bangladesh, Bosnia y Herzegovina, Bulgaria, Burkina Faso
- Camboya, Camerún, Checa (Rep.), Corea (Rep. de), China, Côte d'Ivoire, Croacia
- Dinamarca, Djibouti
- Egipto, Eslovaquia, Eslovenia, España
- Francia
- Georgia, Ghana, Grecia
- Hong Kong, Hungría
- India, Indonesia, Irán, Irak, Israel, Italia
- Japón, Jordania
- Kazajstán, Kuwait
- Laos
- Malasia, Mongolia, Myanmar
- Niger, Nigeria
- Pakistán, Palestina (Territorios Autónomos de), Polonia
- Reino Unido, Rumania, Rusia
- Serbia y Montenegro, Sudán, Suecia, Suiza
- Tailandia, Togo, Turquía
- Ucrania
- Vietnam

Figura 3. Mapa de focos recientes de IA subtipo H5 (enero – agosto, 2007)



Fuente: OIE, 2007

Tabla 1. Focos oficiales recientes de IA del subtipo H5

Localización	Tipo de Virus	Fecha
Afganistán	H5N1	14/03/2007
		26/08/2007
		20/07/2007
Alemania	H5N1	20/07/2007
Arabia Saudí	H5N1	07/05/2007
Bangladesh	H5N1	08/07/2007
Camboya	H5N1	12/04/2007
		15/08/2007
Checa (Rep.)	H5N1	16/08/2007
Corea (Rep. de)	H5N1	18/06/2007
Côte d'Ivoire	H5N1	23/03/2007
Egipto	H5N1	23/03/2006
Francia	H5N1	14/08/2007
Ghana	H5N1	13/08/2007
Hong Kong	H5N1	25/01/2007
Japón	H5N1	08/05/2007
Kuwait	H5N1	20/07/2007
Laos	H5N1	14/03/2007
Malasia (peninsular)	H5N1	12/06/2007
Myanmar	H5N1	02/08/2007
Pakistán	H5N1	06/08/2007
Reino Unido	H5N1	06/07/2007
Rusia	H5N1	19/03/2007
		18/06/2007
Tailandia	H5N1	20/04/2007
Togo	H5N1	30/07/2007
Turquía	H5N1	29/05/2007
Vietnam	H5N1	05/07/2007

Fuente: OIE, 2007

V.15. Rol zoonótico – Historia

Las pandemias de influenza en humanos de los años 1918, 1957 y 1968; se han producido por modificaciones genéticas a partir de virus influenza A provenientes de animales. (Rivero, 2004). Considerando esto y debido al anuncio hecho por científicos chinos al comprobar la presencia del virus H5N1 de los pollos en cerdos, y en personas en China, en Taiwán, en Tailandia y en Vietnam, todas las autoridades sanitarias de Asia, la Organización Mundial de Salud (OMS), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), entre otras, se han puesto en alerta roja para evitar que en el caso de una mutación de este virus se presente una pandemia, que si no se controla, podría dejar cifras importantes de muertes humanas (Lamb y Krug, 1996; Bosch, 2005).

El virus A/H5N1 ha sido responsable de una epidemia de IA en aves domésticas y silvestres de varios países de Asia, con una alta patogenicidad, con consecuencias económicas y sanitarias importantes. Estos brotes ocurridos en el año 2003 fueron responsables del contagio a personas, resultando una letalidad de un 33%. Estos casos provocaron una alerta internacional ante la posibilidad de una pandemia de AI en humanos causada por esta variedad de virus (A/H5N1) (Linzitto et al, 2005).

Se han visto brotes en aves migratorias por el virus A/H5N1 en China, Rusia, Kazajstán y Mongolia. Algunas de estas aves tienen un rango migratorio intercontinental (Europa, Asia y Oceanía), habiéndose extendido la epidemia hacia países de la región este de Europa (Rumania y Turquía) (Bosch, 2005).

Durante 1997 y 2001 hubo notificaciones de casos de IA de alta patogenicidad en el hemisferio occidental y en el Pacífico. En Australia en 1997 hubo un brote de IA en pollos y emús causado por un virus del subtipo H4N7 de baja patogenicidad. Los episodios estuvieron relacionados con pollos y aves silvestres. En el área americana, Canadá notificó brotes de pollos producidos por virus influenza de los subtipos H1, H6, H7 y H10, y de los subtipos H3 y H13 en aves importadas y silvestres. En México, entre el año 1997 y el 2001,

se detectó el virus influenza del subtipo H5N2 de baja patogenicidad aislado a partir de pollos comerciales (Linzitto et al, 2005).

En 1997, la IA del subtipo H5N1 responsable de la HPAI entre las aves domésticas en Hong Kong, fue transmitida a humanos y resultó en 18 casos de infecciones confirmadas (Subbarao et al, 1998). Los análisis de la secuencia de los aislados humanos del subtipo H5N1 indicaron que todos los genes tenían un origen aviar con múltiples aminoácidos básicos en la zona de división de HA, y no había evidencia de recombinación con virus de influenza humana (Suárez, 1998; Subbaro et al, 1998). En 1999 un subtipo H9N2, el cual mostraba genes internos de gran similitud con los virus H5N1 mencionados, fueron también responsables de 2 casos de infecciones humanas en Hong Kong (Lin et al, 2000). Estos eventos muestran el imprevisible potencial de transmisión de algunos virus de IA.

Los determinantes involucrados en la restricción del rango de huéspedes no han sido completamente aclarados. El primer evento en la infección con influenza es la unión de la HA al receptor de ácido siálico. La especificidad del receptor de virus influenza varía según la especie del huésped del cual el virus es aislado. La HA de los virus de IA se une al α 2 – 3 sialiloligosacárido proyectado desde la membrana de la célula, en la cual el residuo de ácido siálico está unido a un residuo de galactosa por un enlace α 2,3 (SA α 2,3 Gal). La HA de virus de humanos y cerdos se une preferentemente a SA α 2,6 Gal (Connor et al, 1994). Esta diferencia en la especificidad está determinada por la presencia de un aminoácido específico en la estructura del sitio del receptor de unión de la HA (Naeve et al, 1984). Los virus H5N1 aislados de humanos en Hong Kong mostraron mantener las propiedades del receptor de unión de los virus aviáres, sugiriendo así que otros productos genéticos, diferentes a la HA, pueden contribuir a la restricción en el rango de huéspedes (Mastrovovich et al, 1999).

Los subtipos H5N1, H7N7, H9N2, H7N2, H7N3 han sido asociados con infección de gripe aviaria en humanos (Linzitto et al 2005).

Los subtipos de virus influenza que han sido confirmados en humanos productores de pandemia son: H1N1, causando la Gripe Española (año 1918); H2N2 causando la gripe asiática (año 1957); H3N2 causando la gripe de Hong Kong (año 1968).

En Asia, hasta el año 2005, se produjeron 142 casos en humanos (por virus de IA), de los que han muerto 54; 4 en Camboya, 14 en Tailandia, 22 en Vietnam, 11 en Indonesia y 3 en China (Linzitto et al 2005).

V.16. Inmunoprofilaxis

Inmunidad:

La inmunidad frente a virus de IA es mediada tanto por una respuesta celular como humoral. Los anticuerpos neutralizantes son producidos contra las proteínas de superficie viral HA, NA y M2; con los anticuerpos contra la HA y NA como principales determinantes para una completa protección contra la infección y la enfermedad (Swayne et al, 1998). Es ampliamente reconocido que la respuesta neutralizante de los anticuerpos puede ser diferente según la especie aviar, siendo en pollos superior que en otras especies aviares domésticas (Higgins, 1996). El reconocimiento de la HA tanto por células B y T está influido por la presencia de sitios de glicosilación en la HA (Jackson et al, 1994). Además, los oligosacáridos en la punta distal de la HA puede reducir la unión al receptor, afectando así la “absorción” del virus por las células presentadoras de antígenos (Eisenlohr et al, 1987).

El grado de protección obtenido por la HA generalmente refleja la relación inmunológica entre la HA de la vacuna y del virus desafiante. Sin duda, la respuesta de los anticuerpos y la inmunidad protectora en aves domésticas están muy relacionadas con el virus desafiante del subtipo homólogo de la HA presente en la vacuna (Webster et al, 1991; Beard et al, 1991; Swayne et al, 1997b). Una identidad relativamente alta (87%) entre las secuencias de aminoácidos de la HA de la vacuna y del tipo desafiante ha sido correlacionada con la disminución en la liberación del virus desde el tracto respiratorio en aves domésticas (Swayne et al, 2000a).

De acuerdo con estos descubrimientos, las vacunas han sido desarrolladas para apuntar especialmente a la respuesta de anticuerpos contra la HA.

Las proteínas NP y M1 también provocan respuestas del tipo celular y humoral. Sin embargo, debido a la localización interna de estos componentes, los anticuerpos específicos parecen ser incapaces de neutralizar el virus (Yewdell y Hackett, 1989) y no protegen de los signos clínicos y la muerte (Bruh et al, 1979; Webster et al, 1991).

Se han realizado relativamente pocos estudios sobre la respuesta inmune celular frente a los virus aviares y la mayoría de ellos han usado al ratón como modelo. Tanto la HA como la NA estimulan la inmunidad mediada por células T. Mientras que la respuesta de los linfocitos T citotóxicos puede reducir la liberación viral en el caso de IABP virus, esta evidencia es más cuestionable en el caso de virus de IAAP (Suárez y Schultz-Cherry, 2000).

Seo y Webster (2001) demostraron que la reacción cruzada de la inmunidad celular inducida por una vacunación experimental contra virus de IA H9N2 (el que fue conocido más tarde por circular junto con el virus de IA H5N1 en Hong Kong en 1997), protegía pollos de los signos clínicos de la enfermedad inducida por una infección letal con virus de IA H5N1, pero permitía la liberación del virus por las heces, perpetuando la circulación de virus de IA H5N1. Las células T CD8+ fueron reconocidas como las principales células efectoras de la inmunidad protectora contra los signos clínicos de la enfermedad.

Prevención de la enfermedades aves por la vacunación:

Las medidas tomadas para prevenir, controlar y erradicar la IA varían desde casi no tomar acciones en el caso de IABP, hasta costosos programas enfocados en la cuarentena estricta y la matanza masiva de aves, en el caso de IAAP.

El uso de vacunas para controlar la IA ha sido ampliamente debatido. Aunque no está oficialmente prohibida, la vacunación de aves domésticas contra infecciones con IABP que no sean causadas por subtipos H5 / H7 es realizada sólo ocasionalmente. Aunque existe un

acuerdo general sobre la necesidad de dejar de aplicar vacunas específicas, la inmunización en pavos y pollos ha sido efectiva contra la infección con los subtipos H5 / H7 de virus de IABP e IAAP (Tollis y Di Trani, 2002).

Se han tomado consideraciones científicas, técnicas, económicas o sociales para explicar los distintos enfoques del uso de vacunas. Las principales limitaciones de su uso incluyen la interferencia con los esfuerzos por la erradicación (dificultad para diferenciar aves vacunadas de infectadas y riesgo de enmascarar virus de IAAP por virus de IABP) y la calidad inadecuada de las vacunas (composición y potencia relativa). Además, ha sido probado que pollos inmunizados contra virus de IAAP pueden excretar variantes virulentas luego de ser desafiados con virus vivo (Hinshaw et al, 1990). El riesgo de generar variantes antigénicas que posean una ventaja selectiva en presencia de bajos niveles de anticuerpos puede ser una consecuencia muy probable del uso de vacunas pobremente inmunogénicas en el campo. La prevención incompleta de la excreción del virus y la presión inmune sobre diferentes epítomos de la molécula de HA podrían ser responsables de este fenómeno.

Los argumentos para el potencial uso de las vacunas se apoyan principalmente en las consecuencias económicas y sociales que implican los brotes de IA. Si uno toma muy a la ligera la mutación de virus de IABP, especialmente en circunstancias de brotes continuos y generalizados, el riesgo potencial debido a virus de IABP puede ser considerado incluso mayor comparado con virus de IAAP. En relación a esto, la definición de la IA y sus medidas de control adecuadas deberían ser reconsideradas a nivel internacional (Tollis y Di Trani, 2002).

Desde 1970, las vacunas inactivadas han sido usadas ampliamente en Estados Unidos contra virus de IABP (que no sean H5 ni H7) (Price, 1982; Mc Capes and Bankowski, 1987; Halvorson, 1998). Particularmente, un gran número de dosis de vacunas han sido usadas en Minesota entre 1979 y 1997 para controlar brotes de IABP en pavos (Halvorson, 1998). Werner (1999) reportó el uso de una vacuna inactivada H9N2 para inmunizar pavos durante diversos brotes de IA en Alemania. Vacunas inactivadas con virus H6N2 y H9N2

están actualmente autorizadas en Italia y han sido usadas repetidamente en el campo (Zanella et al, 1981; D'Aprile, 1986; Papparella et al, 1995, 1996).

