

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Prevalencia de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar en patos domésticos de la costa sur de Guatemala (2013 – 2014).

Trabajo de graduación presentado por  
Martha Patricia Herrera González  
para optar al grado académico de Licenciada en  
Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2015



Prevalencia de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar en patos domésticos de la costa sur de Guatemala (2013 – 2014).

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades




Prevalencia de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar en patos domésticos de la costa sur de Guatemala (2013 – 2014).

Trabajo de graduación presentado por  
Martha Patricia Herrera González  
para optar al grado académico de Licenciada en  
Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

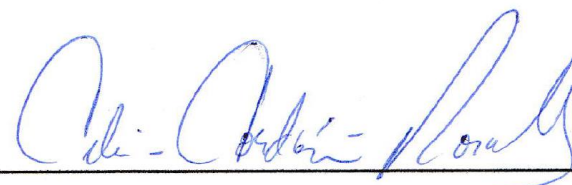
2015

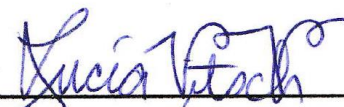
Vo. Bo. :

(f)   
\_\_\_\_\_  
MSc. Lucía Ortiz  
Asesor

Tribunal Examinador:

(f)   
\_\_\_\_\_  
MSc. Lucía Ortiz  
Asesor

(f)   
\_\_\_\_\_  
Lic. Celia Cordón

(f)   
\_\_\_\_\_  
MSc. Lucía Nitsch

Fecha de aprobación: Guatemala, 9 de diciembre de 2015

## PREFACIO

La elaboración de la presente tesis surgió como interés personal sobre el tema de vigilancia de influenza en Guatemala. Por tal motivo, tuve la oportunidad de colaborar en el seguimiento del proyecto Interfaz Humano Animal del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala, sobre el monitoreo de cepas de interés a nivel mundial, como el subtipo H5 del virus de influenza aviar, en patos domésticos de la costa sur de Guatemala.

En primer lugar, agradezco a Dios por ser mi guía a lo largo de mi vida, por permitirme cumplir mis metas y por ser mi fortaleza para superar cada obstáculo y dificultades a lo largo de mi carrera. Le doy gracias a mis padres (Herbert y Patricia) por apoyarme en cada etapa de mi vida, por los valores que me inculcaron, por ser un ejemplo personal y profesional a lo largo de mi vida y por darme la oportunidad de tener una excelente educación. También quiero agradecer a mi hermano Herbert, por ser parte de mi vida, por apoyarme y alegrarme en los momentos que más lo he necesitado.

De igual forma agradezco a la Universidad del Valle de Guatemala, a la Facultad de Ciencias y Humanidades y al Centro de Estudios en Salud. A MSc. Lucía Ortiz, por su asesoría, apoyo y conocimientos brindados durante la realización de esta tesis. A la Lic. Celia Córdón, por la revisión y apoyo en la elaboración de este trabajo de investigación. De igual forma, agradezco al personal que forma parte del proyecto de Interfaz Humano-Animal del Centro de Estudios en Salud, especialmente a Silvia Ramírez y Jorge Paniagua, por el apoyo y colaboración que me brindaron durante la realización de esta tesis.

Agradezco a mis amigas y amigos, especialmente a Michelle y Andrea, por su amistad y su apoyo incondicional a lo largo de la carrera y durante la realización de esta tesis.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron en la realización de la misma.

# ÍNDICE

PREFACIO.....	vi
LISTADO DE FIGURAS .....	viii
LISTADO DE CUADROS .....	xii
RESUMEN .....	xiii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. JUSTIFICACIÓN .....	3
III. HIPÓTESIS .....	5
IV. OBJETIVOS .....	7
V. MARCO TEÓRICO.....	8
VI. MARCO METODOLÓGICO.....	33
VII. RESULTADOS.....	56
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	64
IX. CONCLUSIONES.....	74
X. RECOMENDACIONES .....	75
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76
XII. APÉNDICE I.....	87
XIII. APÉNDICE II.....	88
XIV. CONTACTOS.....	94

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular del virus de influenza.....	9
Figura 2. Comparación tipos de virus de influenza A, B y C.....	13
Figura 3. Cambio antigénico menor ( <i>drift</i> ) y cambio antigénico mayor ( <i>shift</i> ) .....	15
Figura 4. Casos reportados por virus de influenza aviar H5N1 y H7N9.....	17
Figura 5. Ciclo de transmisión de virus de influenza A.....	18
Figura 6. Mecanismos de generación de virus influenza que ocasionaron las pandemias de influenza española, asiática y Hong Kong.. .....	22
Figura 7: Distribución de la placa para ensayo de hemaglutinación en donde se cololoca el virus (duplicado), las réplicas del virus y CC corresponde al control de células. ....	34
Figura 8. Criterio para interpretar los resultados de la placa del ensayo HA .....	35
Figura 9: Procedimientos para tratamientos con RDE, RBC y combinado para eliminar aglutininas inespecíficas.....	36
Figura 10. Criterio para evaluar la eficiencia de tratamientos para eliminar aglutininas inespecíficas al realizar un control de suero. ....	38
Figura 11. Distribución de placa control para el ensayo HI.....	41
Figura 12. Criterio para interpretar resultados de placa de ensayo de HI.....	42

Figura 13. Distribución de placa para ensayo HI de cinco muestras. ....	43
Figura 14. Criterio de resultados para evaluación de especificidad del ensayo HI subtipo H5N3.....	46
Figura 15. Sitios muestreados en Candelaria y Monterrico de Santa Rosa, Guatemala... 47	
Figura 16. Canal ubicado en sitio de muestreo de patos domésticos de la costa sur de Guatemala.....	48
Figura 17. Canal ubicado en sitio de muestreo de patos domésticos de la costa sur de Guatemala.....	48
Figura 18. Canal ubicado en sitio de muestreo de patos domésticos de la costa sur de Guatemala. ....	49
Figura 19. Distribución de casas seleccionadas para la toma de muestra de sangre de patos domésticos y casas seropositivas para influenza A de Monterrico y La Candelaria, Guatemala, durante los meses de noviembre 2013 – octubre 2014.....	51
Figura 20. Resultados preliminares de las 98 muestras seropositivas para influenza A obtenidos por ELISA de las 1174 muestras colectadas de sangre de patos domésticos de la costa sur de Guatemala (2013 – 2014) .....	51
Figura 21: Distribución de placa para ensayo HI con muestras donde se indica la dilución a la cual un resultado positivo ya es considerado como válido según OIE.....	53
Figura 22. Criterio para considerar un resultado positivo como válido o negativo. ....	53

Figura 23. Ejemplo de resultado del ensayo HI para cuatro muestras de suero de patos seleccionas al azar, comparando entre incubación a temperatura ambiente por 30 minutos e incubación a 4 °C. ....	57
Figura 24. Título de control seropositivo para H5 y negativo obtenido por medio del ensayo HI realizado en diez días diferentes, durante 10 días diferentes. Para el control positivo, los límites de detección para considerarse un ensayo preciso son 40 U/ $\mu$ L y 160 U/ $\mu$ L.....	58
Figura 25. Titulación reversa de dilución de virus A/blue-winged teal/Guatemala/CIP049-09/2010(H5N3) para corroborar título de 8 uHA/ 50 $\mu$ L, durante 10 días diferentes. Para la titulación reversa, los límites de detección para considerarse un ensayo preciso son 4 U/50 $\mu$ L y 16 U/50 $\mu$ L. ....	59
Figura 26. Comparación del título obtenido y título esperado de siete diluciones del control seropositivo (suero de aves comerciales vacunadas contra subtipo H5, proporcionado por el MAGA), para evaluar la linealidad del ensayo HI.....	60
Figura 27. Ejemplo de resultado obtenido de placa de suero control (ensayo HI sin agregar virus) para confirmar la ausencia de aglutininas inespecíficas.....	88
Figura 28. Ejemplo de resultado obtenido para los controles del ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación. Los controles positivo y negativo fueron tratados con RDE seguido de RBC y para el procedimiento del ensayo HI se utilizó la condición de incubación a temperatura ambiente por 30 minutos luego de agregar la solución de RBC a los pozos con suero y virus. ....	89
Figura 29. Ejemplo de resultado obtenido para los controles del ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación. Los controles positivo y negativo fueron tratados con RDE	

seguido de RBC y para el procedimiento del ensayo HI se utilizó la condición de incubación a 4 °C por 1 hora luego de agregar la solución de RBC a los pozos con suero y virus. ....90

Figura 30. (A) Resultado inespecífico para el ensayo HI para el subtipo H5N3 de muestra clínica de gallina proporcionada por el MAGA reportada como positiva para el subtipo H5N2. (B) Resultado negativo para el ensayo HI para el subtipo H5N3 de control seropositivo pH1N1. ....91

Figura 31. Ejemplo de resultado obtenido por ensayo HI para 5 de las muestras (en duplicado) de suero de patos domésticos recolectadas en en casas particulares de Monterrico y Candelaria, Guatemala, durante los meses de noviembre 2013 a diciembre 2014. ....92

Figura 32. (A) Resultado seropositivo dudoso para el subtipo H5N3 de una muestra de suero de patos. (B) Resultado de ensayo HI confirmatorio para la muestra con resultado seropositivo dudoso para el subtipo H5N3. ....93

## LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de variables.. .....	55
Cuadro 2. Evaluación de la presencia de aglutininas inespecíficas con tres diferentes tratamientos para las muestras de suero. ....	56
Cuadro 3. Respuesta antigénica al virus H5N3 (A/blue-winged teal/Guatemala/CIP049-09/2010(H5N3)) detectada por el ensayo HI en patos domésticos de la costa sur (2013-2014). ....	62
Cuadro 4. Análisis de Chi-cuadrado a partir de la relación entre temporadas (migratoria y no migratoria) y la respuesta antigénica a H5N3 de patos seropositivos para influenza A.....	63

## RESUMEN

La influenza es una enfermedad respiratoria causada por un virus de la familia *Orthomyxovirida*. El subtipo H5 del virus de influenza aviar es de gran importancia a nivel global, ya que es clasificado como virus de alta patogenicidad en aves y podría causar la muerte de aves domésticas en 48 horas, resultando un gran impacto negativo en la economía de los países afectados y en la industria avícola.

El monitoreo de influenza se realiza por medio de pruebas serológicas como el ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) en patos ya que estos pueden presentar pocos o ningún síntoma al ser infectados por una cepa de virus de influenza, sin embargo podrían transmitir el virus a otras especies de aves domésticas como las gallinas en donde el virus podría ser letal. En Guatemala, es importante un constante monitoreo de influenza en patos domésticos ya que Centroamérica es una ruta de aves migratorias y un ecosistema húmedo tropical, lo cual favorece la introducción de nuevas cepas de virus a partir del contacto de aves migratorias y aves domésticas.

Por lo tanto, el principal objetivo fue describir la prevalencia de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar en patos domésticos de la costa sur de Guatemala durante las temporadas migratoria y no migratoria, durante noviembre de 2013 a octubre de 2014, esperando un mayor título de anticuerpos contra el subtipo H5N3 en la temporada migratoria a comparación de la temporada no migratoria. Se realizó el ensayo HI para detectar anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar a 98 muestras seropositivas para influenza A por ELISA, de un total de 1174 muestras recolectadas y analizadas por parte del personal del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala (CES-UVG).

De las 98 muestras, solamente una muestra fue positiva para la detección de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar por el ensayo HI. Esta muestra representa el 1.02% de la población de patos seropositivos para influenza A. A partir de esta única muestra seropositiva para el subtipo H5N3, se estableció que no hay suficiente evidencia estadística para determinar si existe una variación en el título de anticuerpo contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar entre la temporada migratoria y temporada no migratoria en patos domésticos de la costa sur de Guatemala durante noviembre de 2013 a octubre de 2014.

La muestra seropositiva para el subtipo H5N3 de un pato doméstico de la costa sur de Guatemala fue recolectada durante la temporada migratoria, esto sugiere el contacto de aves domésticas con aves migratorias infectadas con la cepa del virus H5N3, la cual fue aislada de aves migratorias de la costa de Guatemala en estudios previos. Es posible que la interacción de las aves domésticas y migratorias ocurra en un canal de agua de la localidad, ya que la mayoría de los patos domésticos se encuentran en patios no cercados y podrían tener acceso a este canal donde llegan aves migratorias como parte de su ruta de migración.

## I. INTRODUCCIÓN

El virus causante de la enfermedad de influenza es único entre los virus de enfermedades respiratorias debido a su continua variación genética. Debido a estos cambios genéticos, el virus es impredecible y esta característica es la responsable del desarrollo de nuevas vacunas cada año y ha tenido un gran impacto en la salud mundial (Greenbaum & Bresee, 2013).

El virus de influenza puede clasificarse en tres tipos: A, B y C. El tipo A y B causan epidemias durante la época de invierno, mientras que el tipo C no causa epidemias estacionales (CDC, 2014). Únicamente el virus de influenza A puede infectar tanto a mamíferos como a aves, por lo tanto dentro del grupo tipo A el virus de influenza puede clasificarse como virus de influenza aviar, porcina o humana, dependiendo del organismos que infecta (CDC, 2014). La susceptibilidad del virus hacia un diferente hospedero está dada por los cambios genéticos del virus ya que le proporciona las características necesarias para infectar las células de diferentes hospederos (OMS, 2002).