Las vacunas producidas con virus H5 y H7 de alta y baja patogenicidad fueron prohibidas en Estados Unidos desde finales de los '80 hasta 1995, cuando una vacuna autógena inactivada fue usada en Utah para controlar diversos brotes de H7N3 IABP que ocurrieron en pavos (Pomeroy, 1995). Una vacuna recombinante de viruela aviar (fowlpox) que contiene hemoaglutinina H5 de virus de IA está registrada en Estados Unidos, México y El Salvador. Desde 1998, esta vacuna ha sido usada en México en el programa de control contra la LPAI causada por virus H5N2 (Tollis y Di Trani, 2002).

Una vacuna inactivada hecha a partir del virus IAAP A/ Ck/ Pakistan/ 95 (H7N3) ha sido usada en Italia, en el intento por erradicar la IABP causada por virus H7N1 (Capua et al, 2000c). El programa de vacunación fue redactado y aprobado por la Comisión Europea después de los brotes de IABP, IAAP y nuevamente IABP ocurridos en Italia entre 1999 y el 2000. Luego de la despoblación completa del área infectada, la vacunación de aproximadamente 6 millones de razas de aves de carne y huevo, debería ser capaz de reducir la presión infecciosa de los virus de IABP, particularmente fuerte debido a una concentración extremadamente alta de granjas. Esta propuesta representó también el primer ejemplo del uso de una vacuna “marcador natural” para controlar IA. El uso de un tipo de vacuna viral con un subtipo diferente de NA, permitiría discriminar aves vacunadas de infectadas, sin interferir con ningún programa de vigilancia ya implementado (Tollis y Di Trani, 2002).

La vacunación de aves domésticas con vacunas virus – inactivado fue ampliamente realizada en México (García et al, 1998) y Pakistán (Naeem, 1998) para enfrentar emergencias causadas por virus H5N2 y H7N3 IAAP, respectivamente.

Características generales de las vacunas:

Se han desarrollado vacunas producidas convencionalmente y derivadas de la biotecnología, y muestran otorgar protección contra la enfermedad y la infección causada por virus de IA.

Las vacunas inactivadas son preparaciones líquidas de fluidos alantoideos cosechados desde cultivos de huevos, inactivados por formalina o betapropiolactona, administrado por vía parenteral. Asumiendo que es proporcionada una potencia adecuada, estas vacunas pueden inducir una fuerte respuesta humoral, la cual es muy efectiva protegiendo aves contra IA (Brugh et al, 1979; Wood et al, 1985; Swayne et al, 1999).

En estudios experimentales, vacunas variantes de cowpox (vaccinia) o de baculovirus que expresan HA han demostrado proveer buena protección contra la infección letal por los subtipos H5 y H7 aviaries (Chambers et al, 1988, Crawford et al, 1999). Vacunas recombinantes de viruela aviar (fowlpox) que expresan HA o proteínas HA/NP de los subtipos H5 y H7 fueron testeadas y demostraron ser eficaces en pollos (Beard et al, 1991; Webster et al, 1991, 1996; Swayne et al, 1997b, 2000a; Boyle et al, 2000). Sin embargo, Swayne et al (2000b) demostraron que la protección proporcionada por vacunas HA recombinantes con viruela aviar es reducida en pollos previamente vacunados contra viruela aviar o expuestos a cepas de campo de virus pox (fowlpox).

Recientemente, la vacunación de pollos con virus infeccioso recombinante de laringotraqueítis que expresa el gen de la HA del virus H5 IAAP aislado en Italia en 1998, ha proporcionado protección frente el desafío letal con dos virus diferentes H5 IAAP (Lüschow et al, 2001).

La expresión de la proteína HA en plantas transgénicas ha sido recientemente indicada como una nueva estrategia para la inmunización de aves domésticas ya que la vacunación oral con diferentes preparaciones, vivas o inactivadas, ha demostrado otorgar protección contra IA en pollos (Crawford et al, 1998).

V.17. Diagnóstico Clínico

Revisar el cuadro clínico anteriormente descrito.

En general:

- Depresión severa, inapetencia
- Marcada disminución de la producción de huevos
- Edema facial con crestas y barbillas tumefactas y cianóticas
- Hemorragias petequiales en las superficies de las membranas internas
- Muertes súbitas (la mortalidad puede alcanzar 100%)
- Aislamiento del virus necesario para un diagnóstico definitivo.

Diagnóstico diferencial (OIE, 2002)

- Cólera aviar agudo
- Forma velogénica de la enfermedad de Newcastle
- Enfermedades respiratorias, especialmente laringotraqueítis infecciosa.

En general, el período de incubación es de 3 a 5 días (OIE, 2002)

V.18. Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de laboratorio para influenza aviar está basado en el aislamiento e identificación del virus, y en la detección de anticuerpos específicos contra el virus. El método básico de aislamiento para virus influenza es la inoculación en huevos embrionados (Pearson y Senne, 1981). Para la identificación de anticuerpos en suero es utilizada la inmunodifusión en agar gel (IDAG) y el test de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) (Pearson y Senne, 1986). Con el pasar de los años se han ido agregando distintas técnicas de laboratorio, destacando el cultivo celular; el Ensayo Inmunoabsorbente Asociado a Enzima (ELISA); y la Transcripción Reversa seguida de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

La OIE es la encargada de dar las directrices de los métodos de laboratorio oficiales que deben ser utilizados para determinar la presencia de influenza aviar. Para la identificación del agente se piden específicamente tómulas traqueales y cloacales de aves vivas, o de distintos órganos y heces en el caso de aves muertas (recordar principales lugares de replicación del virus). Cada muestra es depositada en una solución de antibióticos. Las muestras deben ser inoculadas en huevos embrionados ruta alantoídea, incubados, y el líquido alantoídeo cosechado debe ser evaluado para determinar si hay actividad hemoaglutinante. El aislamiento en huevos embrionados puede ser reemplazado (bajo ciertas circunstancias) por RT-PCR. Para la subtipificación del virus, el laboratorio debe contar con antiseros específicos preparados contra los antígenos aislados de cada una de las 16 HA y de las 9 NA de los subtipos de influenza A (OIE, 2005). En el caso de Chile, para el monitoreo y vigilancia de IA, se utilizan estos métodos.

El procedimiento comienza con la colección de muestras (tómulas o distintos órganos). Las tómulas cloacales o traqueales pueden ser agrupadas de a cinco en un mismo tubo. Este tubo debe contener un medio adecuado, caldo infusión cerebro – corazón, que incluye una batería de antibióticos (Pearson y Senne, 1986). Dichos antibióticos tienen como fin prevenir y eliminar la presencia de microorganismos que pudieran afectar la lectura final de la muestra. Las muestras son mantenidas en hielo en el campo y en un refrigerador a 4° C en el laboratorio antes de la inoculación de huevos (Halvorson et al, 1983). Una vez en el laboratorio los tubos que contenían las tómulas son centrifugados. Huevos fértiles de 9 a 11 días, libres de patógenos específicos, son inoculados con la muestra ruta alantoídea. El sobrante de muestra es congelado hasta que termine el estudio completo. Los huevos son incubados a 37° C por unos 4 días. Los que mueran el primer día son descartados. Luego el líquido alantoídeo es cosechado en una cámara de seguridad y es procesado para realizar el test de hemoaglutinación. Si la prueba de hemoaglutinación resulta positiva se realiza el test de inhibición de la hemoaglutinación. (Pearson y Senne, 1986). Destacar que luego del aislamiento, generalmente es necesario uno o más pasajes del virus en huevos embrionados para lograr obtener títulos hemoaglutinantes suficientemente altos que permitan realizar la IHA (Palmer et al, 1975).

El test de hemoaglutinación se puede realizar debido a la presencia de espículas (HA) que rodean la envoltura de los virus influenza, las cuales tienen la propiedad de aglutinar diferentes eritrocitos o glóbulos rojos (pollo, ganso, entre otros). La unión específica del anticuerpo al sitio antigénico en la molécula de la hemoaglutinina interfiere con el enlace de la HA viral con los receptores en los eritrocitos, denominándose a este efecto IHA (Jawetz et al, 1992).

El test de HA es realizado en placas de microtitulación, mezclando la suspensión muestra con un buffer, diluyéndolo y luego agregando eritrocitos para evaluar una posterior actividad hemoaglutinante (OIE, 2005). La prueba de IHA es realizada en placas de microtitulación, mezclando una cantidad estandarizada de antígeno con antisueros diluidos en forma seriada doble. Posteriormente se debe añadir eritrocitos para determinar una unión específica del anticuerpo a la molécula de hemoaglutinina. Este análisis permite determinar los subtipos de virus influenza A (ya que ocupa antisueros específicos) (Palmer et al, 1975). La prueba es muy confiable, pero es necesario que los antisueros de referencia se preparen basándose en cepas vacunales, que corresponden a las que circulan anualmente en forma mayoritaria alrededor del mundo, al fin de poder obtener resultados comparativos. La hemoaglutinación es positiva cuando los eritrocitos permanecen en suspensión, en el mismo momento de lectura en que el control de eritrocitos está precipitado totalmente. La inhibición de la hemoaglutinación se da si ocurre una reacción antígeno – anticuerpo (se inhibe la hemoaglutinación de los eritrocitos) (OPS, 2003).

Microorganismos hemoaglutinantes

Al hablar de diagnóstico de laboratorio y destacar la HA y la IHA como pruebas de elección para determinar la presencia de virus influenza, se hace necesario tener en cuenta otros organismos hemoaglutinantes que pudieran afectar los resultados de estos test. En el caso de las aves destacan con gran capacidad hemoaglutinante los Micoplasmas. Estas bacterias no poseen pared celular y son bastante lábiles. *M. gallisepticum* y *M. sinoviae* son patógenos para gallinas y pavos; *M. meleagridis* y *M. iowa* son patógenos sólo para pavos. Una de las pruebas diagnósticas de elección es precisamente la IHA (comunicaciones personales Hidalgo, 2005). En la línea de los virus destaca la enfermedad de Newcastle,

producida por un paramyxovirus. La envoltura de este virus está cubierta con espículas cuyas glicoproteínas son las responsables de las actividades de hemoaglutinación, neuraminidasa y hemólisis (Carter et al, 2005).

Otros microorganismos con capacidad hemoaglutinante en aves son los *Haemophilus paragallinarum* (Coriza Infeccioso), algunos Coronavirus (Bronquitis Infecciosa), y en menor medida Salmonellas y E. coli.

Cultivo Celular

Es otro tipo de aislamiento (además de la inoculación de huevos embrionados). Presenta la ventaja de amplificar en gran escala el virus, para poder utilizarlo en distintas pruebas. Las células MDCK (Madin – Darby Canine Kidney) son las más apropiadas para el aislamiento del virus influenza. El uso de los sistemas celulares requiere la presencia de tripsina para activar las moléculas de HA y garantizar la penetración viral (Jawetz et al, 1996).

Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG)

Los test de inmunodifusión son usados para identificar anticuerpos contra virus influenza tipo A. La inmunodifusión es el método de elección para monitorear sueros en busca de anticuerpos contra virus influenza (Pearson y Senne, 1986).

Todos los virus influenza A tienen, antigénicamente, nucleocápside y matriz similares. Este hecho permite que tanto la presencia o ausencia de anticuerpos contra cualquier virus Influenza A sea detectada por el test de Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG). Las preparaciones concentradas de virus contienen antígenos de matriz y nucleocápside (OIE, 2005). El antígeno es preparado con membrana corioalantoidea de huevos fértiles inoculados con virus influenza A. Esta membrana es homogenizada, congelada y descongelada, tratada con glicina. El antígeno resultante es inactivado con beta – propiolactona. El suero de control positivo es preparado gracias a la inoculación intravenosa de virus influenza A en pollos. En total son realizadas 3 inoculaciones con 2 semanas de diferencia cada una. El test de inmunodifusión es realizado usando solución de agar agarosa preparado en buffer fosfato salino (PBS). Esta solución es depositada en placas petri y posteriormente cortada con patrones en roseta con un círculo central y seis

ruedas alrededor. Para el test serológico, el antígeno es depositado en el círculo central, y los sueros de control positivo son colocados a cada lado de los sueros de muestra que deben evaluarse. En total pueden ser testeados 3 sueros por cada roseta (Pearson y Senne, 1986). Después de 24 a 48 horas pueden ser observadas líneas de precipitación entre el control positivo, el suero problema y el antígeno de nucleocápside. Estas líneas son mejor observadas con un fondo oscuro e iluminadas desde atrás. Un resultado positivo es detectado cuando la línea de precipitación entre el control positivo conocido es continua con la línea entre el antígeno y el suero problema (OIE, 2005).

Cualquier suero o yema de huevo puede ser testeada con inmunodifusión. Las muestras de yema son preparadas en una dilución con PBS, mezcladas y centrifugadas. El sobrenadante amarillo es utilizado como muestra (Pearson y Senne, 1986).

Ensayo Inmunoabsorbente Asociado a Enzima (ELISA)

El Ensayo Inmunoabsorbente Asociado a Enzima fue desarrollado para una rápida y eficiente detección de anticuerpos contra virus de IA (Lamichhane y Kirkegaard, 1997).

Existen diversos kits comerciales para la realización de esta prueba, cada uno posee su propio instructivo.

La metodología general según Lamichhane y Kirkegaard (1997) es descrita a continuación: El test incluye una microplaca de 96 pocillos que viene con un antígeno específico de IA. El suero problema es diluido e incubado en la placa por 30 minutos. La placa es lavada 3 veces con una solución de lavado. Un conjugado estándar es incubado por 30 minutos a temperatura ambiente (21° C), La microplaca es lavada de la misma forma mencionada anteriormente. Un sustrato es incubado en los pocillos por 15 minutos. La reacción con el sustrato debe ser detenida, por ejemplo, con Sodio Dodecil Sulfato (SDS) al 1%. La interpretación se realiza en un lector de densidad óptica, registrando las lecturas de la placa y calculando si las muestras son positivas o negativas según explique el instructivo.

RT – PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa)

Muchos virus de importancia clínica contienen ARN en su genoma (en vez de ADN). Este es el caso del virus influenza, y es por esto que se hace necesario agregar un paso más al procedimiento estándar de la PCR (Suárez, 1997). La PCR es un método altamente específico y sensible que garantiza la amplificación de un número bajo de copias del genoma viral, pudiendo ser aplicadas directamente a muestras clínicas para la identificación de diferentes subtipos de virus y para la caracterización de virus multiplicados en huevos embrionados o cultivo de tejidos, utilizando para ello cebadores específicos de subtipo, que son regiones complementarias altamente conservadas de los genes (Cox y Bender, 1995; Wright et al, 1995). El proceso consiste en la repetición del ciclo de síntesis de ADN que cuenta con tres secuencias: desnaturalización de la cadena molde por calor, hibridación de los cebadores al ADN desnaturalizado y extensión o polimerización de la nueva cadena de ADN a partir del cebador por una polimerasa. La amplificación se realiza utilizando oligonucleótidos cebadores, que flanquean la región diana e hibridan en cadenas opuestas del ADN. Los productos de cada ciclo de síntesis son utilizados como molde en el ciclo siguiente, por lo que la amplificación presenta una cinética exponencial (Wright et al, 1995; Class et al, 1992).

El paso extra realizado en la RTPCR permite amplificar una pequeña cantidad de moléculas diana de ARN (tanto ARNm como ARN total) con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del ARN a ADN. La transcripción reversa funciona gracias a la acción de la enzima Transcriptasa Reversa. La preparación de ARN para la amplificación inicial con transcriptasa reversa es crucial y a veces es uno de los pasos que más ocupa tiempo en el procedimiento completo (Suárez, 1997).

La RTPCR puede ser usada para lograr 3 objetivos distintos: identificación primaria (tipificación) de influenza; subtipificación de los aislados; y la determinación de factores específicos de patogenicidad. Es importante mencionar que este test no ha mejorado la sensibilidad sobre los métodos de aislamiento viral, por lo que el aislamiento sigue siendo la prueba estándar para la detección de influenza (Suárez, 1997).

Determinación de la patogenicidad

Para la determinación de la patogenicidad de un aislado de virus influenza es realizada la inoculación en pollos. Se prepara una dilución de líquido alantoídeo positivo a influenza, la cual es luego inoculada (0,2 ml) en 8 pollos susceptibles de 4 a 8 semanas de edad vía saco aéreo torácico caudal. Estos pollos son observados por los siguientes 8 días, manteniéndose siempre en jaulas plásticas de aislamiento bajo presión negativa. Sólo son abiertas en caso de que algún pollo muera. Los pollos moribundos y muertos son necropsiados para buscar evidencia de lesiones de influenza. Si seis o más pollos de los 8 inoculados mueren y tienen las lesiones correspondientes, el aislado es clasificado como influenza aviar altamente patógena (IAAP) (Pearson y Senne, 1986).

V.19. Prevención (recomendaciones de la OIE, 2002)

No hay tratamiento.

Sanitaria:

- Evitar el contacto entre aves de corral y aves salvajes, en particular aves acuáticas
- Evitar la introducción en las explotaciones de aves cuya situación sanitaria se desconoce
- Control de los desplazamientos humanos
- Métodos adecuados de limpieza y desinfección
- Se recomienda la cría de un grupo de edad por explotación.

Médica:

Evaluar vacunación según cada país.

En los focos:

- Sacrificio de todas las aves
- Eliminación de las canales y todos los productos animales
- Limpieza y desinfección
- Esperar al menos 21 días antes de la repoblación.

V.20. Captura de patos silvestres

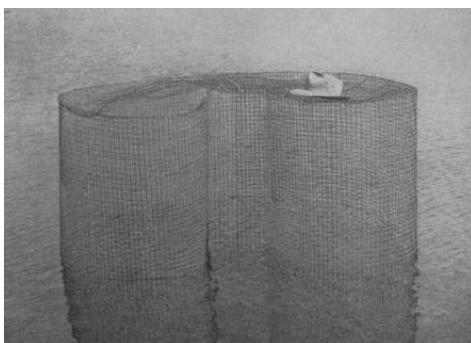
Capturar, marcar, y liberar aves acuáticas para su subsecuente recuperación y observación entrega importante información sobre el movimiento, supervivencia, uso del hábitat y características generales de dichos animales.

Modelo de Trampa para Patos que Bucean:

Uno de los modelos más sencillos y antiguos, descrito en 1953 por Hunt y Dahlka, permite capturar patos que se sumergen en el agua. La ventaja de esta estructura es que elimina todas las esquinas, lugares donde los patos pueden congregarse y sufrir daño por aplastamiento y sofocamiento, llegando incluso a la muerte. Consiste en una cerca de alambre con una malla de 2 x 6 pulgadas. La mayoría de los alambres se ubican en forma vertical para otorgar soporte. Para reducir la mortalidad el alambrado es alineado con una malla para aves de cuatro pies de altura. El mismo tipo de malla es usado en los extremos superior e inferior de la trampa. La diferencia de 6 pulgadas entre las alturas de la estructura y la malla para aves permite que exista un agujero de escape en caso de que los niveles de agua fluctúen demasiado y puedan poner en peligro a las aves.

Los autores han afirmado que durante los inviernos de 1949 a 1951 fueron capturados 25.000 patos con este sistema o modificaciones de él, todos ellos en el “Lower Detroit River” (USA), lugar donde el agua fluctúa a lo más dos pies durante seis horas.

Figura 4. Modelo para Patos que Bucean



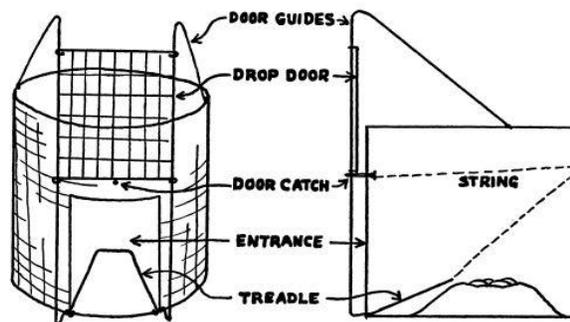
Fuente: Hunt y Dahlka, 1953

Modelo Automático de Trampa – Nido para Aves Acuáticas:

El modelo está principalmente enfocado a estudios de comportamiento reproductivo.

Este método es menos eficiente para atrapar patos que bucean, los cuales usualmente anidan sobre el agua con alta vegetación. Esta trampa está confeccionada con una cerca de alambre galvanizado, con una entrada de 5 a 6 pulgadas de ancho, y 8 a 12 pulgadas de alto. El diseño también incluye una puerta deslizante que es dirigida por dos piezas de alambre. El techo está hecho de alambre soldado. La puerta es activada cuando la hembra hunde un pedal conectado a un broche “liberador de puerta” por una cuerda (Weller, 1957).

Figura 5. Modelo Trampa – Nido Automático



Fuente: Weller, 1957

El tamaño de la trampa depende de las especies que se deseen capturar y de la ubicación del nido. Una trampa de 14 pulgadas de alto y 16 pulgadas de diámetro es recomendable para patos que bucean y anidan sobre montículos de vegetación rodeados de agua. Para patos que anidan en tierra se puede utilizar una trampa de 8 a 10 pulgadas de alto, ya que con frecuencia sus nidos están en depresiones poco profundas en el suelo (Weller, 1957).

Para prevenir el abandono por parte de la hembra, la trampa debe ser usada en nidos con huevos que llevan al menos 2 semanas de incubación. La trampa se estaca a la base del nido, dejando la puerta orientada hacia el lado más utilizado por la hembra para entrar al nido. Luego se ubica una almohada de material del nido sobre los huevos, en un intento de prevenir la ruptura de los mismos por la captura de la hembra. El área debe ser observada desde cierta distancia, cuando sea posible (Weller, 1957).

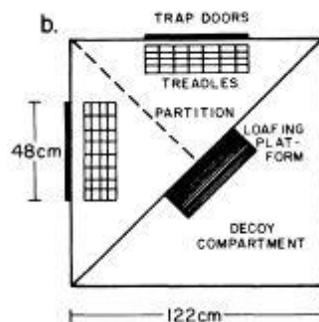
El autor no especifica la duración ni fecha exacta del estudio, pero menciona que fue realizado en Manitoba y Utah, USA. Este método permitió la captura de 6 patos cabeza roja (*Aythya americana*); 5 porrones de lomo cruzado o pato de lomo blanco (*Aythya valisineria*); 3 patos mallard (*Anas platyrhynchos*) y un pato colorado (*Anas cyanoptera*). Según el autor uno de los principales usos de esta trampa es para capturar hembras de cabeza roja, las cuales estaban poniendo huevos en los nidos de otros patos. Cuarenta y dos de estas hembras fueron capturadas.

Modelo de Trampa con Señuelo para Patos que Bucean:

Este diseño es más bien pequeño y portátil, y está enfocado principalmente a estudios reproductivos. Pueden ser estructuras redondeadas o cuadradas.

Las trampas se construyen con una malla de 2,5 cm. de alambre, que es curvada y unida en las esquinas con un cilindro de alambre inoxidable. Las puertas y pedales también son de alambre soldado y ocupan anillos de metal como bisagras. Las barras de activación son hechas de alambre duro y ajustadas (curvadas) para liberar (activar) la puerta cuando un peso apropiado es aplicado en el pedal, manteniéndose firme durante movimientos causados por el viento o por el señuelo. Las trampas se ubican a una profundidad suficiente en el agua para permitir que las aves señuelo naden sin problemas a través de las puertas abiertas. Se puede usar una única hembra de la especie objetivo como señuelo (Afton et al, 1980).

Figura 6. Modelo Cuadrado de Trampa con Señuelo para Patos que Bucean



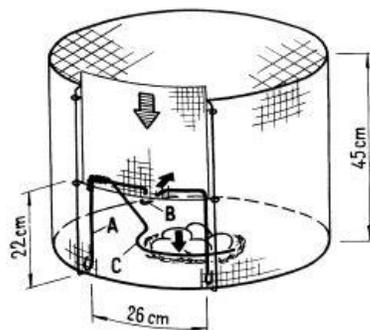
Fuente: Afton et al, 1980.

Este diseño fue utilizado en estudios entre los meses de abril y julio, los años 1976 y 1977. En ese período fueron capturados 78 patos de lomo blanco (*A. valisineria*); 155 cabezas rojas (*Aythya americana*); y 114 patos de pecho blanco o porrón bola (*Aythya affinis*) (Afton et al, 1980).

Modelo Puerta - Descendiente para Patos, Trampa Nido:

Este modelo es una modificación al desarrollado por Weller en 1957. Los cambios se centran en el mecanismo de activación (liberación) de la puerta, el cual operaría satisfactoriamente en cualquier tipo de vegetación. El mecanismo de liberación de esta trampa nido modificada consiste en una estructura rectangular (A) hecha de alambre de acero inoxidable del cual los extremos giran alrededor de una tira ubicada en la parte baja dentro de la trampa. Para mantener la puerta abierta, la estructura es doblada hacia arriba y la puerta es ubicada sobre una protrusión en la mitad de la estructura (B). En la esquina superior de la estructura de sostén, es fijado un alambre flexible irrompible, y el otro extremo (C) es curvado hacia abajo y ubicado en forma de arco en el borde del nido. Cuando una hembra pisa sobre el arco de alambre, la protrusión de la estructura se libera, la puerta cae y se cierra.