El virus de influenza A fue aislado por primera vez en patos silvestres y a partir de este reporte se ha encontrado que en las aves es posible aislar todos los subtipos de hemaglutininas (HA) y todos los subtipos de neuramidasa (NA). La presencia de cada subtipo depende del año, temporada y del hospedero (Suarez & Schultz, 2000).

Los virus causantes de enfermedades en aves pueden dividirse en dos grupos de acuerdo a su habilidad de causar enfermedad. En primer lugar están los virus de baja patogenicidad (LPAI, por sus siglas en inglés de *low pathogenic avian influenza*) y los virus de alta patogenicidad (HPAI, *highly pathogenic avian influenza*) (Alexander, 2000).

Entre los HPAI se encuentran los subtipos de virus H5 y H7, los cuales se han aislado tanto en aves silvestres, aves migratorias y aves de corral (Alexander, 2000). Las aves migratorias son consideradas como la fuente primaria de infección de las aves de corral, ya que algunos estudios han mostrado de una posible evidencia de infección de aves domésticas con virus de influenza provenientes de las aves migratorias como resultado del contacto directo de las aves migratorias con las domésticas (Suarez & Schultz, 2000; Kim *et al.*, 2009).

El virus de influenza aviar H5N1 fue inicialmente reportado en Asia, sin embargo ha logrado migrar hacia el Oriente Medio y Europa (Qi *et al.*, 2014). Este subtipo de virus ha afectado a la industria avícola especialmente de Asia debido a la muerte de las aves como resultado de la propia infección o como medida de control en donde se paraliza el comercio de aves, lo cual ha llevado a grandes pérdidas económicas (Qi *et al.*, 2014). Por otro lado, es importante mencionar que el subtipo H5 del virus de influenza aviar podría adquirir las características necesarias para infectar a los humanos causando brotes y una posible pandemia (Thomas & Noppenberger, 2007).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha documentado casos de infecciones de influenza por el subtipo H5N1 con un grado de mortalidad del 50% (Thomas & Noppenberger, 2007). Esta es una de las razones por las cuales el subtipo H5 debe ser considerado como un riesgo para la salud pública y con un potencial pandémico. La OMS recomienda la vigilancia nacional del virus de influenza como plan para prevenir brotes de este virus y disminuir pérdidas económicas y del área de salud (Thomas & Noppenberger, 2007).

## II. JUSTIFICACIÓN

La influenza A es causante de enfermedades principalmente respiratorias por un virus de la familia *Orthomyxoviridae* que tiene un gran impacto en la salud a nivel mundial (CDC, 2014). El virus puede transmitirse a los humanos por dos vías (CDC, 2005). En primer lugar está la transmisión directa por aves o contaminación del ambiente en donde están las aves y se encuentra el virus, para poder transmitirse a las personas el virus debe poseer genes para infectar a los humanos (CDC, 2005; OMS, 2005). Luego la segunda vía de transmisión se da por medio de un hospedero alternativo como el cerdo que actúa como un punto de recombinación de varias cepas de virus (CDC, 2005).

Los subtipos de virus H5 y H7 se encuentran clasificados como virus de alta patogenicidad en las aves (Yang *et al.*, 2011). Las aves infectadas con virus de baja patogenicidad pueden no presentar síntomas o tener leves síntomas (CDC, 2015). Sin embargo los virus de alta patogenicidad pueden causar síntomas graves de la enfermedad e incluso la muerte del 90 al 100 % de las aves domésticas en un período de 48 horas (CDC, 2015). Esto se refleja como un impacto negativo en la industria avícola local y en la economía a nivel global debido al comercio de las aves de corral (CDC, 2015; OMS, 2014).

Las aves acuáticas, como los patos, son reservorios naturales del virus de influenza A, en ellas se ha encontrado todos los subtipos de Hemaglutinina y Neuraminidasa (CDC, 2005). Algunos patos pueden propagar el virus de influenza, como el subtipo H5, a otros patos mostrando pocos o ningún síntoma de la enfermedad (Kim *et al.*, 2009). Mientras que para los pollos algunos subtipos H5 del virus pueden ser letales (Kim *et al.*, 2009). La ausencia de los síntomas ha puesto a los patos como animales idóneos para la vigilancia de influenza aviar (Kim *et al.*, 2009).

Los virus de influenza aviar encontrados en aves silvestres pueden transmitirse a aves domésticas (CDC, 2015). Se ha encontrado que el virus de influenza aviar es transmitido en todo el año en la población de patos, siguiendo un patrón cíclico anual (Kim *et al.*, 2009). También se ha observado que existen picos en la infección de aves antes y después de la migración de otoño debido a la afluencia de patos con un sistema inmunológico poco desarrollado (Kim *et al.*, 2009).

Centroamérica, un ecosistema húmedo tropical, es una ruta de aves migratorias lo cual favorece la posibilidad de propagación del virus a aves domésticas (Kim *et al.*, 2009). En estudios anteriores, se han identificado los subtipos H7N9, H11N2, H3N8, H5N3, H8N4, y H5N4 circulantes en aves migratorias de la costa del Pacífico de Guatemala, también se indica que las aves migratorias son una posible fuente de transmisión a las aves domésticas de la región al compartir el mismo ecosistema (González-Reiche *et al.*, 2012). A partir de esto se podría suponer que entre mayor sea la presencia del virus en los patos migratorios, habrán más patos domésticos infectados por el virus transmitido.

A nivel global es importante la vigilancia del virus de influenza aviar debido a las variaciones genéticas que sufre el virus, que lleva a la formación de nuevas cepas (CDC, 2005). La detección de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar en patos domésticos de la costa del Pacífico de Guatemala, contribuiría con un sistema de monitoreo de influenza aviar en la región utilizando un método de detección como lo es la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación. La detección temprana permitirá establecer si hubo o hay una exposición al virus H5N3 y de esta forma proporcionar a las autoridades pertinentes datos para proponer acciones para prevención y control de influenza aviar en Guatemala.

### III. HIPÓTESIS

#### A. Hipótesis.

El título de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar es mayor en la temporada migratoria a comparación de la temporada no migratoria en la población de patos domésticos de la costa sur de Guatemala.

Ho: El título de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar es igual en ambas temporadas.

Ha: El título de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar es diferente en ambas temporadas.

#### B. Descripción de variables:

Las dos variables que se tomarán en cuenta son el título de anticuerpos de muestras seropositivas para el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar y el tiempo, el cual fue dividido por temporadas. La temporada migratoria de aves acuáticas está definida por los meses de octubre 2013 a marzo 2014, mientras que los meses de abril 2014 a octubre 2014 constituyen la temporada no migratoria (Escobar, 2012).

C. Supuestos de la hipótesis:

Se asume que durante la temporada migratoria, las aves migratorias estarán en contacto con los patos domésticos. Si las aves migratorias están infectas con el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar, las aves domésticas que estén en contacto con las aves migratorias infectadas también se infectaran con el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar. A los 7 días de la infección se desarrollan los anticuerpos y estos pueden ser detectados hasta por 3 a 4 semanas por pruebas serológicas, como el ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación (Kim *et al.*, 2009). Como limitación del estudio, se puede mencionar que no se tomó en cuenta la edad de los patos domésticos, debido a que esta variable no fue incluida en el diseño experimental de la toma de muestras de los patos domésticos de la costa sur de Guatemala.

#### IV. OBJETIVOS

##### A. Objetivo general:

Describir la prevalencia de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar en patos domésticos presentes en la costa sur de Guatemala durante la temporada migratoria y la temporada no migratoria.

##### B. Objetivos específicos:

1. Implementar la prueba serológica de Inhibición de la Hemaglutinación para detección de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar.
2. Detectar anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar en patos domésticos de la costa sur de Guatemala.
3. Describir si existe una variación en el título de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar durante la temporada migratoria y temporada no migratoria en patos domésticos de la costa sur de Guatemala.

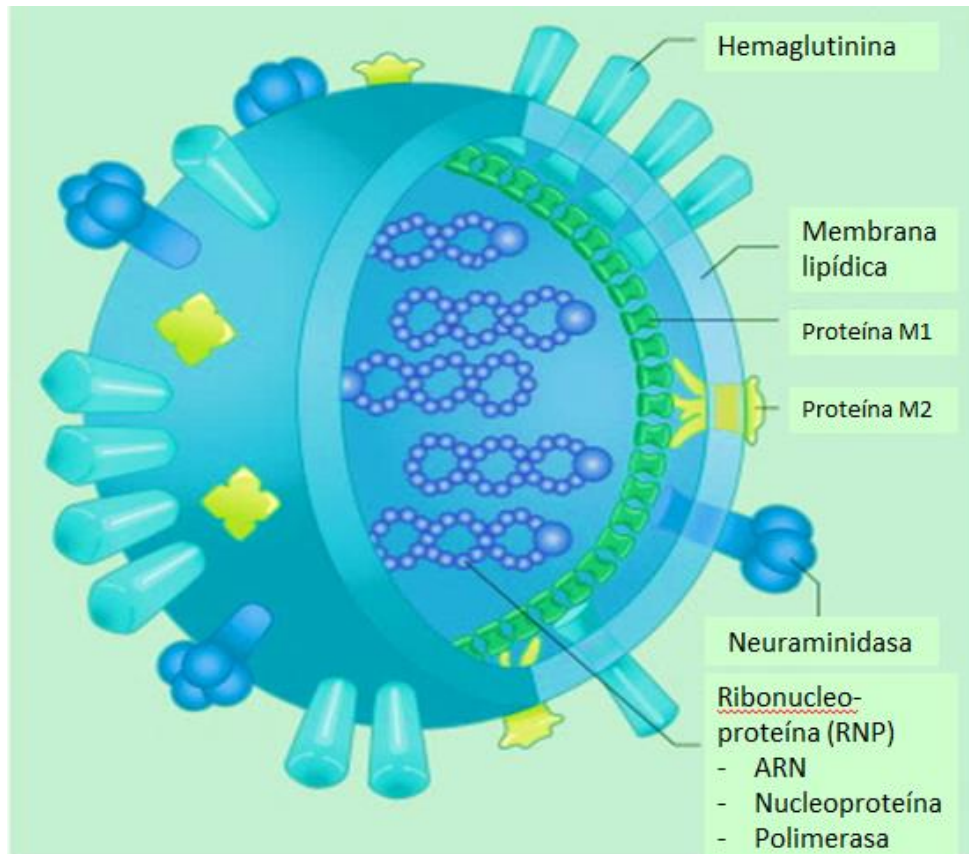
## V. MARCO TEÓRICO

### A. Generalidades de la influenza.

La influenza es una enfermedad infecciosa ocasionada por un virus perteneciente a la familia Orthomyxoviridae (Dengler, 2014). El virus tiene una forma esférica con un diámetro entre 80 - 120 nm. Cuenta con una membrana externa con aproximadamente 500 receptores dirigidos hacia el exterior (Figura 1). Estos receptores corresponden a las glicoproteínas hemaglutininas (HA) y neuraminidasas (NA), en donde las HA se encuentran en mayor proporción (Dengler, 2014). La proteína HA se encarga de la adhesión del virus con la célula hospedera, por medio del ácido siálico que se une a la superficie celular, permitiendo al virión fusionarse con la célula (Dengler, 2014). Por otro lado, la proteína NA está involucrada en la liberación del virión de los receptores de la célula para esparcirse a otros tejidos, ya que permite la separación del ácido siálico de las glicoproteínas o glucolípidos (Dengler, 2014).

En el interior del virus se encuentra la nucleocápside de forma esférica y de un tamaño de 9 a 15 nm. La nucleocápside está formada por la proteína M1 y dentro se encuentra el genoma viral. El genoma es de ARN de hebra simple con sentido negativo y está organizado en 8 genes segmentados e independientes (Dengler, 2014). Cada segmento se encuentra asociado al complejo de ribonucleoproteínas (RNPs), el cual está formado por el ARN viral, las nucleoproteínas (NP) y las polimerasas de ARN PB1, PB2 y PA. En cada segmento se encuentra el código para la síntesis de una o varias proteínas virales (Wilschut *et al.*, 2006; Dengler 2014). El complejo de RNP tiene un papel importante en el ciclo de infección del virus ya que la replicación ocurre en el núcleo de la célula hospedera (Zheng & Tao, 2013).

Figura 1: Estructura molecular del virus de influenza.



(Modifica de Wilschut *et al.*, 2006).