Figura 7. Modelo Trampa Nido



Fuente: Blums et al, 1983

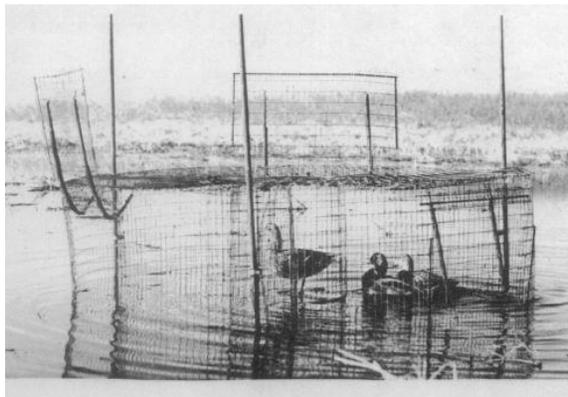
Esta trampa también es diferente a la de Weller en lo que se refiere al tamaño. La trampa es más alta, por lo que la puerta no sobresale por sobre la estructura completa. La entrada más amplia facilita el ingreso del pato a la trampa. Es recomendable aceitar el mecanismo una o dos veces por temporada para evitar que se atasque la puerta (Blums et al, 1983).

Este diseño permitió atrapar patos durante la época de reproducción entre 1978 – 1980, en el sector del Lago Engure, República de Letonia. Durante esos tres años fueron capturados 34 patos cuchara (no se describe la especie); 764 porrones común o europeo (*Aythya ferina*); y 370 porrones moñudo (*Aythya fuligula*), todas hembras (Blums et al, 1983).

Modelo de Trampa para la Época de Reproducción de Patos Mallard en Dakota del Norte:

Este modelo con un objetivo tan claro busca aumentar la efectividad de captura de patos, dado que según los autores (Sharp y Lokemoen) las trampas descritas por Anderson (198) y Blums et al. (1983) eran inefectivas para capturar patos que bucean, y sus túneles de entrada no eran los más óptimos. En general este modelo sería más confiable en el mecanismo de activación, adiciona un compartimento central de señuelos removible, aumenta el tamaño del compartimento de captura e incorpora una puerta - resorte de entrada; todo para construir una trampa con señuelo especialmente diseñada para capturar patos reales. Las puertas han sido diseñadas para operar independientemente y aumentar la posibilidad de múltiples capturas. El compartimento del señuelo (cilindro) tiene un anillo de alambre unido al extremo superior para facilitar así su remoción y el cambio de los señuelos vivos. La sensibilidad del sistema de activación ha sido ajustado para que el ave objetivo pueda activar la puerta, pero no es tan sensible como para que la puerta se cierre prematuramente debido a vibraciones del viento, movimiento de olas, o por el cierre de puertas de otros compartimentos (Sharp y Lokemoen, 1987).

Figura 8. Modelo para Patos Mallard



Fuente: Sharp y Lokemoen, 1987

El modelo fue utilizado en un estudio en Dakota del Norte, entre los meses de abril y agosto, los años 1980 y 1981, para evaluar principalmente la época de reproducción. Se capturaron 612 adultos y 42 juveniles mallard. Durante el mismo período (y aunque no era el objetivo principal) también fueron capturados 308 ánades friso o pato gris (*Anas strepera*) y 297 pato de alas azules (*Anas discors*) (Sharp y Lokemoen, 1987).

Modelo Portátil de Trampa para Patos:

Un ejemplo más actual de construcción de jaulas de captura lo da Malcolm Wilson (2005) en el artículo “A portable duck trap”. El diseño descrito consiste en una estructura cuadrada de 2 x 2 mts de ancho y 1 metro de alto, con una o dos entradas tipo embudo. Esta trampa puede ser trasladada en cualquier vehículo, y armada en unos 30 minutos como máximo. Puede capturar patos durante la noche y el día si se revisa cada 6 a 12 horas. Trampas más pequeñas de 1,5 x 1,5 metros también son utilizadas, y pueden ser enrolladas y guardadas en el maletero de la mayoría de los autos.

El diseño es una estructura de plástico, y en general incluye PVC en la zona de uniones, malla plástica para cubrir la trampa, cable y estacas de metal para anclarla al suelo.

Una vez que la trampa es colocada con el cebo (alimento por ejemplo), se debe revisar cada 6 a 12 horas, según de la densidad de aves presentes. Es recomendable revisarla desde la distancia usando binoculares para evitar la dispersión de aves que estén cerca del lugar.

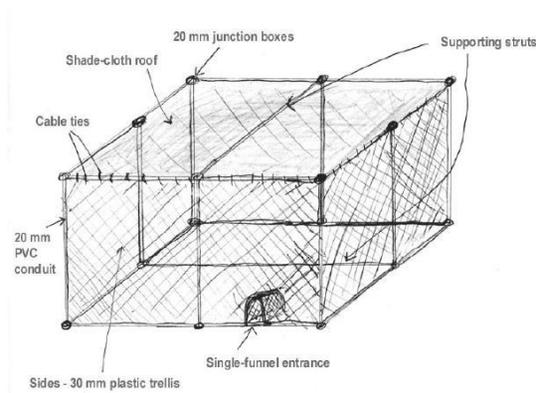
Indicaciones

- Es importante asegurarse de que la trampa no sea encontrada por gente que pueda robar las aves o por depredadores. Es preferible que la trampa no sea usada cerca de lugares públicos.
- No debe abandonarse la trampa permanentemente, a no ser que se haya removido un lado de ella (trampa afuncional) o pueda ser revisada por alguien de manera regular (diariamente).
- La trampa no debe ser ubicada donde exista el riesgo potencial de que aumenten los niveles de agua.

- La trampa puede ubicarse entre la vegetación o en áreas más expuestas, según la especie que se desee capturar.
- Es mejor ubicar la trampa en el margen de los cuerpos de agua (por ejemplo, la mitad sobre el agua y la mitad bajo el agua), con una profundidad no mayor a 1,50 mts. Debe ser cebada con maíz, dejando un rastro tentador desde la entrada tipo embudo (la cual debe estar en el agua) hasta el centro de la trampa.

El autor no describe estudios en patos con este diseño de trampa.

Figura 9. Diagrama de una trampa de patos portátil



Fuente: Wilson, 2005

VI. OBJETIVOS

Objetivo general:

Describir el proceso de captura, toma y procesamiento de muestras para el diagnóstico de Influenza Aviar en patos silvestres en la Quinta Región de Chile.

Objetivos específicos:

- Estandarizar el proceso de captura y toma de muestra en patos silvestres para la búsqueda del virus de IA.
- Desarrollar y describir las técnicas diagnósticas de inoculación en huevos embrionados SPF, necesarias para el aislamiento de virus de la IA.
- Realizar el procedimiento de hemoaglutinación (HA) para determinar la presencia de virus hemoaglutinante.
- En caso de detectar la presencia de virus hemoaglutinante, realizar la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) para identificar el virus presente.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1. Materiales Terreno

- Traje de agua (para la captura)
- Rejas de alambre (para fabricación de jaulas)
- Maíz chancado (para cebo)
- Tubos de ensayo con caldo infusión cerebro corazón (a 4° C) con antibióticos en la siguiente concentración:
 - Penicilina 2000 UI/ml
 - Estreptomicina 2 mg/ml
 - Gentamicina 0,16 mg/ml
 - Fungizona 0,04 mg/ml (anfotericina B)
- Tómulas estériles (para muestras orales y cloacales)
- Cajas isotérmicas
- Bolsas con hielo
- Guantes de látex
- Malla negra
- Alambre
- Cordel
- Fierros de 1-1,5 metros de largo
- Bolsa de tela para patos
- Anillo para marcar patos de distintos tamaños
- Alicata especial para anillos
- Regla
- Pesa

VII.2. Materiales Laboratorio

- Tubos con caldo infusión cerebro corazón con antibióticos en la siguiente concentración:
 - Penicilina 2000 UI/ml
 - Estreptomicina 2 mg/ml
 - Gentamicina 0,16 mg/ml
 - Fungizona 0,04 mg/ml (anfotericina B), y sus respectivas muestras de tómulas orales de pato
- Tubos de ensayo estériles
- Gradillas
- Pinzas estériles
- Tijeras estériles
- Plumón permanente
- Pipetas y micropipetas (de 50 µl, 100 µl, 500 µl, 1 ml, 5 ml)
- Pipeta multicanal (con capacidad para 50 µl)
- Puntas estériles de pipetas y micropipetas
- Medio CTT (caldo tris triptosa)
- Guantes de látex
- Congelador a -70° C
- Vortex
- Centrífuga con capacidad de 3000 rpm y temperatura de 4° C
- Filtros de 0,22 µm
- Cámara de bioseguridad Clase II
- Alcohol de 70° para desinfectar zonas de trabajo
- Huevos de pollo embrionados SPF, entre 9 y 11 días. (Universidad Austral de Chile)
- Ovoscopio
- Incubadora a 37° C
- Lápiz grafito o algún marcador

- Pieza oscura
- Algodón
- Alcohol yodado
- Taladro pequeño (para hacer un pequeño orificio en los huevos): Burgess® modelo V -73.
- Jeringas de tuberculina (estériles)
- UHU (pegamento transparente)
- Cámara refrigerada (4° C)
- Jeringas de 3 ml con sus respectivas agujas
- Riñón o recipiente para cáscara de huevos
- Bolsa plástica para desechos orgánicos
- Porta huevos de plástico
- Sangre de pollo fresca (5 ml), al 0,5%
- Buffer PBS 0,1 M pH 7,2:
 - Cloruro de Sodio 8,5 grs.
 - Fosfato de sodio dibásico anhídrido 1,33 gr.
 - Fosfato de sodio monobásico 0,22 gr.
 - Agua desionizada c.s.p 1.000 ml.
 - HCl 1N hasta lograr pH 7,2
- Micro placa de fondo redondo con 96 pocillos

VII.3. Métodos Terreno

Para la captura de patos silvestres se eligieron los humedales de Leyda, Los Molles, Colejuda y El Yali, en la zona de San Antonio, 5° región de Chile. La captura se realizó entre los meses de marzo y junio del 2007.

Instalación de jaulas:

1. Se eligió un lugar del humedal, cercano a la orilla y no profundo, para la instalación de las jaulas.
2. Se colocaron las rejas de alambre en forma circular o cuadrada, formando una jaula de unos 2 mt x 1,5 mt en el caso de las cuadradas, y unos 2 mts de diámetro en el caso de las circulares. Se fue haciendo presión sobre la jaula para que fuera quedando enterrada en el fango/barro.
3. Se dejó un espacio abierto para formar la entrada a la jaula, la cual se proyectó en forma de embudo o circular, preocupándose que vaya de más ancho a más angosto desde el exterior al interior. La parte más angosta debía permitir el ingreso de un pato.
4. Se depositó maíz chancado dentro de cada jaula y siguiendo el camino de la entrada.
5. Se ubicaron algunos patos de plástico (cebos) en ciertas jaulas.
6. Se instalaron 2 a 3 jaulas por humedal.
7. Durante los días siguientes se fueron a visitar las jaulas muy temprano en la madrugada para verificar si se había capturado algún pato. Idealmente se revisó primero con binoculares a una distancia considerable para no dispersar a las aves cercanas.

Es importante mencionar que las visitas se programaban 1 a 2 veces por semana, preocupándose de dejar la jaula afuncional si es que no se iba a visitar al otro día. Esto por el riesgo que pudieran correr los animales estando atrapados más de un día dentro de las jaulas.

Captura y Muestreo de Patos:

Al encontrar alguna jaula con un pato en su interior los pasos a seguir fueron los siguientes:

1. Se ingresó en la jaula para tomar al pato cuidadosamente con las manos.
2. Se sacó de la jaula y se depositó en una “bolsa para patos” de tela blanca.
En caso de existir más de un pato en la misma jaula se sacaron de a uno y se ubicaron dentro de una malla negra con forma de “U” invertida, afirmada por tres alambres que se enterraban en la tierra. En la parte superior de la malla había 2 aberturas para depositar al pato en su interior, las cuales luego se cerraban con sujetadores.
3. Se tomó la bolsa con el pato en su interior y se procedió a pesarlo (esto para registros internos). Seguido se sacó al animal de la bolsa para pesar la bolsa sola y así obtener un peso más exacto por diferencia.
4. Luego se realizaron distintas medidas a cada individuo: largo de alas, de cabeza, de pico, de tarso. Toda esta información quedó anotada en un registro de captura, el que también incluía datos de ubicación de la jaula, hora del hallazgo y todos los datos que se consideraran pertinentes.
5. Se colocó un anillo de identificación en la pata de cada individuo, el cual es totalmente no invasivo. Dicha información también quedó registrada, junto con la identificación de la especie animal.
6. Terminada la toma de datos “externos” se procedió a extraer sangre de la vena alar, la cual fue depositada en tubos para dicha función.
7. Seguido se tomaron cuidadosamente las muestras de tórculas orales/traqueales, cuidando de que la tórcula no tocara ningún sitio externo a la cavidad oral del animal.
8. Dichas tórculas fueron sumergidas en tubos con caldo cerebro/corazón, tapadas y guardadas en la caja isotérmica.
9. Luego se tomaron muestras con tórculas cloacales.
10. Terminado el muestreo completo se liberó al pato en su hábitat natural.

11. Todas las muestras y datos recolectados fueron llevados a las dependencias del SAG.
12. Los tubos con tómulas orales fueron llevados a la Unidad de Virología Pecuaria del Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias del SAG (Lo Aguirre), se ingresaron con su protocolo correspondiente y se congelaron a -70°C (o se refrigeraron a 4°C si es que se fueran a procesar antes de 48 horas).

Es necesario aclarar que esta memoria se centra en las muestras orales/traqueales de patos silvestres, sin embargo se mencionaron dentro de los procedimientos todos los pasos realizados durante las capturas, los cuales incluyen actividades para el desarrollo de otras tesis.

VII.4. Métodos Laboratorio

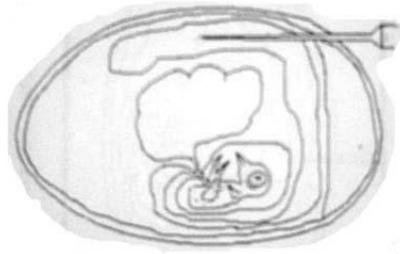
Inoculación en huevos embrionados:

1. Se trabajó con huevos embrionados SPF entre 9 y 11 días de incubación. En el interior de una sala temperada ($36^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$) se utilizó un ovoscopio para identificar la viabilidad del embrión y la cámara de aire de cada huevo. Se marcó su límite (cámara de aire) con un marcador o cualquier lápiz que pueda rayar la cáscara del huevo. Se guardaron nuevamente en una incubadora.
2. Se sacaron del congelador (-70°C) o del refrigerador a 4°C (en caso de que las muestras lleven menos de 48 horas) los tubos con las tómulas de cada muestra oral de patos. Se esperó hasta que se descongelaran.
3. Se marcaron tubos de ensayos estériles con el n° de protocolo de cada muestra (en el paso 6 se especifica el total de tubos).
4. Se abrieron los tubos con las tómulas y se sacaron con una pinza estéril. Se desecharon las tómulas en un recipiente adecuado para desechos orgánicos.
5. Se sacó cantidad suficiente de cada muestra (de los tubos que tenían las tómulas) para lograr depositar 1 ml final en cada tubo marcado con el n° de protocolo correspondiente. Hay que destacar que se pueden hacer pools de hasta 5 muestras

por protocolo, es decir, un tubo puede incluir hasta 5 muestras de un mismo protocolo. Si hay mayor número de muestras correspondientes a un mismo protocolo, se debe marcar un tubo de ensayo adicional. Por ejemplo: hay 7 muestras del protocolo A. Se marca un tubo con la letra A y otro A.1. En el primero se pueden incluir las 5 primeras muestras (200 µl de cada una) y en el segundo las 2 muestras que quedaban (500 µl de cada una).

6. Una vez colocado el líquido muestra en el tubo correspondiente, se agregó a éstos CTT en proporción 1:1 en relación al líquido muestra, es decir, 1 ml por tubo. Finalmente cada tubo quedó con 1 ml de muestra + 1 ml de CTT.
7. Se dejaron incubar los tubos tapados una hora a temperatura ambiente, para permitir la acción de los antibióticos.
8. Los tubos con el caldo cerebro – corazón que tenían originalmente las tómulas se volvieron a congelar tapados en caso de necesitarlos nuevamente.
9. Pasada la hora de incubación se tomaron los tubos y se centrifugan durante 10 minutos, a 3000 rpm, a 4° C.
10. Mientras se centrifugaban los tubos se fueron a buscar los huevos a la incubadora y se desinfectó la zona a perforar con alcohol yodado (marcada en el paso 1)
11. Con el taladro (previamente desinfectado) se hizo un pequeño orificio sobre la zona marcada.
12. Cada huevo se rotuló con el número de protocolo y muestra correspondiente (misma rotulación que se le había hecho a los tubos). Eso sí, es muy importante mencionar que deben rotularse 5 huevos por muestra.
13. Las muestras ya centrifugadas se fueron inoculando en los huevos SPF marcados (9 a 11 días de incubación) utilizando jeringas de tuberculina, con 0,2 ml cada uno, vía cavidad corioalantoídea. Se utilizó el orificio hecho por el taladro para facilitar la inoculación. Recordar que deben inocularse 5 huevos por muestra.

Figura 10. Vía de inoculación corioalantoídea



Fuente: Guía de Laboratorio de Enfermedades Virales. UVM

14. El orificio hecho por el taladro se tapó con pegamento transparente (UHU).
15. Se incubaron los huevos por 5 días (37° C), preocupándose de observar una vez al día cada huevo con el ovoscopio.
16. Las muertes embrionarias producidas dentro de las primeras 24 horas se descartan por ser inespecíficas y desechan, dado que el virus de la IA tarda más de 24 horas en matar al embrión de pollo.
17. Todos los embriones muertos luego de las primeras 24 horas de incubación se abrieron dentro de la cámara de bioseguridad y se les realizó la prueba de hemoaglutinación.
18. Al quinto día se sacaron los huevos de la incubadora y se colocaron en una cámara refrigerada (4° C) por 3 horas.
19. Pasadas las 3 horas los huevos fueron llevados dentro de la cámara de bioseguridad, desinfectados con alcohol yodado y abiertos por la cámara de aire, utilizando tijeras o pinzas estériles.
20. Se recolectó líquido alantoídeo de cada huevo, cantidad suficiente para hacer un total de 3 ml por muestra (por ejemplo, si sobrevivieron los 5 huevos por muestra, se sacaron unos 0,6 ml por cada huevo). Es posible utilizar la misma jeringa si se está recolectando líquido alantoídeo de huevos pertenecientes a una misma muestra.
21. Se depositaron los 3 ml en un tubo de ensayo estéril rotulado con el número de protocolo y de muestra correspondiente a la rotulación de los huevos de donde obtuve el líquido. Se sigue el mismo procedimiento con cada grupo de huevos pertenecientes a una misma muestra.

22. Los tubos rotulados y con el líquido obtenido de los huevos fueron bien tapados y puestos en una centrífuga a 3.000 rpm, por 10 minutos a 4° C.

Hemoaglutinación:

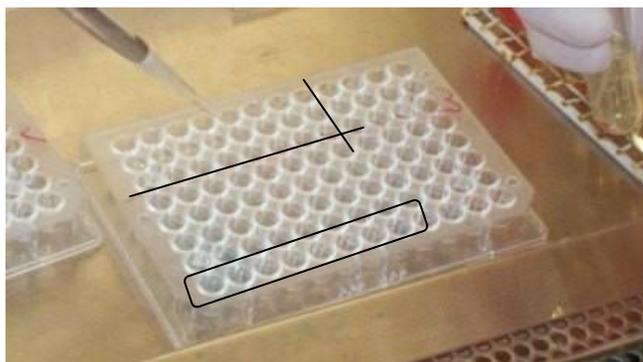
1. Se obtiene sangre de pollo (5 ml) en solución Alsever (anticoagulante)
2. Se lava la sangre tres veces con PBS de la siguiente manera:
 - En un tubo de ensayo estéril se mezclaron 3 ml de sangre de pollo con 3 ml de PBS y se homogenizaron suavemente
 - Se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 minutos.
 - Se eliminó el sobrenadante del tubo
 - Se agregó nuevamente PBS y se repitió el proceso 2 veces más.
3. En un tubo de ensayo estéril se mezclaron 10 ml de PBS con 50 µl del pellet de glóbulos rojos obtenido del proceso anterior.
4. Se homogenizó suavemente
5. Con la mezcla anterior se obtuvo una solución de glóbulos rojos de pollo al 0,5 %.
6. Bajo la cámara de bioseguridad, en una microplaca de fondo redondo estéril, se agregaron 50 µl de PBS en cada pocillo de la siguiente forma:
 - Hacia el lado (columnas), tantos pocillos como tubos se llenaron y se centrifugaron en el paso 22 de “inoculación de huevos embrionados”
 - Hacia abajo se llenaron 3 filas (A, B, C)
 - La última fila de la microplaca también lleva PBS (H)

EJEMPLO: Si se tienen 8 muestras centrifugadas (8 tubos):

Llenar 3 filas hacia abajo (hasta la letra C) y llegar hasta la columna nº 8 hacia el lado. En total se llenan 22 pocillos con PBS, 50 µl en cada uno.

Luego llenar la última fila, marcada en la placa con la letra H, también con 50 µl cada pocillo.

Figura 11. Microplaca



Fuente: Unidad de Virología Pecuaria, SAG, Lo Aguirre.

7. Se tomó el primer tubo rotulado (paso 22 de “inoculación en huevos embrionados”) y se sacaron 50 μ l de su contenido el cual fue depositado en el primer pocillo (A1). Su utilizó una micropipeta con puntas estériles.
8. Se tomó el segundo tubo rotulado y se sacaron (con una nueva punta estéril) 50 μ l de su contenido y se depositaron en el segundo pocillo (A2)
9. Así se va haciendo con cada tubo hasta completar toda la fila hacia el lado. Se congelaron los tubos a -70° C una vez que ya fueron utilizados.
10. Ahora quedaron 100 μ l en cada pocillo, excepto en la última fila que aún tiene 50 μ l de PBS y nada más.
11. Se hicieron 3 diluciones mezclando hacia abajo a partir de la 1° fila, sacando 50 μ l cada vez y pasándolo a la fila siguiente. Para facilitar este procedimiento se utilizó una pipeta multicanal.
12. Los 50 μ l de la 3° fila (fila C) que se sacaron y mezclaron se eliminan, ya que las diluciones llegan sólo hasta allí.
13. Finalmente se agregaron 50 μ l de la solución de glóbulos rojos (al 0,5 %) a cada pocillo con contenido, incluyendo los de la última fila, dado que esta fila es la denominada “control de glóbulos rojos”.
14. Se dejó la microplaca en la cámara de bioseguridad por una hora a temperatura ambiente para esperar la reacción.

15. Pasada la hora se observó la placa para ver si existía hemoaglutinación (se ve una malla al fondo de la placa) o si el resultado era negativo (se ve un botón de glóbulos rojos al fondo de la microplaca).

Es importante mencionar que para diagnóstico de influenza aviar por este método se necesita realizar un segundo pasaje en huevos:

1. Retomamos los tubos que fueron congelados a -70°C luego de utilizar una pequeña porción de su contenido en la hemoaglutinación.
2. Al recibir nuevas muestras para inocular en huevos se procedió a sacar del congelador los tubos antes mencionados (paso 1), así aprovechamos de inocular todo un mismo día.
3. Se agregaron 2,25 ml de CTT a un tubo estéril rotulado según la información de cada muestra (las muestras que habíamos congelado para el 2° pasaje)
4. Se obtuvieron 250 μl del líquido alantoideo de los tubos y se colocaron en los nuevos tubos de ensayo con CTT. Para ello ocupamos micropipetas con puntas estériles, las cuales se fueron cambiando por cada muestra.
5. Agitamos cada tubo en un vortex para mezclar bien.
6. Se pueden refrigerar los tubos a 4°C hasta que esté todo listo para la inoculación de huevos (máximo 48 horas refrigeradas, si no congelar a -70°C).
7. A partir de este punto se continúa el procedimiento como si fueran para un 1° pasaje (desde el paso 7 de “inoculación en huevos embrionados”).

VIII. RESULTADOS

Resultados de captura:

Se logró un total de 66 muestras de patos silvestres en los humedales antes mencionados de la zona de San Antonio, entre los meses de marzo y junio del 2007.

Las muestras se describen a continuación:

Tabla 2. Identificación de las muestras de patos silvestres.

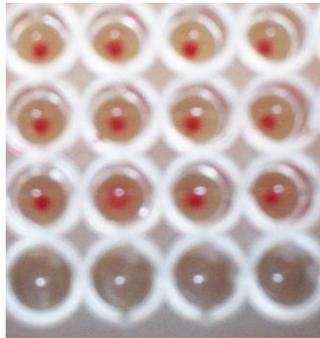
FECHA	ID. MUESTRA	ESPECIES					TOTAL
		Jergón Grande (<i>Anas georgica</i>)	Jergón Chico (<i>Anas flavirostris flavirostris</i>)	Gargantillo (<i>Anas bahamensis rubirostris</i>)	Pato Real (<i>Anas sibilatrix</i>)	Pato Colorado (<i>Anas cyanoptera</i>)	
15 de marzo	3004	7		3			10
21 de marzo	3111		3				3
26 de marzo	3452	1					1
2 de abril	3878	1		1			2
9 de abril	3960		1	8			9
17 de abril	4343	14	1	5	1		21
25 de abril	4773	7		5			12
8 de mayo	5198			5			5
15 de mayo	5444			2			2
19 de junio	6863					1	1
TOTAL FINAL							66

Resultados aislamiento de virus:

Las 66 muestras fueron procesadas ocupando cultivo virológico de tórculas orales (descrito anteriormente). No hubo mortalidad ni lesiones de los embriones en ninguno de los casos. Tampoco hubo actividad hemoaglutinante en ninguno de los líquidos alantoídeos de los huevos embrionados SPF.