1. Características moleculares. Como anteriormente se ha mencionado, la diferencia entre el virus de influenza tipo A y los otros dos virus se basa en las proteínas antigénicas internas del virión, como lo son las nucleoproteínas (NP) y la proteína de matriz (M1) (Webster, 1992). El virus tiene un tamaño de aproximadamente 12 nm de diámetro y está rodeado por una bicapa de lípidos obtenida de sus hospederos, en donde se ubican las glicoproteínas HA y NA y la proteína M2 (Webster, 1992). Además posee una carcasa interna en la matriz formada de proteínas y en el centro están las nucleocápsides del genoma viral (Webster, 1992). Los ocho fragmentos que conforman el

genoma de ARN del virus codifican para 10 productos: PB1, PB2, PA polimerasa, HA, NA, NP, M1, M2, NS1 y NS2. A continuación se describe brevemente la función de cada proteína codificada en el genoma del virus (Webster, 1992).

a. PB1 polimerasa. Forma parte del complejo de ARN polimerasa y se encarga de la elongación del primer ARNm viral naciente y de los templados para síntesis de ARN y ARNv (Webster, 1992).

b. PB2 polimerasa. Parte del complejo de ARN polimerasa. Se encarga de la parte inicial de ARN de transcripción ya que reconoce y se une a la secuencia 5' del ARNm del hospedero para poder utilizarlos como *primers* para la transcripción del virus (Webster, 1992).

c. PA polimerasa. Es parte del complejo de ARN polimerasa dependiente de ARN. Tiene una función de quinasa (Webster 1992).

d. Hemaglutinina (HA). Es una proteína integral de membrana y el antígeno de superficie mayor. Se encarga de la unión del virión con la célula hospedera (Webster, 1992).

e. Neuraminidasa (NA). Proteína integral de membrana. NA se une al ácido siálico terminal de las glicoproteínas (como HA) permitiendo la liberación del virión de la célula del hospedero (Webster, 1992).

f. Nucleoproteína (NP). Esta proteína es sintetizada por las células infectadas y es transportada al núcleo de estas células, en donde permite la unión y encapsulación del ARN viral (Webster, 1992).

g. M1. Proteína más abundante en el virión. Esta proteína de matriz forma un escudo alrededor de la cápside del virión y tiene un papel en la iniciación del ensamblaje de los virus nuevos (Webster, 1992).

h. M2. Es una proteína integral de membrana. El dominio que atraviesa la membrana se utiliza como una señal para el transporte a la superficie celular. Forman un canal de protones para el control de pH durante la síntesis de HA y para mantener un pH ácido en el interior del virión durante la descapsidación del virus (Webster, 1992).

i. NS1. Es una proteína no estructural. Se encuentra en gran abundancia en el núcleo de las células infectadas y está relacionada en la replicación del virus (Webster, 1992).

j. NS2. Al igual que NS1, la proteína NS2 es no estructural. Esta proteína se le asocia funciones de replicación y de modulación en la síntesis de NS (Webster, 1992).

## B. Tipos de virus de influenza.

El virus puede dividirse en tres tipos, virus de influenza A, B y C, y pueden distinguirse por las diferencias entre sus nucleoproteínas y proteínas de matriz. El virus de influenza B se puede dividir en dos linajes por diferencias de antígenos, los cuales son los linajes de Victoria y Yamagata. Actualmente estos linajes pueden diferenciarse por un test de inhibición de la hemaglutinación o por PCR en tiempo real (Biere, Bauner & Schweiger, 2010). El virus de influenza B se encuentra asociado a humanos, sin embargo se ha aislado en nutrias (Bodewes *et al.*, 2013). Se ha encontrado que focas de la especie *Phoca caspica* son reservorios de virus de influenza A y B originarios de humanos (Ohishi *et al.*, 2002). Por otro lado, el virus de influenza C se ha aislado de humanos y en cerdos. Este último tipo de virus no puede causar epidemias y únicamente causa enfermedades respiratorias leves (Public Health Agency of Canada, 2011).

En la Figura 2 se puede observar la comparación de los tres tipos de virus causantes de influenza, en cuanto a la severidad de la enfermedad, potencial de causar pandemias, alteraciones antigénicas, genoma, medicamentos utilizados en tratamientos como Amantadina, rimantadina y zanamivir y las glicoproteínas de la superficie (Castillo, 2008). En el caso de del virus de influenza C, únicamente contiene una glicoproteína llamada

hemaglutinina.esterasa-fusión (HEF) la cual actúa como hemaglutinina y neuraminidasa, siendo la principal diferencia entre los otros dos tipos de virus (Chen *et al.* 1998).

Figura 2. Comparación tipos de virus de influenza A, B y C.

<b>COMPARACIÓN DE LAS INFLUENZAS A, B Y C</b>			
	<b>TIPO A</b>	<b>TIPO B</b>	<b>TIPO C</b>
Severidad de la enfermedad	++++	++	+
Reservorio animal	sí	no	no
Pandemias Humanas	sí	no	no
Epidemias humanas	sí	sí	no ( esporádica)
Alteraciones antigénicas	Flujo, cambio	flujo	flujo
Genoma segmentado	sí	sí	sí
Amantadina, rimantadina	sensible	Ningún efecto	Ningún efecto
Zanamivir (Relenza)	sensible	sensible	
Glicoproteínas de superficie	2	2	(1)

(Castillo, 2008).

El virus de influenza A puede infectar a varias especies de aves y mamíferos, como cerdos, caballos, mamíferos acuáticos y humanos (Heinen, 2003). Además, el tipo A puede dividirse en subtipos de acuerdo a las glicoproteínas hemaglutinina y neuraminidasa de su superficie. Actualmente existen 18 tipos de hemaglutinina y 11 de neuraminidasa (Tong *et al.*, 2013). Un ejemplo de esto es la influenza A (H3N2), en donde el virus cuenta con el tipo 3 de hemaglutinina y el tipo 2 de neuraminidasa, y es uno de los

virus de influenza humana más comunes en América. Únicamente los tipos de virus A y B ocasionan influencias estacionales, mientras que la enfermedad respiratoria causada por el tipo C es leve y no generaría epidemias (Dengler, 2014; Nucamendi, 2014). Los virus de influenza A son de gran importancia ya que las epidemias se han originado por la combinación de virus tipo A de animales y de humanos. La mayoría de los humanos no tendrían inmunidad hacia este nuevo virus (Webster, 2002).

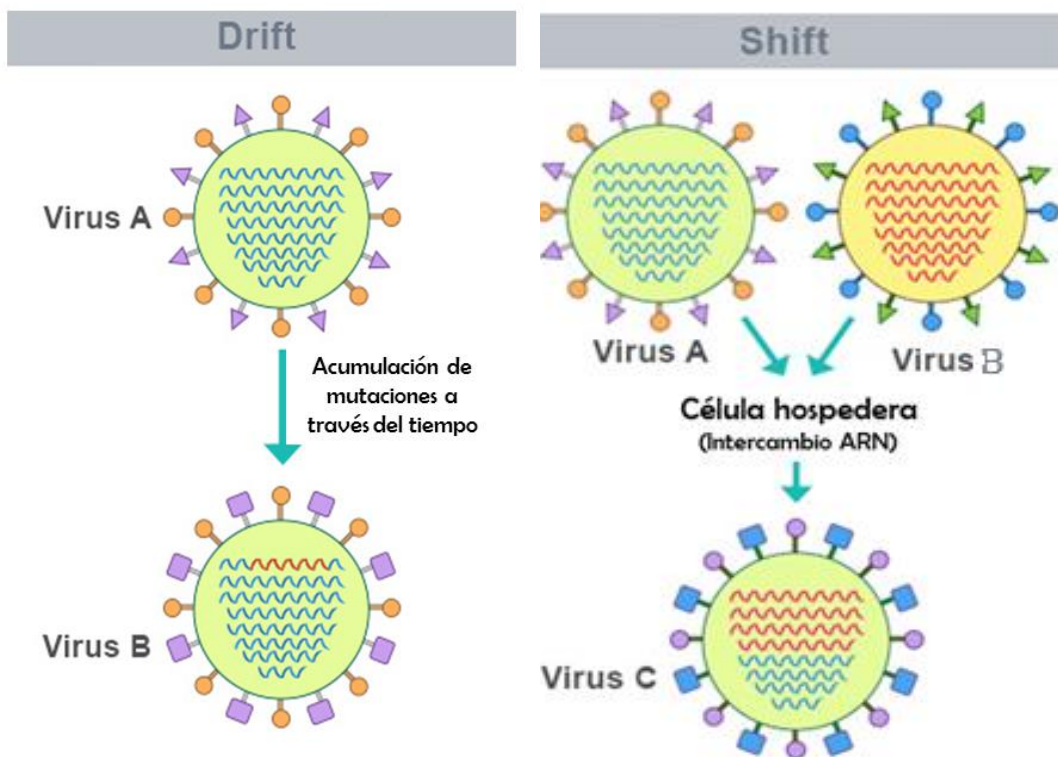
La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto un sistema de nomenclatura para los virus de influenza A. En este sistema se considera el tipo de virus (A, B o C), la especie de donde se aisló, lugar de detección, número de cepa, año de descubrimiento y los antígenos de superficie hemaglutinina y neuraminidasa según el número (OMS, 1980).

2. Virus de influenza tipo A. Por sus cambios genéticos constantes, se considera que el virus de influenza es impredecible y al pasar el tiempo las vacunas pierden su efectividad (Greenbaum & Bresee 2013). Las epidemias de influenza tipo A surgen de nuevas variantes antigénicas que se producen constantemente. Podría surgir un nuevo virus con otra combinación antigénica, al cual los humanos no tendrían inmunidad, originando una pandemia. Las variaciones genéticas relacionadas con los dos antígenos de superficie del virus pueden ocurrir por dos mecanismos: *drift* y *shift*.

El mecanismo *drift* de cambio antigénico está asociado a cambios menores en la hemaglutinina y neuraminidasa, mientras que el mecanismo *shift* presenta mayores cambios en las mismas glicoproteínas ya que se da un reemplazo de un segmento del

gen (Webster, 2002). En la Figura 3 se pueden observar los cambios formados por la variación antigénica mayor (*shift*) y la variación antigénica menor (*drift*) (Cruse & Lewis, 2010).

Figura 3. Cambio antigénico menor (*drift*) y cambio antigénico mayor (*shift*).



(Modificado de Ray, 2015).

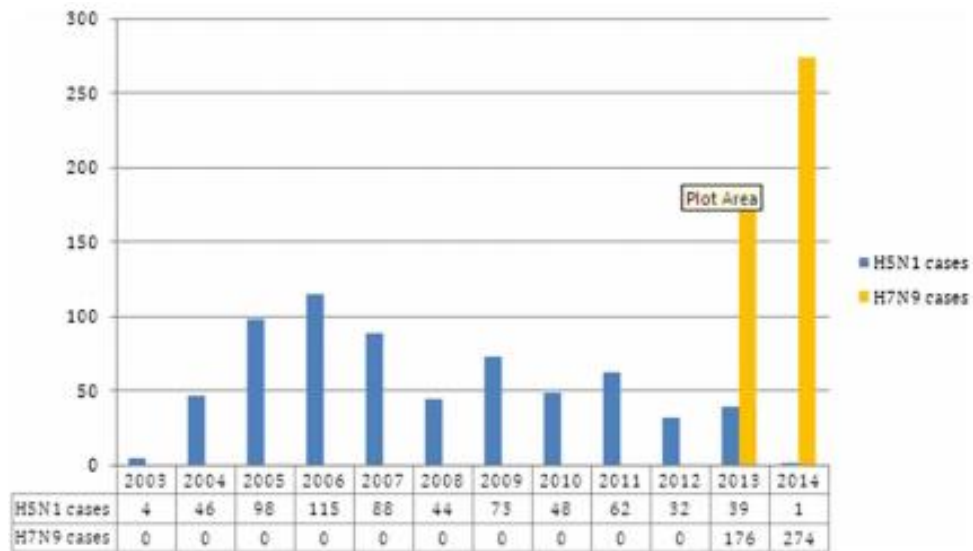
3. Virus de influenza A aviar. La influenza aviar es la enfermedad causada por un virus de influenza tipo A aviar. Las aves acuáticas son consideradas como reservorios naturales de influenza, ya que en las aves se han encontrado todos los subtipos de influenza A (Alexander, 2000). Entre las aves silvestres consideras como reservorios

naturales de influenza se encuentran los patos, cisnes, gansos y gaviotas. Por otro lado, las aves domésticas son altamente susceptibles hacia las cepas de virus de influenza aviar. Las aves domésticas pueden infectarse por la ingesta de comida o agua infectada por el virus de aves silvestres infectadas (Wahlgren, 2011).

Los virus de influenza A capaces de infectar aves se pueden dividir en dos categorías de acuerdo a su habilidad de causar enfermedad. En primer lugar se encuentran los virus de influenza de baja patogenicidad (LPAI, por sus siglas en inglés: *Low pathogenic avian influenza*) (Alexander, 2000). En la segunda categoría están los virus de alta patogenicidad (HPAI, por sus siglas en inglés: *Highly pathogenic avian influenza*). Los virus HPAI pueden tener una mortalidad de hasta 100% (Alexander, 2000). Dentro de esta categoría se encuentran los virus de influenza subtipo H5 y H7. Sin embargo, no todos los virus de estos subtipos son de alta patogenicidad (Alexander, 2000).

Los subtipos H5N1 y H7N9 han logrado cambiar de hospederos en los últimos 15 años, provocando brotes de influenza en humanos. Sin embargo, los brotes no se han convertido en pandemia ya que la transmisión no ocurre de humano a humano (Lazurus & Lian, 2015). En la Figura 4, se muestran los casos de H5N1 y H7N9 reportados en humanos, se puede observar que en los años 2013 y 2014 ha ocurrido un aumento en los casos reportados.

Figura 4. Casos reportados por virus de influenza aviar H5N1 y H7N9.



(Lazurus & Lian, 2015).

### C. Ciclo de transmisión del virus de influenza.

Los subtipos de virus de influenza A son específicos para ciertas especies, sin embargo en las aves están presentes todos los subtipos de influenza (CDC, 2005). Estos subtipos pueden transmitirse a otras especies causando daños en la salud. Como se muestra en la Figura 2, los subtipos de influenza A pueden ser transmitidos a los humanos por dos vías: (1) Transmisión directa de aves o contaminación del virus en el ambiente donde se encuentran las personas y (2) por medio de un hospedero intermediario como el cerdo (CDC, 2005). En estos dos casos es necesario que el virus adquiera las características necesarias para infectar las células de humanos.

Los virus de influenza aviar y de humanos poseen linajes estables en los cerdos debido a receptores en su epitelio para ambos virus (Peiris *et al.*, 2007). La presencia de



por contacto directo con superficies contaminadas, por contacto con manos o por aerosoles producidos al toser o estornudar a través de partículas en las micro-gotas respiratorias (Martínez, 2013). Cuando una persona inhala el virus, este se deposita en el epitelio de las vías respiratorias y el período de incubación dura entre 1 a 4 días (Martínez, 2013). Antes de la aparición de los síntomas ocurre el período de infección por la dispersión del virus (Martínez, 2013). Los síntomas de influenza más comunes son dolor de garganta, tos, congestión nasal, dolor muscular y de articulaciones, dolor de cabeza, aumento de temperatura ( $>37.8$  °C), problemas respiratorios, pérdida de apetito y debilidad (Monto *et al.*, 2000; Cruz *et al.*, 2013). Los niños pueden presentar otitis media, náusea y vómitos. Los síntomas de influenza pueden desaparecer luego de 3 a 7 días, aunque puede presentarse tos y malestar por dos semanas más (Fiore *et al.*, 2008).

La influenza en los adultos puede contagiarse desde un día antes de que aparezcan los síntomas y de 5 a 7 días desde el inicio de los síntomas y los niños pueden ser infecciosos por más de 7 días luego de la aparición de los síntomas (Fiore *et al.*, 2008). Por otro lado, las personas inmunocomprometidas pueden transmitir el virus por semanas o meses (CDC, 2013). La gravedad de la influenza puede variar por temporadas dependiendo del virus de influenza, disponibilidad de vacunas, personas vacunadas y la eficiencia de la vacuna contra el virus de influenza. En cuanto al riesgo de contraer influenza, cualquier persona puede adquirir esta enfermedad, sin embargo existen personas que presentan un alto riesgo de desarrollar complicaciones mientras tienen influenza, a diferencia de otras que pueden recuperarse en un período corto de aproximadamente 2 semanas (CDC, 2014). Entre estas personas se encuentran los mayores de 65 años, personas de edad media con condiciones médicas crónicas, mujeres embarazadas y niños de menor edad (CDC, 2014). Algunas complicaciones que

pueden desarrollarse durante la infección son la neumonía, bronquitis, infección sinusal y del oído. Además, cuando una persona tiene influenza esto puede agravar enfermedades crónicas, como asma e insuficiencia cardiaca congestiva crónica (CDC, 2014).

2. Sintomatología en aves. Las infecciones de aves por el virus de influenza pueden tener un amplio rango de signos clínicos, incluyendo depresión, alteración del ánimo, disminución de ingesta de alimentos, baja producción de huevos, ojos húmedos con alta producción de lágrimas, tos, estornudos, entre otros (Carver, s.f). Algunas infecciones pueden ser asintomáticas y otras pueden ser respiratorias leves hasta graves, con un alto grado de morbilidad y mortalidad (Suarez & Schultz, 2000).

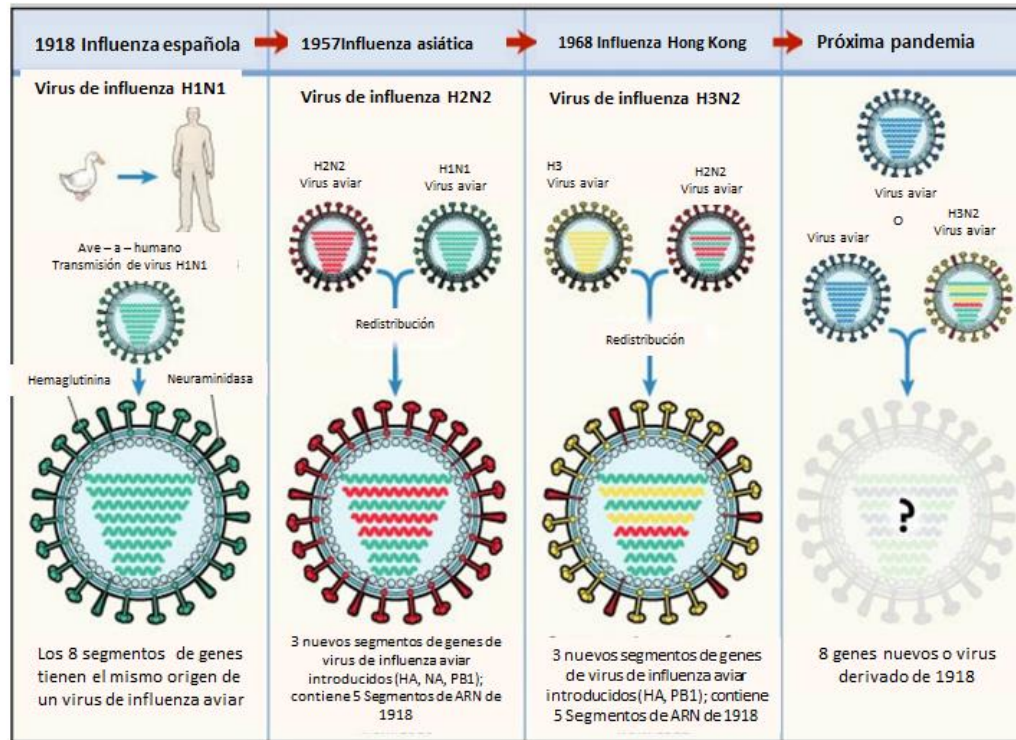
#### E. Epidemiología.

Existe una hipótesis en la que se indica que todos los virus de influenza de mamíferos fueron derivados de reservorios aviares de influenza (Webster, 2002). Estudios de la ecología de virus de influenza han realizado análisis filogenéticos con secuencias de ácidos nucleicos de virus de influenza tipo A tomando en cuenta varios hospederos, subtipos de virus y regiones geográficas (Webster, 2002). Un análisis empleando el gen de nucleoproteínas reveló la relación entre los virus de influenza aviar y equinos, gaviotas, cerdos y humanos, indicando un origen común. Los virus de influenza con origen aviar están involucrados en brotes de influenza en mamíferos. Cuando el virus se transmite a otras especies, se establece un linaje permanente en esa especie (Webster, 2002).

1. Pandemias causadas por virus de influenza. Se han registrado diferentes pandemias de influenza durante el siglo XX, algunas de ellas fueron la influenza española en 1918 – 1919 por H1N1, influenza asiática en 1957 – 1958 por el virus H2N2, influenza de Hong Kong en 1968 por el virus H3N2 y México en 2009 por el virus H1N1 (Barriga *et al.*, 2006). Lo que tienen en común estas pandemias es que se originaron por un virus animal que pudo recombinarse con otro virus de origen animal o humano. La influenza española fue originada por un virus de influenza de aves, el cual pudo adaptarse para replicarse eficientemente en humanos (Belshe, 2005). La influenza española causó alrededor de 20 a 40 millones de muertes, correspondiente al 2.5 – 5 % de la población global. Las siguientes pandemias registradas fueron de menor impacto debido a la inmunidad a virus endémicos que causaron la nueva mutación, además de mejoras en las estrategias de control (García, 2014).

En el caso de la influenza asiática y de Hong Kong, ocurrió una recombinación de virus entre uno de origen aviar y otro de humano (Belshe, 2005). El nuevo virus de la influenza asiática, H2N2, adquirió tres segmentos genéticos del virus procedente de aves, estos segmentos corresponden a la hemaglutinina, neuramidasa y el gen de la polimerasa a (PB1). Por otro lado, el virus de la influenza de Hong Kong adquirió los segmentos genéticos de un virus de aves correspondientes a la hemaglutinina y PB1 (Belshe, 2005). El mecanismo que utilizaron las tres pandemias de influenza española, asiática y de Hong Kong puede visualizarse en la Figura 3, en donde también se plantea la posibilidad de formación de un nuevo virus de influenza que pueda causar otra pandemia como ocurrió en México en el 2009 (Belshe, 2005).

Figura 6. Mecanismos de generación de virus influenza que ocasionaron las pandemias de influenza española, asiática y Hong Kong.



(Modificado de Belshe, 2005).

En el 2009 ocurrió la pandemia de influenza H1N1, en donde México fue el primer país en reportar este caso de influenza A. Los primeros estudios del CDC indicaron que el subtipo H1N1 fue conformado por segmentos del virus de influenza de humanos, aviar y porcino. Los primeros casos reportados en México ocurrieron en marzo de 2009, posteriormente el virus se extendió por Estados Unidos y Canadá, obteniendo alrededor de 1000 casos (Babakir-Mina, 2009). En junio de ese mismo año se alcanzaron los 30,000 casos aproximadamente y 145 muertes en 74 países. Con esto se declaró la fase de pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Vaqué, 2009). En el mes de

noviembre la OMS reportó más de 503,536 infecciones por influenza y al menos 6260 muertes, continuando con la transmisión del virus en todo el mundo (Gil, 2010).

Debido a que este subtipo era nuevo, fue necesario el aislamiento del virus por medio de la técnica de cultivo en huevos de gallina para confirmar las infecciones de los casos clínicos que se presentaban. El Centro para el control y prevención de enfermedades de Estados Unidos, CDC por sus siglas en inglés (*Center for disease control and prevention*), colocó secuencias completas del nuevo virus aislado para que los científicos pudieran utilizarlas como comparación de virus recolectados en diferentes partes del mundo y para investigaciones de salud pública (CDC, 2010). Además el aislamiento del virus permitió el desarrollo de vacunas contra el subtipo H1N1. Al obtener drogas contra la influenza H1N1, el CDC junto a la FDA (*Food and Drug Administration*) autorizaron su uso para el tratamiento de influenza. En el año 2010, el CDC mantuvo vigilancia de los casos de H1N1 intercambiando información con otras instituciones para mantener un control sobre el avance del virus e iniciaron las campañas de vacunación contra influenza estacional e influenza H1N1 (CDC, 2010). Se estima que durante abril 2009 y enero 2010 ocurrieron 57 millones de casos de influenza H1N1, en promedio (CDC, 2010).

En el caso de la última pandemia de influenza A iniciada en México, se evaluaron los efectos económicos y sociales en la región latinoamericana con el apoyo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Esto se realizó por medio de estimaciones del cambio en el flujo económico ocasionado por la pandemia en varios sectores relacionados con la economía, como es el caso del sector de salud, educación, comercio, turismo, entre otros. Los cambios económicos se vieron afectados por los gastos necesarios para atender los casos de influenza que se encontraban fuera del presupuesto

normal y por la baja producción y consumo de bienes o servicios (CEPAL/OPS-OMS, 2010).

En cuanto al sector de salud, se indicó que durante la pandemia de influenza en México el costo total de tratamiento para los pacientes fue de aproximadamente 2 millones de pesos. Sin embargo, por los gastos de prevención para el personal de salud campañas de información, equipos y materiales necesarios para la detección del virus y medicamentos el costo se elevó a 4 millones de pesos (CEPAL/OPS-OMS, 2010). En cuanto al sector de educación, fue necesario suspender las actividades escolares, implementando un sistema de supervisión y limpieza de las escuelas, aumentando aún más los costos. En el sector de comercio, se observó una caída de venta por el cierre de establecimientos dedicados al comercio para evitar la transmisión del virus. El valor de la pérdida de ventas comerciales se estimó en 45 millones de pesos (CEPAL/OPS-OMS, 2010).

La OMS indicó que el consumo de carne de cerdo no implicaba el contagio de influenza, sin embargo la venta de cerdo en los mercados de varios países se vieron afectados, así como las exportaciones. Otro punto de gran impacto en la economía de los países se encuentra relacionado con el sector de turismo, ya que representa un gran ingreso económico para varios países. En el caso de México, se estimó que las pérdidas fueron de un 6% en relación con el 2008 para los turistas extranjeros. (CEPAL/OPS-OMS, 2010). Esto muestra el impacto de la pandemia de influenza en el año 2009, el cual fue notorio para varios países además de México. En Guatemala, se estimó que la pérdida económica formal e informal alcanzó los Q. 40 millones. Además los costos de

hospitalizaciones se evaluaron en aproximadamente Q. 7 millones y para consultas en Q.55 millones (Ortiz, 2013).

La aparición de un nuevo tipo de virus de influenza podría ocasionar una nueva pandemia debido a la rápida dispersión del virus por transporte aéreo y la disminución de tiempo para combatirlo. Por lo tanto los sistemas de salud se encontrarían rebasados y ocurrirían grandes pérdidas económicas (Gangurde *et al.*, 2011).

2. Epidemias de origen animal. Las epidemias estacionales de influenza se propagan actualmente en todo el mundo durante otoño e invierno. En 1947, se creó la vigilancia de influenza por parte de la Red Mundial de Vigilancia Epidemiológica, integrada por 125 instituciones de 96 países (Gutiérrez, 2009). En Europa se han registrado varios tipos de virus de influenza en aves comerciales y domésticas. Sin embargo, en Asia es donde se han reportado más casos de brotes de virus de influenza aviar, tanto en la aves de corral como en humanos, especialmente el subtipo H5N1 (OMS, 2005).