En resumen, no se evidenció nada consistente con la presencia de virus de Influenza Aviar.

Figura 12. Botón de glóbulos rojos, indicando resultado negativo en el test de HA.



Fuente: Unidad de Virología Pecuaria, SAG, Lo Aguirre

IX. DISCUSIÓN

Las aves silvestres, principalmente los patos, son los reservorios naturales de los virus influenza tipo A. Comúnmente no presentan signos clínicos, ya sean portadores de influenza aviar de alta o baja patogenicidad. Es por esto que el monitoreo de estas aves es parte esencial de la vigilancia para Influenza Aviar en cualquier país.

Recordemos la gran importancia de la vigilancia de este virus, ya que se sabe el potencial de mutación de virus de baja patogenicidad a alta patogenicidad, al tratarse principalmente de cepas H5 y H7. Un ejemplo lo tenemos con el brote chileno el año 2002.

Para poder llevar a cabo dicho monitoreo fue necesario utilizar jaulas de captura portátiles, las cuales cumplieron su rol capturando patos para el muestreo. En este punto es necesario mencionar que el tipo de trampas utilizadas no son necesariamente las más eficientes, aunque como ya se dijo, cumplieron su rol. Si comparamos con algunas de las mencionadas en la bibliografía podríamos pensar que es bastante ineficiente; sin embargo, la información disponible en bibliografía se enfoca principalmente a períodos de reproducción o a patos buceadores, lo cual no corresponde a la realidad de este estudio. Se debe considerar la realización de mayores estudios sobre la confección y eficiencia de trampas portátiles, principalmente si se trata de capturas para monitoreo, y no para estudios de reproducción.

Cabe destacar que las jaulas utilizadas en este caso son estructuras fáciles de construir, basadas en modificaciones a jaulas descritas por la literatura.

Las aves capturadas corresponden a especies comunes en los humedales centrales, todas ellas con costumbres migratorias. La distribución de especies no es homogénea, debido a características del comportamiento de cada una de ellas. Así por ejemplo, al Pato Real se le asigna una personalidad bastante esquiva, tendiente a ubicarse siempre al centro de la laguna. En el caso del Pato Colorado es posible deducir que su escasa presencia se debió a sus hábitos alimenticios, ya que es filtrador omnívoro y se alimenta de semillas, plantas,

insectos y moluscos acuáticos, gustándole la vegetación emergente baja (recordar que se utilizó maíz chancado en las trampas). Ambos casos sólo tuvieron un representante en el total de aves capturadas (descripción de patos en www.avesdechile.cl).

Respecto al total de aves capturadas, se deben mencionar las dificultades generales del muestreo, que no sólo se refiere a la eficiencia de las jaulas; sino también al medio ambiente fangoso de difícil acceso y a la condición silvestre de las aves, lo que implica un comportamiento generalmente esquivo. Es así como el reducido número de aves muestreadas (66 patos) en relación al gran trabajo desplegado en 10 campañas de captura, en un período de 4 meses; también ha sido justificado y documentado en un estudio serológico y virológico para Influenza Aviar, Enfermedad de Newcastle y *Salmonella spp.* en zarapitos y playeros árticos en Tierra del Fuego, Chile (Roa, 2006).

Volviendo al muestreo propiamente tal, es importante mencionar que las tómulas orales son ideales para el cultivo virológico, dado que el virus que actualmente está cobrando mayor importancia en los brotes mundiales es el H5N1, el cual se comprobó que replica principalmente en el sistema respiratorio superior. Dichas tómulas son sumergidas en caldo infusión cerebro – corazón, el cual debe estar en condiciones óptimas, dado que la concentración de los antibióticos y la temperatura son fundamentales para controlar cualquier microorganismo que pudiera adulterar las pruebas de laboratorio a realizar posteriormente.

Una vez obtenidas las muestras, es importante contar con pruebas confiables y sensibles, recomendadas por la OIE. Aquí es donde destacan las pruebas de cultivo virológico, que permiten replicar el virus (si estuviera presente) y confirmar su presencia a través del test de hemoaglutinación.

Esta prueba (HA) detecta microorganismos hemoaglutinantes. En nuestro caso necesitamos pesquisar virus hemoaglutinantes. Por esta razón es tan importante la solución de antibióticos con la que es tratada la muestra, para evitar así la presencia de cualquier otro

microorganismo hemoaglutinante (especialmente bacteriano) que pudiera dar falsos positivos a la prueba de HA. En este punto destacan las bacterias como los micoplasmas.

En caso de que sea detectado un virus hemoaglutinante se debe realizar la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación para determinar si el virus presente es Influenza o Newcastle. Para dicho efecto el laboratorio debe contar con los antiseros respectivos. En nuestro caso no fue necesario realizar una prueba de inhibición de la hemoaglutinación, dado que todos los resultados fueron negativos a la prueba de HA.

Se debe tener en cuenta que para la realización de este tipo de procedimiento se requiere idealmente un laboratorio de Bioseguridad III; que incluye cámara de flujo laminar, presión negativa, cambio de vestuario con ducha exclusiva, el uso de autoclave, incineración, y completa descontaminación de las áreas de trabajo.

El cultivo virológico es un procedimiento relativamente fácil y resulta muy práctico a la hora de hacer un “screening” de aves silvestres, pero lamentablemente es una técnica lenta; por lo tanto se recomienda la implementación de técnicas más rápidas como las moleculares.

Las técnicas diagnósticas hoy aplicadas para la detección de IA son las utilizadas en los laboratorios de referencia del National Veterinary Services Laboratories (NVSL), Ames, Iowa; y son respaldadas por la OIE. Dichas técnicas están implementadas en los laboratorios del SAG y han demostrado, por estudios, ser sensibles y eficaces para la detección de virus de IA.

En este estudio, las 66 muestras de patos silvestres resultaron negativas al aislamiento del virus de IA. Estos resultados, a nivel nacional, son coincidentes con otras investigaciones de aislamiento viral en aves silvestres. Hidalgo et al. (2003) comunican la ausencia de evidencias serológicas y de aislamiento viral para IA y Enfermedad de Newcastle en 50 zarapitos y 59 playeros árticos capturados en Tierra del Fuego.

Por otra parte, el SAG no ha encontrado evidencias de aislamiento de virus de IA en muestras capturadas en humedales a lo largo de Chile, desde su erradicación luego del brote del 2002. Esto se puede corroborar revisando los últimos resultados de los estudios de vigilancia y monitoreo que realiza el SAG junto con la Asociación de Productores Avícolas de Chile (APA), donde se incluyen todas las aves muestreadas cada año, tanto silvestres como de producción, mascotas y de zoológico (SAG, 2006b; SAG, 2007).

X. CONCLUSIONES

Según los objetivos planteados y los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. Se logró, a nivel local, la estandarización de un método de captura de patos silvestres para el desarrollo de programas de vigilancia epidemiológica de Influenza Aviar con aislamiento viral.
2. Durante el período en estudio se logró un reducido número de patos capturados, debido a las dificultades de trabajo en humedales, la conducta asilvestrada de los patos, y otras limitaciones propias del trabajo con aves silvestres, por lo que recomienda seguir estudiando con estrategias de captura más productivas.
3. Los resultados negativos a Influenza Aviar en este estudio, aunque en un reducido número de muestras de aves silvestres, son coincidentes con otros trabajos nacionales y demuestran un bajo nivel de riesgo de la introducción de esta enfermedad exótica al país, por la vía de las migraciones.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Afton, A. D., M. G. Anderson, and R. D. Salyer. 1980. A decoy trap for diving ducks. *J. Wildl. Manage.* 44:217-219.
2. Alexander, D. J. 1982. Avian influenza-recent developments. *Vet. Bull.* 52:341-359.
3. Alexander, D. J. 1986. Avian diseases-historical aspects, p. 4-13. In *Proceedings of the 2nd International Symposium on Avian Influenza*. U.S. Animal Health Association, Richmond, Va.
4. Banks, J., E. S. Speidel, E. Moore, L. Plowright, A. Piccirillo, I. Capua, P. Cordioli, A. Fioretti, and D. J. Alexander. 2001. Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. *Archives of Virology.* 146:963-973.
5. Beard, C. W., W. M. Schnitzlein, and D. N. Tripathy. 1991. Protection of chickens against highly pathogenic avian influenza virus (H5N2) by recombinant fowlpox viruses. *Avian Diseases* 35:356-359.
6. Becker, W. B. 1966. The isolation and classification of tern virus: influenza virus A/Tern/South Africa/61. *J. Hyg.* 64:309-320.
7. Berg, M., L. Englund, I. A. Abusugra, A. Klingeborn, and T. Linne. 1990. Close relationship between mink influenza (H10N4) and concomitantly circulating avian influenza viruses. *Archives of Virology* 113:61-71.
8. Blums, P. N., V. K. Reders, A. A. Mednis, and J. A. Baumanis. 1983. Automatic drop – door traps for ducks. *J. Wildl. Manage.* 47:199-203.
9. Bosch, G. V. 2005. Eradications strategies against avian influenza. *Conferencia hemisférica sobre influenza aviar*. Brasilia, Brasil.
10. Boyle, D. B., P. Selleck, and H. G. Heine. 2000. Vaccinating chickens against avian influenza with fowlpox recombinants expressing the H7 haemagglutinin. *Australian Veterinary Journal.* 78: 44-48.
11. Brugh, M., C. W. Beard, and H. D Stone. 1979. Immunization of chickens and turkeys against avian influenza with monovalent and polyvalent oil emulsion vaccines. *American Journal of Veterinary Research* 40:165-169.
12. Callan, R. J., G. Early, H. Kida, and V.S. Hinshaw. 1995. The appearance of H3 influenza viruses in seals. *Journal of General Virology* 76: 199-203.
13. Capua, I., B. Grossele, E. Bertoli, and P. Cordioli. 2000a. Monitoring for highly pathogenic avian influenza in wild birds in Italy. *Veterinary Record.* 147:640.

14. Capua, I., F. Multinelli, S. Marangon, and D. L. Alexander. 2000b. H7N1 avian influenza in Italy (1999 to 2000) in intensively reared chickens and turkeys. *Avian Pathology* 29:537-543.
15. Capua, I., S. Marangoni, M. Dalla Pozza and U. Santucci. 2000c. Vaccination for avian influenza in Italy. *Veterinary Record* 147:751.
16. Carter, G. R., D. J. Wise, and E. F. Flores. 2006. Orthomyxoviridae. Disponible en www.ivis.org.
17. Castrucci, M. R., I. Donatelli, L. Sidoli, G. Barigazzi, Y. Kawaoka and R. G. Webster. 1993. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology* 193:503-506.
18. Chambers, T. M., Y. Kawaoka, and R.G. Webster. 1988. Protection of chickens from lethal influenza infection by vaccinia expressed hemagglutinin. *Virology* 167: 414-421.
19. Chambers, T. M., S. Yamnikova, Y. Kawaoka, D. K. Lvov, and R.G. Webster. 1989. Antigenic and molecular characterization of subtype H13 haemagglutinin of influenza virus. *Virology* 172:180-188.
20. Claas, E. C., Y. Kawaoka, J. C. De Jong, N. Masureli, and R.G. Webster. 1994. Infection of children with avian-human reassortant influenza virus from pigs in Europe. *Virology* 204: 453-457.
21. Class, E. J., M. J. Sprenger, G. E. Kleter, and R. van Beek. 1992. Type specific identification of influenza viruses A, B and C by the polymerase chain reaction. *J. Virol Methods* 39:1-13.
22. Connor, R. J., Y. Kawaoka, R. G. Webster and J. C. Paulson. 1994. Receptor specificities in human, avian and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 205:17-23.
23. Council Directive. 1992. 92/40/EEC of 19th May 1992 introducing Community measures for the control of avian influenza. *Official Journal of the European Communities L* 167:1.15.
24. Cox, N. J., and C. A. Bender. 1995. The molecular epidemiology of influenza. *Sem. Virol.* 6:359-370.
25. Crawford, J. M., M. García, H. Stone, D. Swayne, R. Slemons and M. L. Perdue. 1998. Molecular characterization of the hemagglutinin gene and oral immunization with a waterfowl-origin avian influenza virus. *Avian Disease* 42, 486-496.
26. Crawford, J., B. Wilkinson, A. Vosnesensky, G. Smith, M. García, H. Stone, and M. L. Perdue. 1999. Baculovirus-derived haemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. *Vaccine* 17:2265-2274.