En Hong Kong (1997) ocurrió el primer brote de influenza A(H5N1) en humanos. Se confirmaron 18 casos y ningún caso se había reportado previamente a lo largo de 6 meses (Chan, 2002). La infección de humanos con este virus ocurrió por el contacto directo con gallinas infectadas, ya que 15 de los 18 sujetos fueron se siguieron en un estudio de caso, en donde indicaron que una semana antes del comienzo de la manifestación de síntomas, habían comido o preparado productos de aves de corral (Chan, 2002). Para controlar el brote se sacrificaron más de 1.5 millones de gallinas en ese año, provocando un impacto económico negativo debido a la falta de comercio de

aves de corral. A partir de este brote, la vigilancia continua de influenza cobró más importancia en el monitoreo de las cepas del virus H5 en animales, especialmente aves de corral, y en humanos (Chan, 2002).

Seguido a esto, en 2004 fue la primera vez que el virus de alta patogenicidad H5N1 fue tomado en serio como un potencial de muerte para los humanos (Ngoc *et al.*, 2006). Acompañado de los múltiples brotes en la población de aves de corral y a la dispersión global del virus, en el 2004 ya se habían reportado más de 200 casos de humanos infectados con el virus de alta patogenicidad H5N1, con una alta tasa de mortalidad. A partir de estos brotes, se han realizado varios estudios de seroprevalencia de trabajadores del área de salud y estudios de caso control en poblaciones de aves de corral den Tailandia (Ngoc *et al.*, 2006).

En Estado Unidos, desde 1997 se ha monitoreado el virus de influenza aviar a partir del aislamiento del virus en aves domésticas. El virus de influenza aviar es endémico de las aves silvestres de Norteamérica y el virus se transmite rutinariamente a las aves domésticas de la región (Suárez, Spackman & Senne, 2003). La mayoría de los virus aislados en estas aves han sido los subtipos H5 y H7, en donde prevalecen los virus H7N2, H7N3 y H5N2. En el 2002, ocurrió el mayor brote en aves de corral reportado en Estados Unidos en Virginia, ocasionado por el virus H7N2 (Suárez, Spackman & Senne, 2003).

Además de este brote en Virginia, han ocurrido otros brotes en la población de aves de corral por influenza de alta patogenicidad en América, como el brote de Chile en el 2002 por el subtipo H7N3, brote por este mismo subtipo en Canadá en 2004 y un brote por el subtipo H5N2 Texas, Estados Unidos (Senne, 2007). El brote de Canadá fue el más

grande y perjudicial de los tres, en donde estuvieron involucradas 42 explotaciones con aproximadamente 17 millones de aves de corral. Nuevamente para controlar estos brotes, se llevó a cabo un exterminio de las aves en las granjas (Senne, 2007).

Han ocurrido otros brotes por virus de influenza de baja patogenicidad, en donde los subtipos H3, H5 y H6 han sido reportados en aves domésticas y los subtipos H3, H5, H11 y H13 en aves silvestres, en Canadá (Senne, 2007). En México y países de Centroamérica, especialmente Guatemala y El Salvador, se ha reportado el subtipo H5N2 de baja patogenicidad desde el 2000 y 2001. Se encontró que los virus aislados en Guatemala y El Salvador son genéticamente similares al virus de México y este es el subtipo que recientemente se mantiene circulando en las aves domésticas de estos países. A partir de estos hallazgos y para prevenir futuros brotes, estos países han realizado vacunaciones a gran escala contra el subtipo H5 en la población de aves utilizadas para comercio (Senee, 2003; García & Ramos, 2006).

Como se ha mencionado, se han registrado varios casos de infección en aves de corral y en personas con los virus de influenza aviar subtipo H5 y H7, afectando la vida de las personas, la economía y comercio de los países involucrados (OMS, 2005). Estos virus ahora son endémicos en la población de los países de Asia que han sido más afectados por los brotes, como Cambodia, China, Indonesia, Japón, Tailandia y Vietnam (Gutiérrez, 2009).

## F. Técnicas de diagnóstico.

Para el diagnóstico de influenza A pueden utilizarse técnicas serológicas o moleculares, para las cuales se describen algunos ejemplos a continuación.

### 1. Serológicas.

a. Inmunodifusión en gel de agar (IGDA). El análisis serológico puede ser suplementario para la detección de influenza. La inmunodifusión en gel de agar (IGDA) es una técnica serológica utilizada para determinar la infección de aves por medio de la presencia o ausencia de anticuerpos del virus (OIE, 2005). Esto es posible ya que todos los subtipos de virus tienen una nucleocápside y antígenos en la matriz con características antigénicas similares. Los antígenos se preparan por medio de la concentración del virus en líquido alantoideo infectivo y se prueban frente a un control positivo de antisueros conocidos (OIE, 2005). Además existen enzimo-inmuno ensayos, como ELISA, que demuestran la presencia de nucleoproteínas del virus de influenza A de una forma específica y con alto grado de sensibilidad (OIE, 2005).

b. ELISA para detección de anticuerpos contra virus de influenza. La técnica de ELISA se utiliza para la detección de anticuerpos o antígenos del virus de influenza en sueros. Esta técnica utiliza anticuerpos marcados con enzimas y puede dividirse en directo si detecta antígenos del virus o indirecto si detecta anticuerpos. Se basa en el concepto de unión de antígeno con su respectivo anticuerpo (Gan & Patel 2013).. El

anticuerpo o antígeno (dependiendo del tipo de ELISA) se fija a una fase sólida antes de ser expuesta a la muestra. Luego se añade la muestra y ocurre la unión del anticuerpo con el antígeno inmovilizado en el soporte, en el caso del ELISA directo. Seguidamente, el antígeno es detectado con un segundo anticuerpo unido a una enzima y se añade un sustrato cromogénico específico para la enzima mostrando un cambio de color o fluorescencia indicando así la presencia del antígeno (Gan & Patel 2013). Se realizan lavados entre cada paso para remover los componentes que no se han unido, como anticuerpos o antígenos en solución, anticuerpos acoplados a enzimas y sustratos (Rojas, 2006).

c. Prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI) para detección de subtipo de anticuerpos contra virus de influenza. Los ensayos de inhibición de la hemaglutinación son utilizados para evaluar la respuesta inmune a la hemaglutinina (HA) del virus de influenza A. La hemaglutinina tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos ya que poseen receptores complementarios y se unen por medio de enlaces (OMS, 2013). Por lo tanto, la hemaglutinación detecta la carga viral en cultivos celulares mediando el cambio del patrón normal de sedimentación. La unión específica de anticuerpos a los sitios antigénicos de las hemaglutininas del virus inhibe la hemaglutinación, siendo esto en lo que se basa el ensayo (OMS, 2013). Antes de realizar el ensayo, es necesario eliminar los inhibidores no específicos que se encuentran normalmente, para que los resultados proporcionados por el ensayo sean correctos (Spackman, 2008).

Esta técnica es simple y de bajo presupuesto. Se considera que esta prueba es de alta especificidad ya que únicamente detecta anticuerpos contra el virus que se está

utilizando y es posible que no detecte anticuerpos contra otro virus del mismo subtipo, ya que en un mismo subtipo de virus de influenza se pueden encontrar varias cepas que varían en uno o más epítomos (Spackman, 2008).

## 2. Moleculares.

a. qRT-PCR. La técnica molecular de RT-PCR en tiempo real se ha usado para la detección y caracterización de influenza (OMS, 2009). La técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) consiste en la amplificación de un templado de ADN. Se utilizan secuencias específicas de oligonucleótidos cortas de ADN llamadas *primers*, las cuales se hibridizan en una orientación 5' a 3' en la secuencia objetivo de ADN. Los *primers* permiten ser el punto de partida para la producción de la hebra de ADN complementaria por medio de la adición de nucleótidos por la Taq polimerasa. Esta enzima fue obtenida de bacterias termófilas por lo que puede actuar a altas temperaturas (70 – 75 °C). Esta reacción se repite en varios ciclos (alrededor de 35 ciclos) (Maxwell, 2007). Existen modificaciones que han surgido como métodos estandarizados del PCR convencional, de esta forma es posible utilizar esta técnica para un espectro más amplio de microorganismos, como el PCR de transcriptasa reversa (RT-PCR) y el PCR en tiempo real (qPCR) (Koneman & Allen 2008).

En el caso del virus de influenza, se utiliza el PCR de transcriptasa reversa (RT-PCR) ya que es un virus de ARN. El RT-PCR permite la formación del ADN complementario (ADNc) a partir de ARN utilizando una enzima de transcriptasa reversa. Al formarse el ADNc se continua con el proceso como un PCR convencional, en el que se amplifica en

varios ciclos un fragmento de interés por medio de *primers* específicos y la ADN polimerasa (Koneman & Allen 2008). Una segunda variación del PCR, es el PCR en tiempo real (qPCR), permitiendo realizar la amplificación de un segmento y su cuantificación de forma simultánea. La cuantificación se realiza por medio de la medición de fluorescencia por el uso de sondas. Las sondas son secuencias de oligonucleótido con un fluoróforo que puede ser excitado a una longitud de onda específica. Cuando la sonda se une a la secuencia se libera el fluoróforo, el cual puede emitir fluorescencia. Los equipos de PCR en tiempo real incluyen el termociclador, sistema óptico de excitación de fluorescencia y un colector de emisión (Murphy, 2011).

Las técnicas de PCR en tiempo real y de transcriptasa reverse pueden utilizarse en conjunto para la amplificación de fragmentos del genoma del virus de influenza para determinarlos y cuantificarlos. El ensayo de Taqman (Taq ADN polimerasa) es un método utilizado en PCR en tiempo real para la cuantificación de ARNm y detección de variantes (Heid *et al.*, 1996). Este método permite utilizar de una mejor forma la actividad de endonucleasa de la Taq ADN polimerasa para poder separar una sonda durante los ciclos del PCR para producir una señal de fluorescencia detectable (Heid *et al.*, 1996). La reacción de Taqman requiere la hibridización de la sonda con dos diferentes fluoróforos, uno es el fluoróforo reportero y el otro es el fluoróforo de templado (Heid *et al.*, 1996). Cuando la sonda está intacta la energía de fluorescencia se transfiere del fluoróforo reportero al de templado. Durante los ciclos de la reacción de PCR la sonda se separa del fluoróforo por la ADN polimerasa provocando que la emisión del fluoróforo reportero no se transfiera de forma eficiente al del templado, provocando un aumento en la emisión de fluorescencia del fluoróforo reportero (Heid *et al.*, 1996).

El análisis de RT-PCR en tiempo real debe ser específico para genes conservados, de esta forma se logra detectar todos los tipos de virus de influenza A. Además, el análisis puede ser enfocado a los genes de hemaglutinina o neuraminidasa para determinar específicamente la presencia de un subtipo de virus ( Peiris 2007). El PCR en tiempo real permite minimizar el tiempo de trabajo a 4 – 6 horas a comparación de un PCR convencional con una duración de 6 a 8 horas, además de incrementar la sensibilidad por el uso de sondas y cuantificar la presencia del virus ( Peiris *et al.*, 2007).

#### G. Estudios sobre influenza en Guatemala realizados en el CES.

En el Centro de Estudios en Salud (CES), parte del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala, se han realizado varias investigaciones sobre la enfermedad respiratoria de influenza con el fin de contribuir al bienestar de la salud en Guatemala y Centroamérica. Se ha realizado una vigilancia de aves silvestres de las costas del Pacífico, en donde se han aislado 15 muestras positivas para influenza, detectadas por RT-PCR en tiempo real (González-Reiche, 2012). Se identificaron los subtipos H7N9, H11N2, H3N8, H5N3, H8N4 y H5N4, encontrado que estos virus presentan una alta relación filogenética con los virus de influenza aviar de Norteamérica. Esto sugiere que las aves migratorias transportan el virus desde esta región hasta Guatemala (González-Reiche, 2012). Además se ha indicado que la especie de cerceta de aves azules (*Anas discors*) tiene un papel importante en la introducción y mantenimiento del virus de influenza en las regiones muestreadas de la costa en Guatemala (González-Reiche,2012).

## VI. MARCO METODOLÓGICO

A. Implementación de la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación HI para la detección de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar.

1. Preparación de eritrocitos de sangre de pollo. Para los ensayos de Inhibición de la hemaglutinación (HI) y Hemaglutinación (HA) se utilizaron eritrocitos de origen aviar, colectados de pollos sin antecedentes de infecciones previas de influenza A (CDC, 2011). Para ello, se colectó sangre de pollo y se colocó inmediatamente en solución Alsever (Anexos I) para evitar coagulación. Luego los eritrocitos se lavaron agregando PBS 0.01 M pH 7.4 y centrifugando a 800xg (1,800 rpm) por 10 minutos a 4 °C. Se removió el sobrenadante de PBS que contenía células blancas y se repitió el lavado hasta que el PBS saliera sin material sanguíneo (aproximadamente dos lavados más). Por último se preparó la solución de eritrocitos (RBC – *Red Blood Cells*) a una concentración de 0.75% (CDC, 2011; OMS, 2002) en PBS. Para descartar la presencia de anticuerpos contra influenza A, a la sangre de pollo se le realizó un ensayo ELISA utilizando el kit comercial *Type A Influenza Multispecies Antibody Test Kit AI-Multi* (Biocheck, Holanda) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

2. Titulación de virus de influenza aviar por ensayo de Hemaglutinación (HA). Se tituló el virus *A/blue-winged teal/Guatemala/CIP049-09/2010(H5N3)* por medio de la técnica de Hemaglutinación (HA). Este virus fue aislado en huevos embrionarios de pollo

de un hisopado cloacal de *Anas discors* colectado en la costa del Pacífico de Guatemala en el 2010, según protocolo ya publicado (OMS, 2002). Esta prueba se basa en la habilidad del virus de aglutinar los eritrocitos, ya que el virus posee hemaglutininas que se unen a los eritrocitos evitando la sedimentación de estas células. Para la prueba, se utilizó una placa de 96 pozos con fondo en “V”. Se agregaron 50 µL de PBS 0.01 M pH 7.4 a todos los pozos y luego 50 µL del antígeno (virus) aislado en el primer pozo de dos filas (duplicado) y se realizaron diluciones seriadas (1:2 hasta 1:4,096) a lo largo de la fila como se muestra en la Figura 7. Dos filas de la placa se utilizan como control de células en donde se agrega 50 µL de PBS y 50 µL adicionales para realizar la dilución seriada al igual que con el virus. Después se agregaron 50 µL de la solución RBC 0.75% a todos los pozos utilizados y se dejó incubando la placa a 4 °C por 1 hora (Carbey *et al.* 1974; OMS, 2002).

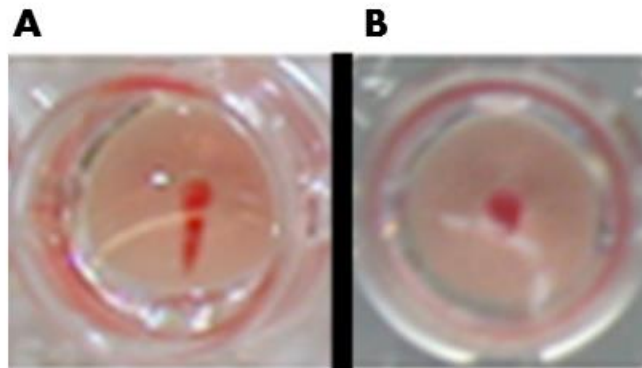
Figura 7: Distribución de la placa para ensayo de hemaglutinación en donde se coloca el virus (duplicado), y el control de células (CC).

Muestra		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Control de células (CC)</b>	<b>A</b>	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	<b>B</b>	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
<b>Virus H5N3</b>	<b>C</b>	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2,048	1:4,096
	<b>D</b>	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2,048	1:4,096
	<b>E</b>												
	<b>F</b>												
	<b>G</b>												
	<b>H</b>												

Los números colocados en la parte superior del mapa (Figura 7) corresponden al número de columna en la placa, y las letras colocadas al lado izquierdo de la placa corresponden a cada fila de la placa.

Luego de incubar la placa, se observaron los resultados inclinando la placa a un ángulo  $60^\circ$ . Se considera un resultado positivo si ocurre aglutinación de los eritrocitos (Ausencia de un botón de eritrocitos al fondo del pozo o la presencia de un botón el cual no cae al inclinar la placa). Sin embargo la presencia de una gota fina en el pozo también se considerará como un resultado positivo (Figura 8) (Noah *et al.*, 2009). El título del virus es definido como la dilución más alta a la cual ocurre hemaglutinación y es expresado en unidades de hemaglutinación (HA). Luego de obtener el título, se diluyó el virus con PBS para tener una concentración de 4 unidades de hemaglutinación por cada  $25\ \mu\text{L}$  ( $4\text{HA}/25\ \mu\text{L}$ ), para poder ser utilizado en la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (Carbey *et al.* 1974; OMS, 2002).

Figura 8. Criterio para interpretar los resultados de la placa del ensayo HA.

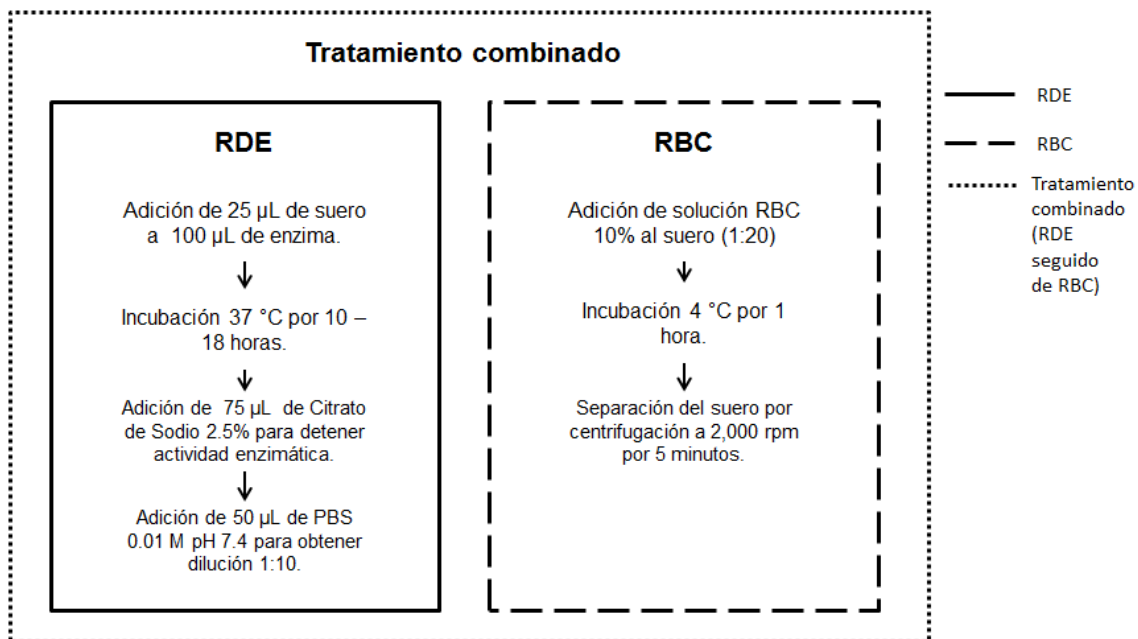


Ambas imágenes, (A) y (B), de la Figura 8 muestran un resultado positivo para HA, el cual se determina por medio de la aglutinación de los eritrocitos. Esto ocurre si el virus se une a los eritrocitos evitando la sedimentación de estos al fondo de la placa (Noah *et al.*, 2009). Un botón que no cae al inclinar la placa a un ángulo de  $60^\circ$  (A) o la presencia de una gota fina (B) son considerados como un resultado positivo.

### 3. Preparación de muestras para la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación.

Para el ensayo HI es necesario que el suero a utilizar sea de buena calidad, libre de contaminación bacteriana y no debe tener una hemólisis excesiva. El suero podía tener aglutininas naturales que interfirieran en la prueba por una aglutinación no específica a los eritrocitos. Para evitar esto, fue necesario tratar el suero para eliminar las aglutininas inespecíficas antes de realizar el ensayo HI. Se evaluaron varios tratamientos incluyendo: (1) Tratamiento con RDE (*Receptor Destroying Enzyme*) (2) Tratamiento con RBC (*Red Blood Cells*) compactas y (3) Tratamiento combinado (RDE seguido de RBC). En la Figura 9 se indica el procedimiento para cada tratamiento.

Figura 9: Procedimientos para tratamientos con RDE, RBC y combinado para eliminar aglutininas inespecíficas.



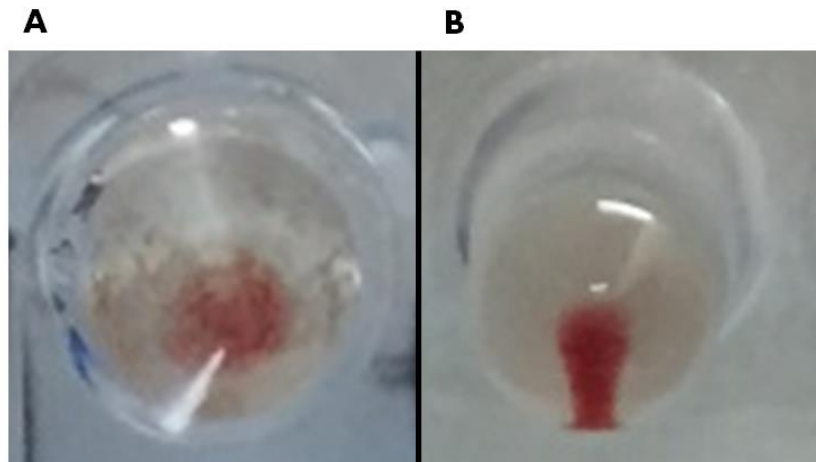
(OMS, 2013; OMS, 2002).

La evaluación de tratamientos se realizó utilizando los siguientes controles:

- a. Control positivo para el subtipo H5N3. Anticuerpo monoclonal recombinante reactivo a los subtipos H5NA de influenza A. Proporcionado por el MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación).
- b. Control negativo para el subtipo H5N3. Control seropositivo subtipo pH1N1.
- c. Muestras de suero de patos domésticos de la costa sur de Guatemala seleccionadas al azar. Para evaluar si los tratamientos también eran efectivos para las muestras y no solo para los controles de referencia.

Para determinar la presencia de aglutininas inespecífica se realizó una evaluación de suero de cada control y muestra descrito anteriormente (La evaluación de suero consiste en agregar el suero y en lugar de agregar el antígeno se añade PBS), para esto se agregó 25  $\mu$ L de PBS 0.01 M pH 7.4 y 25  $\mu$ L de suero tratado a un pozo de una placa en "V". Luego se agregó 50  $\mu$ L de solución RBC 0.75% y se incubó a 4°C por 1 hora. Se inclinó la placa a un ángulo de 60° para observar el resultado. Las aglutininas inespecíficas se pudieron observar por la presencia de un botón con bordes dispersos o un botón difuso que no cae al inclinar la placa a un ángulo de 60° (Figura 10A). El suero está libre de aglutininas inespecíficas, si el botón formado al fondo de placa cae formando una gota al inclinar la placa en un ángulo de 60° (Figura 10B).

Figura 10. Criterio para evaluar la eficiencia de tratamientos para eliminar aglutininas inespecíficas al realizar un control de suero.



En la imagen (A) se considera que el suero tratado aún tiene aglutininas inespecíficas por la presencia de un botón difuso. En la imagen (B), se considera que el tratamiento fue eficaz ya que el botón formado al fondo cae al inclinar la placa en un ángulo de 60°.

#### 4. Procedimiento prueba de Inhibición de hemaglutinación (HI):

a. Placa control. La placa control tiene como objetivo evaluar que en el ensayo HI se realice correctamente para validar el ensayo para las muestras. Se realiza una placa control por corrida antes de realizar el ensayo para las muestra, no se corren todos los controles por placa de muestras ya que se utilizan dos columnas de la placa por cada control (duplicado) y las columnas sobrantes no serían suficientes para realizar el ensayo para varias muestras. Si se obtienen los resultados esperados para cada control, se asegura que el ensayo funcionará correctamente para las muestras analizadas en la

misma corrida que la placa control, ya que se utilizan los mismos reactivos (virus y RBC 0.75%) preparados para los controles.

El ensayo se trabajó en una placa de 96 pozos con forma en “V”. En primer lugar se realizó la placa control, en donde se trabajaron dos columnas (duplicado) para cada control. A continuación se describe los controles utilizados para la placa control:

1) Control de células (CC). Contiene PBS, antígeno y eritrocitos. Este control busca evaluar los eritrocitos, por lo que no se agrega suero ni antígeno, en donde se espera que como resultado se observe un que botón caiga al inclinar la placa, ya que los eritrocitos deberían estar libres para poder sedimentarse al final del pozo (Figura 12 A). Aunque este resultado esperado es igual al resultado esperado para un control positivo, este control no es considerado como control positivo ya que la muestra no es un suero con anticuerpos contra el subtipo H5N3.

2) Titulación reversa (BT – *Back Titration*) del virus A/blue-winged teal/ Guatemala/CIP049-09/2010(H5N3) titulado previamente para corroborar las 4 UHA/25 µL del antígeno, como el volumen final de cada pozo es de 50 µL se utiliza 8 UHA/50 µL. Contiene antígeno (Virus) y eritrocitos. Se espera la hemaglutinación en los pozos correspondientes a este control hasta la dilución 1:8 (8 HA/50 µL) debido a la ausencia de anticuerpos ue inhiban la aglutinación (Figura 12 B).

3) Control positivo para H5N3. Anticuerpo monoclonal recombinante reactivo a los subtipos H5NA de influenza A. Proporcionado por el MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación). Contiene anticuerpos contra el subtipo H5NA, virus y eritrocitos. Se espera un resultado positivo para HI, observado por la presencia de

un botón de eritrocitos a fondo de la placa el cual cae al inclinar la placa a un ángulo de 60 ° (Figura 12 A).