27. Cross, G. M. 1986. The status of avian influenza in Australia, p. 96-103. In Proceedings of the 2nd International Symposium on Avian Influenza. U.S. Animal Health Association, Richmond, Va.
28. D'Aprile, P. N. 1986. Current situation of avian influenza in Italy and approaches to its control. In: Acute Virus Infections of Poultry. Eds. J. B. Mc Ferran and M. S. Mc Nulty, pp. 29-35, Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff.
29. De, B. K., and D. P. Nayak. 1980. Defective-interfering influenza viruses and host cells: establishment and maintenance of persistent influenza virus infection in MDBK and HeLa cells. *J. Virol.* 36:847-859.
30. Donis, R. O., W. J. Bean, Y. Kawaoka, and R. G. Webster. 1989. Distinct lineages of influenza virus H4 hemagglutinin genes in different regions of the world. *Virology* 169:408-417.
31. Downie, J. C., and W. G. Laver. 1973. Isolation of a type influenza virus from an Australian pelagic bird. *Virology* 51:259-269.
32. Easterday, B. C. and C. W. Beard. 1984. Avian Influenza. In: Diseases of Poultry. 8th Ed. pp. 482-496, Iowa: Iowa State University Press.
33. Eisenlohr, L., W. Gerhard, and C. J. Hackett. 1987. Role of receptor-binding activity of the viral haemagglutinin molecule in the presentation of influenza virus antigens to helper T cells. *J. Virol.* 61:1375-1383.
34. Frielle, D. W., D. D. Huang, and J. S. Youngner. 1984. Persistent infection with influenza A virus: evolution of virus mutants. *Virology* 138:103-117.
35. García, M., J. M. Crawford, J. M. Latimer, E. Rivera-Cruz, and M.L. Perdue. 1996. Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *Journal of General Virology* 77:1493-1504.
36. García, A., H. Johnson, D. K. Srivastava, D. A. Jayawardene, D. R. Wehr, and R. G. Webster. 1998. Efficacy of inactivated H5N2 influenza vaccines against lethal A/Chicken/Queretaro/19/95 infection. *Avian Diseases* 42:248-256.
37. Gorman, O. T., W. J. Bean, Y. Kawaoka, I. Donatelli, Y. Guo, and R. G. Webster. 1991. Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origin of H1N1 human and classical swine viruses. *J. Virol.* 65:3704-3714.
38. Gorman, O. T., W. J. Bean, Y. Kawaoka, and R. G. Webster. 1990. Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. *J. Virol.* 64:1487-1497.

39. Guan, Y., K. F. Shortridge, S. Krauss, P. H. Li, Y. Kawaoka and R. G. Webster. 1996. Emergence of avian H1N1 influenza viruses in pigs in China. *J. Virol.* 70:8041-8046.
40. Guo, Y., M. Wang, G. S. Zheng, W. K. Li, Y. Kawaoka and R. G. Webster. 1995. Seroepidemiological and molecular evidence for the presence of two H3N8 equine influenza viruses in China in 1993-94. *Journal of General Virology* 76:2009-2011.
41. Haesebrouck, F., P. Biront, M. B. Pensaert, and J. Leunen. 1985. Epizootics of respiratory tract disease in swine in Belgium due to H3N2 influenza virus and experimental reproduction of disease. *Am. J. Vet. Res.* 46:1926-1928.
42. Halvorson, D. A. 1998. The strengths and weaknesses of vaccines as a control tool. In: *Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza*, Athens, Georgia: U.S. Animal Health Association, pp. 223-227.
43. Halvorson, D. A., D. Karunakaran, D. Senne, C. Kelleher, C. Bailey, A. Abraham, V. S. Hinshaw, and J. Newman. 1983. Epizootiology of avian influenza-simultaneous monitoring of sentinel ducks and turkeys in Minnesota. *Avian Dis.* 27:77-85.
44. Hidalgo, H., A. M. Roa, O. Blank, and L. Niles. 2003. Monitoreo virológico, bacteriológico y serológico para Influenza Aviar, Enfermedad de Newcastle y Salmonella en dos especies de aves playeras migratorias: playero ártico (*Calidris canutus*) y zarapito (*Numenius phaeopus*) en Tierra del Fuego, XII Región, Chile. In *Proceedings of the 10th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE 10)*, 19 - 21 Noviembre, 2003, Viña del Mar, Chile.
45. Higgins, D. A. 1996. Comparative immunology of avian species. In: *Poultry Immunology*, 4th ed. Eds. T.F. Davison, T. R. Morris & L. N. Payne, pp. 149-205, Abingdon: Carfax Publishing Co.
46. Hinshaw, V. S., M. G. Sheerar, and D. Larsen. 1990. Specific antibody responses and generation of antigenic variants in chickens immunized against a virulent avian influenza virus. *Avian Diseases* 34:80-86.
47. Hinshaw, V. S., and R. G. Webster. 1982. The natural history of influenza A viruses, p. 79-104. In A. S. Beare (ed.), *Basic and applied influenza research*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
48. Hinshaw, V. S., R. G. Webster, and B. Turner. 1980. The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Can. J. Microbiol.* 26:622-629.
49. Horimoto, T., K. Nakayama, S. P. Smeekens, and Y. Kawaoka. 1994. Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate haemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *J. Virol.* 68:6074-6078.

50. Horimoto, T., E. Rivera, J. Pearson, D. Senne, S. Krauss, Y. Kawaoka and R. G. Webster. 1995. Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. *Virology* 213:223-230.
51. Hunt, G. S., and K. J. Dahlka. 1953. Live trapping of diving ducks. *J. Wildl. Manage.* 17:92-95.
52. Ito, T., H. Goto, E. Yamamoto, H. Tanaka, M. Takeuchi, M. Kuwayama, Y. Kawaoka, and K. Otsuki. 2001. Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens. *J. Virol.* 75:4439-4443.
53. Jackson, D. C., H. E. Drummer, L. Urge, L. J. R. Otvos, and L. E. Brown. 1994. Glycosylation of a synthetic peptide representing a T-cell determinant of influenza virus haemagglutinin results in loss of recognition by CD4+ T-cell clones. *Virology* 199:422-430.
54. Jawetz, E., J. Melnick, and E. Adelberg. 1992. *Manual de microbiología médica.*
55. Jawetz, E., J. Melnick, and E. Adelberg. 1996. *Manual de microbiología médica.* 14° Ed. México: El Manual moderno. 555-567
56. Jones, Y. L., and D. E. Swayne. 2004. Comparative pathobiology of low and high pathogenicity H7N3 Chilean avian influenza viruses in chickens. *Avian Dis.* 48:119–128.
57. Karasin, A. I., C. W. Olsen, I. H. Brown, S. Carman, M. Stalker, and G. Josephson. 2000. H4N6 influenza virus isolated from pigs in Ontario. *Canadian Veterinary Journal* 41:938-939.
58. Kawaoka, Y., T. M. Chambers, W. L. Sladen, and R. G. Webster. 1988. Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks? *Virology* 163:247-250.
59. Kawaoka, Y., C. W. Naeve, and R. G. Webster. 1984. Is virulence of H5N2 influenza viruses in chickens associated with loss of carbohydrate from the haemagglutinin? *Virology* 139:303-316.
60. Kida, H., T. Ito, J. Yasuda, Y. Shimizu, C. Itakura, K. F. Shortridge, Y. Kawaoka, and R. G. Webster. 1994. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *Journal of General Virology* 75:2183-2188.
61. Kida, H., K. F. Shortridge, and R. G. Webster. 1988. Origin of the hemagglutinin gene of H3N2 influenza viruses from pigs in China. *Virology* 162:160-166.
62. Kuiken, T., G. Rimmelzwaan, D. van Riel, G. van Amerongen, M. Baars, R. Fouchier, and A. Osterhaus. 2004. Brevia. Avian H5N1 influenza in cats. *Science* 306:241. Published online 2 september 2004;10.1126/science.1102287.

63. Lamb, R. A., and R. M. Krug. 1996. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott – Raven. 1353-1445.
64. Lamichhane C. M., and L. Kirkegaard, Jr. 1997. Comparison of serological methods for the detection of antibodies to avian influenza virus in chicken sera. *Avian Dis.* 47:366-372.
65. Laudert, E., V. Sivanandan, D. Halvorson, D. Shaw, and R. G. Webster. 1993. Biological and molecular characterization of H13N2 influenza type A viruses isolated from turkeys and surface water. *Avian Diseases* 37:793-799.
66. Lin, Y. P., M. Shaw, V. Gregory, K. Cameron, W. Lim, A. Klimov, K. Subbarao, Y. Guan, S. Krauss, K. Shortridge, R. G. Webster, N. Cox, and A. Hay. 2000. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:9654-9658.
67. Linzitto, O. R., C. Espinoza, C. A. Rodríguez. 2005. Reseña sobre vigilancia y prevención de la influenza aviar y rol zoonótico. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 39:485-492.
68. Lipkind, M., H. Burger, R. Rott, and C. Scholtissek. 1984. Genetic characterization of influenza A viruses isolated from birds in Israel. *Zentralbl. Veterinaermed Reihe B* 31:721-728.
69. Lüscho, D., O. Werner, T. C Mettenleiter, and W. Fuchs. 2001. Protection of chickens from lethal avian influenza A virus infection by live-virus vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing the hemagglutinin (H5) gene. *Vaccine* 19:4249-4259.
70. Luo, G., J. Chung and P. Palese. 1993. Alterations of the stalk of the influenza virus neuraminidase: deletions and insertions. *Virus Research* 29:141-153.
71. Lvov, D. K. 1987. Influenza A viruses-a sum of populations with a common protected gene pool. *Sov. Med. Rev. Virol.* 2:15-37.
72. McCapes, R. H., and R. A. Bankowski. 1987. Use of avian influenza vaccines in California turkey breedersmedical rationale. In: *Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza*. Eds. B. C. Easterday. Athens, Georgia: U.S. Animal Health Association, pp. 271-278.
73. Mackenzie, J. S., E. C. Edwards, R. M. Holmes, and V. S. Hinshaw. 1984. Isolation of ortho- and paramyxoviruses from wild birds in Western Australia, and the characterization of novel influenza A viruses. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 62:89-99.

74. Mastrovovich, M. N., N. Zhou, Y. Kawaoka and R. G. Webster. 1999. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J. Virol.* 73:1146-1155.
75. Mo, I. P., M. Brugh, O. J. Fletcher, G. N. Rowland, and D. E. Swayne. 1997. Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. *Avian Diseases* 41:125-36.
76. Naeem, K. 1998. The avian influenza H7N3 outbreak in South Central Asia. In: *Proceedings of the 4th International Symposium on Avian Influenza*, Eds. D. E. Swayne and R. D. Slemons, Athens Georgia: U.S. American Health Associations, pp. 31-35.
77. Naeve, C. W., V. S. Hinshaw, and R. G. Webster. 1984. Mutations in the haemagglutinin receptor-binding site can change the biological properties of an influenza virus. *J. Virol.* 51:567-569.
78. Nestorowicz, A., Y. Kawaoka, W. J. Bean, and R. G. Webster. 1987. Molecular analysis of the hemagglutinin genes of Australian H7N7 influenza viruses: role of passerine birds in maintenance or transmission? *Virology* 160:411-418.
79. OIE. 2007. Actualización sobre la influenza aviar en animales (tipo H5). Disponible en: http://www.oie.int/downld/avian%20influenza/e_AI-Asia.htm
80. OIE. 2002. Ficha técnica influenza aviar altamente patógena (peste aviar).
81. OPS. 2003. Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral. Disponible en: http://www.paho.org/Spanish/AD/THS/EV/labs_IPK.pdf
82. Palese, P., K. Tobita, M. Ueda, and R. W. Compans. 1974. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* 61:397-410.
83. Palmer, D., W. Dowdle, M. Coleman, and G. Shild. 1975. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. Immunology series No. 6 Part. 2: procedural guide US Department of Health Educat. And public Health Service. 25-62.
84. Papparella, V., A. Fioretti, and L. F. Menna. 1995. The epidemiological situation of avian influenza in Italy in 1994. In: *Proceedings of the Joint Second Annual Meeting of the National Newcastle Diseases and Avian Influenza Laboratories of Countries of the European Union*, Brussels 1994. pp. 14-15
85. Papparella, V., A. Fioretti, L. F. Menna, and M. Calabria. 1996. The epidemiological situation of avian influenza in Italy in 1995. *Proceedings of the Joint Second Annual Meeting of the National Newcastle Diseases and Avian Influenza Laboratories of Countries of the European Union*, Brussels 1995, pp. 13-14.