4) Control negativo para H5N3. Control seropositivo subtipo pH1N1. Contiene anticuerpos PH1N1, antígeno y eritrocitos. Se espera un resultado negativo para HI por la ausencia de anticuerpos específicos para el virus H5N3, evidenciado por la ausencia de un botón de eritrocitos o la presencia de un botón que no cae al inclinar la placa (Figura 12 B).

Para el control de células se agregaron 50 µL de PBS 0.01 M pH 7.4 en el pozo correspondiente. La última fila se utilizó para el control de suero en donde no se agregó el antígeno. Esta fila de control de suero se utiliza para verificar la ausencia de aglutininas inespecíficas en cada muestra. Para la titulación en reversa se agregaron 100 µL del antígeno en el pozo y se realizó una dilución seriada en la columna correspondiente a este control. Para los controles seropositivo y negativo, se agregaron 50 µL de cada control en cada pozo correspondiente y se realizó una dilución seriada a lo largo de la columna de cada control (1:10 hasta 1:640). Se agregaron 25 µL de cada control seropositivo y negativo en los pozos de la última fila para tener un control del suero (OMS, 2002; Erickson *et al.*, 2005). En la Figura 11 se puede observar la distribución de la placa para el ensayo HI.

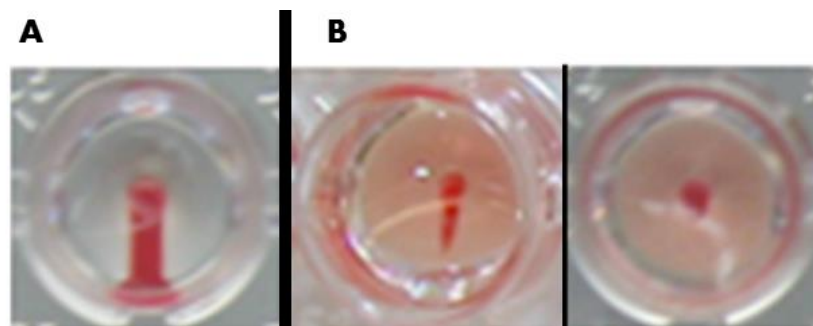
Figura 11. Distribución de placa control para el ensayo HI. En donde, las columnas de 1:10 a 1:640 corresponden a las diluciones seriadas de los sueros. En el control de células no hay diluciones seriadas y se agrega PBS a cada pozo para evaluar los eritrocitos.

	Control de células (CC)		Titulación reversa (BT)		Control Negativo (C-)		Control positivo (C+)		9	10	11	12
	1	2	3	4	5	6	7	8				
<b>A</b>	PBS	PBS	1:128	1:128	1:640	1:640	1:640	1:640				
<b>B</b>	PBS	PBS	1:64	1:64	1:320	1:320	1:320	1:320				
<b>C</b>	PBS	PBS	1:32	1:32	1:160	1:160	1:160	1:160				
<b>D</b>	PBS	PBS	1:16	1:16	1:80	1:80	1:80	1:80				
<b>E</b>	PBS	PBS	1:8	1:8	1:40	1:40	1:40	1:40				
<b>F</b>	PBS	PBS	1:4	1:4	1:20	1:20	1:20	1:20				
<b>G</b>	PBS	PBS	1:2	1:2	1:10	1:10	1:10	1:10				
<b>H</b>	PBS	PBS	PBS		Suero control para C- (SC)		Suero control para C+ (SC)					

Luego, se agregaron 25  $\mu$ L del antígeno a 4 HA/25  $\mu$ L a cada pozo de las columnas del control positivo para H5N3 y control negativo para H5N3 a excepción de los pozos de la fila de control de suero. Se incubó la placa por 30 minutos a temperatura ambiente. Después se agregó 50  $\mu$ L de la solución RBC 0.75% en todos los pozos utilizados de la plaza y se incubó la placa para permitir la sedimentación de los eritrocitos en caso de que ocurriera la inhibición de la hemaglutinación.

Se compararon dos procedimientos distintos de incubación luego de agregar la solución RBC 0.75%. Los dos procedimientos que se compararon fueron los siguientes: (1) Incubación a temperatura ambiente por 30 minutos y (2) Incubación a 4 °C por 1 hora. Luego de la incubación, se inclinó la placa a un ángulo de 60° para observar los resultados de cada control (OMS, 2002; Erickson *et al.*, 2005).

Figura 12. Criterio para interpretar resultados de placa de ensayo de HI. (A) Resultado esperado para control de células y control positivo para H5N3, en donde ocurre inhibición de la hemaglutinación en el caso del control positivo. (B) Resultado esperado para titulación en reversa y control negativo para H5N3, en donde ocurre la hemaglutinación de los eritrocitos debido por la ausencia de anticuerpos específicos contra el virus.



(Noah *et al.*, 2009).

Como resultado para el control de células se observó en cada pozo la presencia de botón al fondo de la placa que al ser inclinado cae, de esta forma se observa la presencia de una gota gruesa en el pozo (Figura 12 A). Para el control de titulación en reversa se espera que ocurra hemaglutinación en los pozos de las diluciones más alta hasta la dilución de 8 HA/50 $\mu$ L (4 HA/25 $\mu$ L) evidenciado por la ausencia de una gota gruesa al inclinar la placa (Figura 12 B) (Noah *et al.*, 2009).

Para el control positivo para H5N3, se esperaba que ocurriera la inhibición de la hemaglutinación por la presencia de anticuerpos, lo cual se observó en la placa por la presencia de una gota gruesa en el pozo de las diluciones que tuvieron la suficiente cantidad de anticuerpos para unirse al virus (Figura 12 A). Por último, para el control negativo para H5N3 (control seropositivo para pH1N1) se esperaba observar en todos los

pozos la ausencia de una gota gruesa ya que esta muestra no contenía anticuerpos específicos que pudieran unirse al virus, por lo que ocurrió la aglutinación del virus con los eritrocitos (Figura 12 B) (Noah *et al.*, 2009).

b. Placa con muestras:

Como primer punto se deben eliminar las aglutininas inespecíficas presentes en la muestra por medio de un pre-tratamiento (Sección A, 3). Luego de realizar la placa control se prosiguió a realizar la placa con muestras.

Figura 13. Distribución de placa para ensayo HI de cinco muestras. En donde, las columnas de 1:10 a 1:640 corresponden a las diluciones seriadas de los sueros. En el control de células no hay diluciones seriadas y se agrega PBS a cada pozo para evaluar los eritrocitos. SC es el control de suero por muestra para confirmar la ausencia de aglutininas inespecíficas al momento de realizar el ensayo HI, en este suero control no se agrega antígeno ya que su objetivo es evaluar el suero.

	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5		Control de Células (CC)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	PBS	PBS
<b>B</b>	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	PBS	PBS
<b>C</b>	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	PBS	PBS
<b>D</b>	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	PBS	PBS
<b>E</b>	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	PBS	PBS
<b>F</b>	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	PBS	PBS
<b>G</b>	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	PBS	PBS
<b>H</b>	Suero control para muestra 1 (SC)		Suero control para muestra 2 (SC)		Suero control para muestra 3 (SC)		Suero control para muestra 4 (SC)		Suero control para muestra 5 (SC)		PBS	PBS

En una placa se trabajaron 5 muestras y se dejaron las últimas dos columnas para el control de células (Figura 13). Se utilizaron dos columnas de la placa para cada muestra (duplicado). Las muestras se trabajan de igual forma que el procedimiento descrito para los controles positivos y negativos en el inciso anterior de placa control. Para interpretar los resultados se utilizan los mismos criterios para evaluar los controles positivo y negativo para H5N3, dependiendo del resultado obtenido de cada muestra (Figura 12) (OMS, 2002; Erickson *et al.*, 2005; Noah *et al.*, 2009).

5. Calificación del ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación (HI). Para calificar el ensayo HI para la detección de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar se tomaron en cuenta los parámetros de precisión, linealidad y especificidad (Noah *et al.*, 2009), descritos a continuación.

a. Precisión. El ensayo de precisión determinó la variabilidad y reproducibilidad del ensayo HA. Para ello se evaluó la placa control, la cual incluyó los siguientes controles (Descripción de control en sección A, iv, a):

1) Titulación reversa (BT – *Back Titration*) del virus A/blue-winged teal/Guatemala/CIP049-09/2010(H5N3).

2) Control positivo para H5N3.

3) Control negativo para H5N3.

Se siguió el procedimiento descrito anteriormente para realizar la placa y el ensayo se realizó en nueve días diferentes con el fin de comparar los resultados obtenidos. Se consideró que el ensayo era preciso si el título individual obtenido para cada control no variaba más de 1 dilución en cada uno de los días evaluados (Noah *et al.*, 2009).

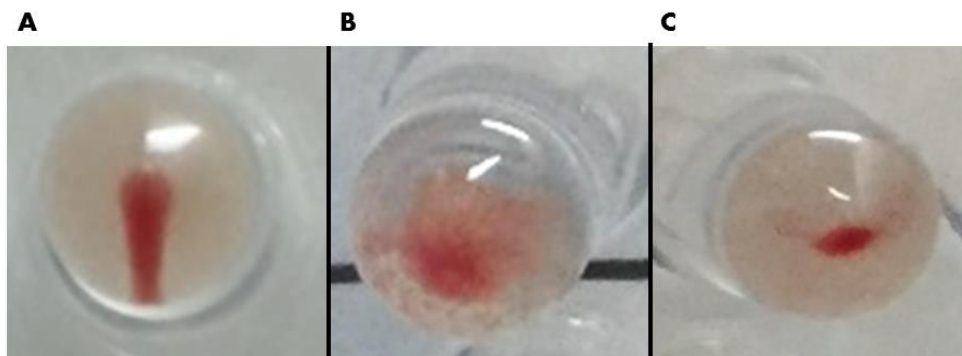
b. Linealidad. Una vez establecido que el ensayo es preciso, se conoció el título del control positivo para H5N3 (Anticuerpo monoclonal recombinante reactivo a los subtipos H5NA de influenza A. Proporcionado por el MAGA). Para determinar si el ensayo cumplía con la linealidad se realizaron diluciones (1:40, 1:30, 1:20, 1:16, 1:10 y 1:5) del control positivo para H5N3 a un título determinado y se hizo un ensayo HI en duplicado de estas diluciones. Se realizó una regresión lineal y se determinó la correlación entre el título esperado y el título obtenido de cada dilución del control positivo. De esta forma también se determinó el rango de detección en el ensayo HI para detectar anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar (Noah *et al.*, 2009).

d. Especificidad. Para determinar si el ensayo HI era específico para determinar anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar utilizando el virus A/blue-winged teal/Guatemala/CIP049-09/2010(H5N3), se realizó el ensayo con controles seropositivos para otra cepa de virus de influenza relacionada con el subtipo H5 (suero seropositivo para H5N2) y para otra cepa de virus de influenza no cercana al subtipo H5, pero que sí fuera de un virus de influenza A (suero seropositivo para pH1N1). A continuación se describen los controles utilizados para el ensayo de especificidad:

1) Muestra clínica de gallina proporcionada por el MAGA, la cual fue seropositiva para el subtipo H5N2 por medio del ensayo HI realizado en el MAGA. Se esperaba un resultado negativo (Figura 14 C) o inespecífico (Figura 14 B) para el ensayo HI del subtipo H5N3 (ausencia de botón). Un resultado inespecífico ocurre cuando el ensayo HI puede detectar anticuerpos presentes en la muestra, pero estos no son específicos para la cepa del virus que se está utilizando. Esto se evidencia en la placa por la formación de un botón difuso en los pozos de las diluciones de la muestra (Spackman, 2008).

2) Control seropositivo para el subtipo H1N1. Se esperaba un resultado negativo para el ensayo de HI del subtipo H5N3 (ausencia de botón) (Figura 14 C).

Figura 14. Criterio de resultados para evaluación de especificidad del ensayo HI subtipo H5N3. En la imagen (A) se observa un ejemplo de resultado positivo específico para el subtipo H5N3. En la imagen (B) se observa un resultado inespecífico para el ensayo HI subtipo H5N3, ya que a pesar de que el ensayo detecta anticuerpos estos no son específicos para la cepa de virus utilizada (H5N3). En la imagen (C) se muestra un ejemplo de un resultado negativo para el subtipo H5N3.



B. Determinación de la prevalencia de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar en patos domésticos de la costa sur de Guatemala (2013 – 2014):

1. Sitios de estudio. El estudio de vigilancia del virus de influenza aviar fue realizado en dos comunidades locales en humedales de la costa del Pacífico ubicados en el departamento de Santa Rosa, Guatemala. Estos sitios fueron las aldeas de La Candelaria y Monterrico (Figura 15). En las Figuras 16 – 18 se muestra el traslape de los hábitats de los diferentes hospederos de influenza (cerdos, patos e incluso humanos) de los sitios de muestreo.

Figura 15. Sitios muestreados en La Candelaria y Monterrico de Santa Rosa, Guatemala.



(Proyecto Interfaz-Animal, CES-UVG).

Figura 16. Canal ubicado en sitio de muestreo de patos domésticos de la costa sur de Guatemala.



(Foto tomada por personal CES-UVG)

Figura 17. Canal ubicado en sitio de muestreo de patos domésticos de la costa sur de Guatemala.



(Foto tomada por personal CES-UVG)

Figura 18. Canal ubicado en sitio de muestreo de la costa sur de Guatemala, al cual los patos domésticos tenían acceso.