86. Pearson, J. E., and D. A. Senne. 1981. Avian influenza diagnostic procedures. *Avian Dis.* 47:157-166.
87. Pearson, J. E., and D. A. Senne. 1986. Diagnostic procedures for avian influenza. *Avian Dis.* 47:222-227.
88. Peiris, J. S., Y. Guan, D. Markwell, P. Ghose, R. G. Webster, and K. F. Shortridge. 2001. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern china: potential for genetic reassortment? *J. Virol.* 75:9679-9686.
89. Perdue, M. L. and D. L. Suarez. 2000. Structural features of the avian influenza virus haemagglutinin that influence virulence. *Veterinary Microbiology* 74:77-86.
90. Pérez-Breña, P., and I. Casas. 2004. Infecciones producidas por los virus de la gripe aviar A (H5N1) en las poblaciones de aves del sudeste asiático y en la especie humana. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22:412-418.
91. Pomeroy, B. S. 1995. Report of the subcommittee on avian influenza. In: *Proceedings of the 99th Annual Meeting of the United States Animal Health Association*, Ed. Reno, NV: US Animal Health Association, pp. 569-578.
92. Price, R. J. 1982. Avian influenza in the United States (1964-1980). In: *Proceedings of the First International Symposium on Avian influenza, 1981*. Richmond, USA: Carter Composition Corporation, pp.178-179.
93. ProMED Mail. 2004. Avian Influenza H5N1, mammals – East Asia (Archive number 20040221.0560, 21 February 2004).
94. Reichelderfer, P. S., A. P. Kendal, K. F. Shortridge, A. Hampson, et al. 1989. Influenza surveillance in the Pacific Basin. Seasonality of virus occurrence: a preliminary report, p. 412-438. In S. Doraisingham, A. E. Ling, and Y. C. Chan (ed.), *Current topics in medical virology*. World Scientific, Singapore.
95. Rivero, O. 2004. Influenza aviar: ¿De los cerdos al hombre? Artículo técnico disponible en <http://www.engormix.com>
96. Roa, A. M. 2006. Monitoreo de la infección por influenza aviar, enfermedad de newcastle y Salmonella spp. en las aves migratorias: playero ártico (*Calidris canutus*) y zarapito (*Numenius phaeopus*), en Tierra del Fuego, Chile. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Departamento Patología Animal. Universidad de Chile. Financiamiento: Proyecto "A Study of Red Knots, *Calidris canutus*, at Bahía Lomas, Tierra del Fuego, Chile". Division of Fish, Game & Wildlife, State of New Jersey, USA.
97. Robinson, J. H., and B. C. Easterday. 1979. Detection of persisting influenza virus with turkey tracheal cultures. *Avian Dis.* 23:354-356.

98. Rott, R. 1992. The pathogenic determinant of influenza virus. *Veterinary Microbiology* 33:303-310.
99. Ruigrok, R. W. H. 1998. Structure of influenza A, B and C viruses. In: *Textbook of Influenza*, Eds. K. G. Nicholson, R. G. Webster and A. J. Hay, pp. 29-42, Oxford: Blackwell Science.
100. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). 2002. Manual operativo manejo influenza aviar. Biblioteca digital. Sanidad animal. Manuales.
101. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). 2006. Programa de vigilancia epidemiológica. Vigilancia en zonas de riesgo asociadas a la presencia de aves silvestres y/o de corral para la detección precoz de la influenza aviar. Biblioteca digital. Sanidad animal. Manuales.
102. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). 2006b. Vigilancia en influenza Aviar años 2004 – 2005. Biblioteca digital. Sanidad animal. Informes.
103. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). 2007. Proyecto nacional de vigilancia epidemiológica de enfermedades aviares exóticas de la lista A de la OIE y bronquitis infecciosa renal SAG - APA, resultados año 2006. Biblioteca digital. Sanidad animal. Informes.
104. Scholtissek, C., H. Burger, P. A. Bachmann, and C. Hannoun. 1983. Genetic relatedness of hemagglutinins of the H_i subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. *Virology* 129:521-523.
105. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 2003. Manual de procedimientos influenza aviar altamente patógena.
106. Senne, D. A., B. Panigrahy, Y. Kawaoka, J. E. Pearson, J. Suss, M. Lipkind, H. Kida, and R. G. Webster. 1996. Survey of the haemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Diseases* 40:425-437.
107. Seo, S. H. and R. G. Webster. 2001. Cross-reactive, cell-mediated immunity and protection of chickens from lethal H5N1 influenza virus infection in Hong Kong poultry markets. *J. Virol.* 75:2516-2525.
108. Sharp, G. B., Y. Kawaoka, S. M. Wright, B. Turner, V. Hinshaw, and R. G. Webster. 1993. Wild ducks are the reservoir for only a limited number of influenza A subtypes. *Epidemiology and Infection* 110:161-176.
109. Sharp, D.E., and J. T. Lokemoen. 1987. A decoy trap for breeding – season mallards in North Dakota. *J. Wildl. Manage.* 51:711-715.

110. Shortridge, K. F. 1982. Avian influenza A viruses of Southern China and Hong Kong: ecological aspects and implications for man. *Bull. W.H.O.* 60:129-135.
111. Shortridge, K. F., R. G. Webster, W. K. Butterfield, and C. H. Campbell. 1977. Persistence of Hong Kong influenza virus variants in pigs. *Science* 196:1454-1455.
112. Sinnecker, R., H. Sinnecker, E. Zilske, and D. Kohler. 1983. Surveillance of pelagic birds for influenza A viruses. *Acta Virol.* 27:75-79.
113. Slemons, R. D., D. C. Johnson, J. S. Osborn, and F. Hayes. 1974. Type A influenza viruses isolated from wild free-flying ducks in California. *Avian Dis.* 18:119-125.
114. Spackman, E., K. G. McCracken, K. Winker, and D. Swayne. 2006. H7N3 Avian Influenza virus found in a South American wild duck is related to the Chilean 2002 poultry outbreak, contains genes from equine and North American wild birds lineages, and is adapted to domestic turkeys. *J. Virol.* 80:7760–7764.
115. Stallknecht, D. E., S. M. Shane, M. T. Kearney, and P. J. Zwank. 1990. Persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis.* 34:406-411.
116. Stunzer, D., W. Thiel, F. Potsch, and W. Sixl. 1980. Isolation of influenza viruses from exotic and central European birds. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. A* 247:8-17.
117. Sturm-Ramírez, K. M., T. Ellis, B. Bousfield, L. Bissett, K. Dyrting, J. E. Rehg, L. Poon, Y. Guan, M. Peiris, and R. G. Webster. 2004. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *J. Virol.* 78:4892-4901.
118. Sturm-Ramírez, K. M., D. J. Hulse-Post, E. A. Govorkova, J. Humberd, P. Seiler, P. Puthavathana, C. Buranathai, T. D. Nguyen, A. Chaisingh, H. T. Long, T. S. P. Naipospos, H. Chen, T. M. Ellis, Y. Guan, J. S. M. Peiris, and R. G. Webster. 2005. Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia?. *J. Virol.* 79: 11269-11279.
119. Suárez, D. L. 1997. Molecular diagnostic techniques: can we identify influenza viruses, differentiate subtypes and determine pathogenicity potential of viruses by RT-PCR? *Avian Dis.* 47:318-325.
120. Suárez, D. L., M. L. Perdue, N. Cox, T. Rowe, C. Bender, J. Huang, and D. E. Swayne. 1998. Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *J. Virol.* 72:6678.
121. Suárez, D. L. and S. Schultz-Cherry. 2000. Immunology of avian influenza virus: a review. *Developmental and Comparative Immunology* 24:269-283.

122. Suárez, D. L., D. A. Senne, J. Banks, I. H. Brown, S. C. Essen, C. W. Lee, R. J. Manvell, C. Mathieu-Benson, V. Moreno, J. C. Pedersen, B. Panigrahy, H. Rojas, E. Spackman, and D. J. Alexander. 2004. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. *Emerg. Infect. Dis.* 10:693–699.
123. Subbarao, K., A. Klimov, J. Katz, H. Regnery, W. Lim, H. Hall, M. Perdue, D. E. Swayne, C. Bender, J. Huang, M. Hemphill, T. Rowe, M. Shaw, X. Xu, K. Fukuda, and N. Cox. 1998. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279:393-396.
124. Swayne, D. E. 1997a. Pathobiology of H5N2 Mexican avian influenza virus infections of chickens. *Veterinary Pathology* 34:557-567.
125. Swayne, D. E., J. R. Beck, and T. R. Mickle. 1997b. Efficacy of recombinant fowl poxvirus vaccine in protecting chickens against a highly pathogenic Mexican origin H5N2 avian influenza virus. *Avian Diseases* 41:910-922.
126. Swayne, D. E., D. A. Senne, and C. W. Beard. 1998. Influenza. In: *Isolation and Identification of Avian Pathogens, Fourth Edition*, Eds. D. E. Swayne, J. R. Glisson, M. W. Jackwood, J. E. Pearson and W. M. Reed, pp. 150-155, Pennsylvania, USA: American Association of Avian Pathologist, Kennett Square.
127. Swayne, D. E., J. R. Beck, M. García and H. D. Stone. 1999. Influence of virus strain and antigen mass on efficacy of H5 avian influenza inactivated vaccines. *Avian Pathology* 28:455-460.
128. Swayne, D. E., M. García, J. R. Beck, N. Kinney, and D. L. Suarez 2000a. Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza haemagglutinin gene insert. *Vaccine* 18:1088-1095.
129. Swayne, D. E., J. R. Beck, and N. Kinney. 2000b. Failure of a recombinant fowl poxvirus vaccine containing an avian influenza haemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chickens preimmunized with a fowl pox vaccine. *Avian Diseases* 44:132-137.
130. Tollis, M., and L. Di Trani. 2002. Recent developments in avian influenza research: Epidemiology and immunoprophylaxis. *The Veterinary Journal.* 164:202-215.
131. Wagner, R., T. Wolff, A. Herwig, S. Pleschka, and H. D. Klenk. 2000. Interdependence of haemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J. Virol.* 74:6316-6323.

132. Webster, R. G., W. J. Bean, O. T. Gorman, T. M. Chambers, and Y. Kawaoka. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*. 56:152-179.
133. Webster, R. G., J. R. Geraci, G. Petursson, and K. Skirnisson. 1981a. Conjunctivitis in human beings caused by influenza A virus of seals. *N. Engl. J. Med.* 304:911.
134. Webster, R. G., V. S. Hinshaw, W. J. Bean, K. L. Van Wyke, J. R. Geraci, D. J. St. Aubin, and G. Petursson. 1981b. Characterization of an influenza A virus from seals. *Virology* 113:712-724.
135. Webster, R. G., Y. Kawaoka, Y. Taylor, R. Weinberg, and E. Paoletti. 1991. Efficacy of nucleoprotein and haemagglutinin antigens expressed in fowlpox virus as vaccine for influenza in chickens. *Vaccine* 9:303-308.
136. Webster, R. G., Y. Taylor, J. Pearson, E. Rivera, and E. Paoletti. 1996. Immunity to Mexican H5N2 avian influenza viruses induced by a fowlpox-H5 recombinant. *Avian Diseases* 40:461-465.
137. Webster, R. G., M. A. Yakhno, V. S. Hinshaw, W. J. Bean, and K. G. Murti. 1978. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84:268-278.
138. Weller, M. W. 1957. An automatic nest – trap for waterfowl. *J. Wildl. Manage.* 21:456-458.
139. Werner, O. 1999. Avian Influenza-Situation in Germany 1997/1998. In *Proceedings of the Joint Fifth Annual Meeting of the National Newcastle Diseases and Avian Influenza Laboratories of Countries of the European Union, Vienna. 1998*, pp. 10-11.
140. Wiley, D. C. and J. J. Skehel. 1987. The structure and function of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annual Review of Biochemistry* 56:365-394.
141. Wilson, M. 2005. A portable duck trap. *Afring News* 34:5-7
142. Wood, J. M., Y. Kawaoka, L. A. Newberry, E. Bordwell, and R. G. Webster. 1985. Standardization of inactivated H5N2 influenza vaccine and efficacy against lethal A/Chicken/Pennsylvania/1370/83 infection. *Avian Diseases* 29: 867-872.
143. Wood, G. W., J. W. McCauley, J. B. Bashiruddin, and D. J. Alexander. 1993. Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Archives of Virology* 130:209-217.
144. Wood, G. W., J. Banks, H. Brown, I. Strong, and D. J. Alexander. 1997. The nucleotide sequence of the HA1 of the haemagglutinin of an H1 avian influenza virus isolate from turkeys in Germany provides additional evidence suggesting recent transmission from pigs. *Avian Pathology* 26:347-354.

145. Wright, K. E., G. A. Wilson, D. Novosad, C. Dimock, and D. Tand. 1995. Typing and subtyping of influenza virus in clinical samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 10:95-98.
146. Wyde, P. R., R. B. Couch, B. F. Mackler, T. R. Cate, and B. M. Levy. 1977. Effects of low- and high-passage influenza virus infection in normal and nude mice. *Infect. Immun.* 15:221-229.
147. Yewdell, J. W. and C. J. Hackett. 1989. Specificity and function of T-lymphocytes induced by influenza A viruses. In *The influenza viruses*. Ed. R. M. Krug, pp. 361-429, New York: Plenum Press.
148. Zanella, A., G. Poli, and M. Bignami. 1981. Avian influenza: Approaches in the control of the disease with inactivated vaccines in oil emulsion. In *Proceedings of the First International Symposium on Avian influenza, 1981*. Richmond, USA: Carter Composition Corporation, pp. 180-183.