(Foto tomada por personal CES-UVG)

2. Obtención de muestras de sangre de patos domésticos. En total, se colectaron 1174 muestras de sangre de patos domésticos en 63 casas particulares de Monterrico y Candelaria, Guatemala, durante los meses de noviembre de 2013 a diciembre de 2014 por parte del equipo entrenado del Centro de Estudio en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala (CES-UVG). Se recolectó aproximadamente 1 mL de sangre. El suero se separó por centrifugación a 1000 – 2000 xg por 10 minutos, se tomó con una pipeta y se colocó en un tubo plástico previamente rotulado. Posteriormente, se colocó en hielo seco

y se transportó al CES-UVG hasta su procesamiento por ELISA para la detección de anticuerpos contra el virus de influenza A.

Para la detección de anticuerpos contra el virus de influenza aviar de las 1174 muestras recolectadas de sangre de patos domésticos, se realizó la prueba de ELISA por medio del kit comercial *Type A Influenza Multispecies Antibody TestKit (AI-Multi)* de Biocheck de acuerdo a las especificaciones del fabricante. De acuerdo a esta prueba, se obtuvieron 98 muestras positivas. Tanto la colecta de las muestras como el procesamiento por ELISA fueron realizados por el personal del CES-UVG.

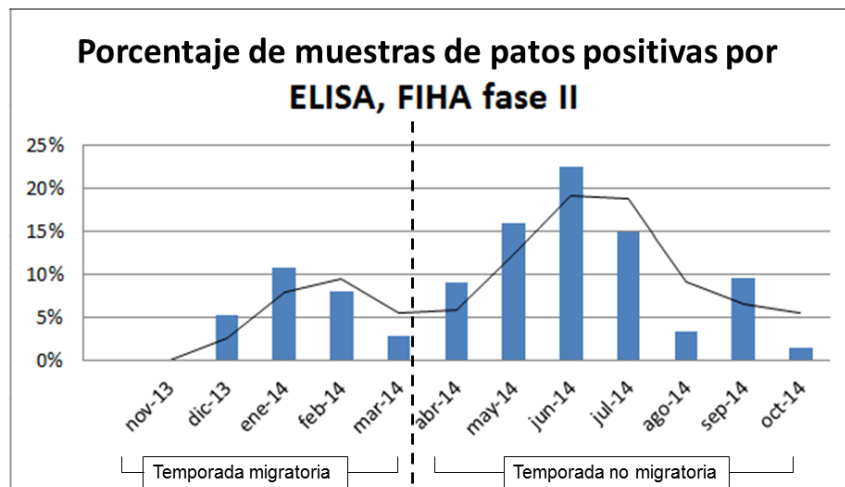
En la Figura 19 se observa la distribución de las 63 casas seleccionadas de Monterrico y La Candelaria, Guatemala, de donde se obtuvieron las 1174 muestras de sangre de patos domésticos (Círculos blancos), además se muestran las 30 casas del total de 63 casas seleccionadas, donde se obtuvieron los 98 resultados seropositivos para influenza A por ELISA (Círculos rojos). Por otro lado, en la Figura 20 se muestra el resultado preliminar obtenido de las 98 muestras seropositivas para Influenza A por ELISA.

Figura 19. Distribución de casas seleccionadas para la toma de muestra de sangre de patos domésticos y casas seropositivas para influenza A de Monterrico y La Candelaria, Guatemala, durante los meses de noviembre de 2013 – octubre de 2014.



(Proyecto Interfaz Humano-Animal, CES-UVG).

Figura 20. Resultados preliminares de las 98 muestras seropositivas para influenza A obtenidos por ELISA de las 1174 muestras colectadas de sangre de patos domésticos de la costa sur de Guatemala (2013 – 2014)



(Proyecto Interfaz Humano-Animal, CES-UVG).

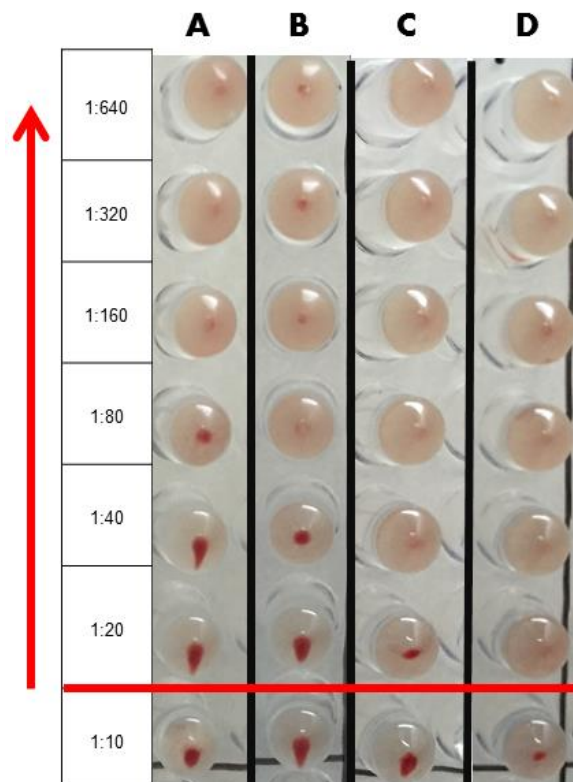
3. Ensayo HI para la detección de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar de muestras de suero de patos domésticos. Se realizó el ensayo HI a las 98 muestras con resultado positivo del ELISA para detección de anticuerpos contra el virus de influenza A, pertenecientes al muestreo de patos domésticos realizado en casas particulares de Monterrico y Candelaria, Guatemala, durante los meses de noviembre de 2013 a diciembre de 2014. Antes de realizar el ensayo HI se trataron las muestras con RDE y RBC como se ha descrito anteriormente en la sección (VI, F) y el procedimiento para las muestras se describe en la sección (VI, G, i, b).

4. Criterio resultado positivo para muestras. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Oficina Epizootias Internacionales (OIE, por sus siglas inglés: Office International des Epizooties) establecieron un estándar seropositivo para la prueba de HI. Se considera un resultado positivo un valor de título de anticuerpo  $\geq 16$  u/ $\mu$ L (Wang *et al.*, 2014). Debido a que la dilución 1:16 (título 16 u/ $\mu$ L) se encuentra entre las diluciones 1:10 y 1:20 que se realizan en la placa, se consideró un resultado positivo un valor de título de anticuerpos  $\geq 20$  u/ $\mu$ L. En la Figura 21 se puede observar en la distribución de la placa para el ensayo HI a partir de qué dilución se considera un resultado positivo. En la Figura 22 se muestra cómo debe observarse un resultado para ser considerado positivo a partir de la dilución 1:20 y un resultado negativo. Por cada corrida se incluyó un placa control como se detalló anteriormente.

Figura 21: Distribución de placa para ensayo HI con muestras donde se indica la dilución a la cual un resultado positivo ya es considerado como válido según OIE.

	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5		Control de Células (CC)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640
<b>B</b>	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320
<b>C</b>	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
<b>D</b>	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
<b>E</b>	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40
<b>F</b>	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20
<b>G</b>	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10
<b>H</b>	Suero control para muestra 1 (SC)		Suero control para muestra 2 (SC)		Suero control para muestra 3 (SC)		Suero control para muestra 4 (SC)		Suero control para muestra 5 (SC)		Control de Células (CC)	

Figura 22. Criterio para considerar un resultado positivo como válido o negativo.



En la Figura 22, imagen (A) se puede observar que el resultado es positivo válido ya que el botón cae al inclinar la placa a un ángulo de 60° y esto ocurre en una dilución más

alta que la dilución 1:20, indicando que el título es 40 u/μL. En la imagen (B) se muestra otro ejemplo de un resultado positivo válido ya que el botón cae en la dilución 1:20 (título 20 u/μL) al inclinar la placa. En la imagen (C) se observa un ejemplo de un resultado negativo, ya que a pesar de que el botón cae al inclinar la placa solo ocurre en la dilución más baja (1:10) la cual está por debajo de la dilución 1:20 donde se considera como positivo. Por último en la imagen (D) se muestra un caso en que la muestra es negativa ya que no hay formación de botón que pueda caer al inclinar la placa en ninguna de las diluciones, indicando que no hay anticuerpos en el suero analizado que se unan al virus y así inhibir la hemaglutinación.

5. Análisis de datos. Debido a que el tamaño de muestra disponible no es representativo a la población de estudio, se realizó el análisis estadístico no paramétrica Chi-Cuadrado, para determinar si hay variación en el título de anticuerpos contra el subtipo H5 durante los meses de muestreo. La prueba de Chi-cuadrado es utilizada para muestras pequeñas o para datos que no siguen una distribución normal (McDonald, 2014).

La variable de tiempo está dividida por temporadas (Cuadro 1). La temporada migratoria de aves acuáticas está definida por los meses de octubre a marzo, mientras que los meses de abril a septiembre constituyen la temporada no migratoria (Escobar, 2012). Se realizó una comparación entre la temporada migratoria y temporada no migratoria del título de anticuerpos contra el subtipo H5 del virus de influenza aviar. Se tomarán los meses de octubre de 2013 a marzo de 2014 como la temporada migratoria y los meses de abril de 2014 a octubre de 2014 como la temporada no migratoria.

Cuadro 1. Descripción de variables.

<b>Variable</b>	<b>Unidad de muestra</b>	<b>Instrumento</b>	<b>Dimensión</b>	<b>Prueba estadística</b>
Respuesta antigénica a H5N3 (dependiente)	Pato seropositivo para influenza A.	Prueba HI	U/ $\mu$ L	Chi-cuadrado
Tiempo (independiente)	Temporada: 1. Migratoria: (Octubre 2013 – marzo 2014). 2. No migratoria: (Abril 2014 – octubre 2014).	Calendario	Temporada (meses)	

## VII. RESULTADOS

A. Implementación de la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación HI para la detección de anticuerpos contra el subtipo H5 del virus de influenza aviar.

1. Evaluación del tratamiento de muestras para la eliminación de aglutininas inespecíficas presentes en suero.

Cuadro 2. Evaluación de la presencia de aglutininas inespecíficas con tres diferentes tratamientos para las muestras de suero.

Dilución de suero	Tratamiento		
	RDE	RBC	1° RDE 2° RBC
1:640	Sin aglutininas inespecíficas	Sin aglutininas inespecíficas	Sin aglutininas inespecíficas
1:320			
1:160			
1:80			
1:40			
1:20			
1:10	Aglutininas inespecíficas	Aglutininas inespecíficas	
CS			

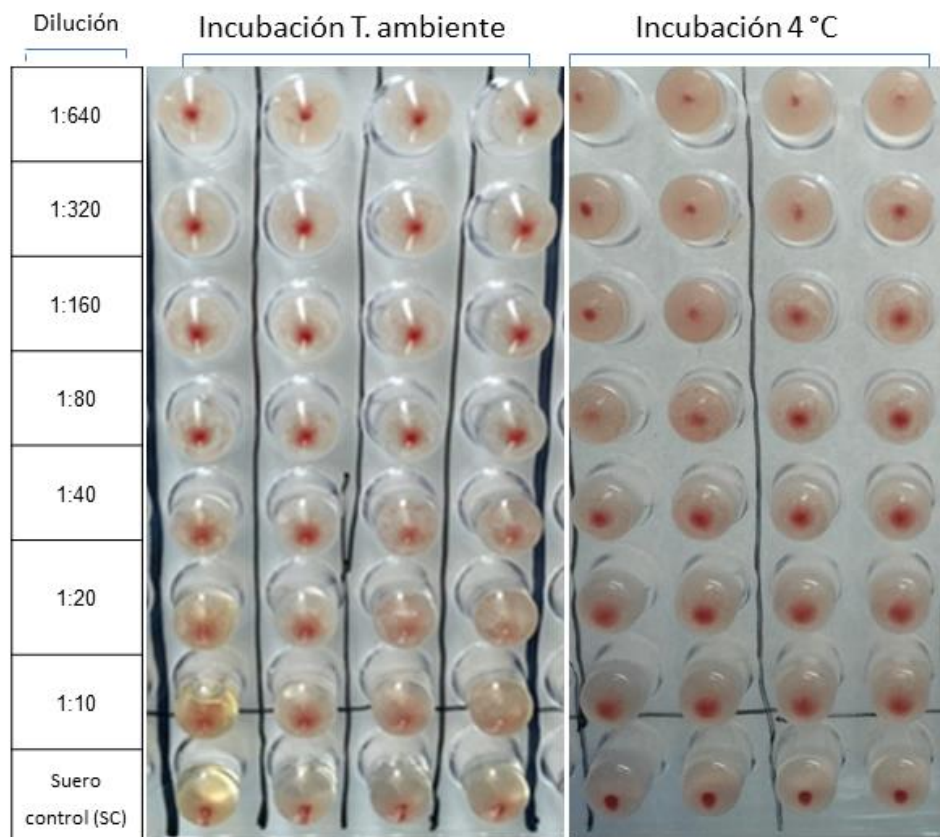
En donde CS corresponde al suero control en donde se agregó el suero sin el virus.

En el Cuadro 2 se muestra que en los tratamientos individuales con RDE y RBC se observó la presencia de aglutininas inespecíficas hasta la dilución 1:10 al realizar el ensayo HI del control positivo para H5N3 y cuatro muestras de suero recolectadas

seleccionadas al azar. Únicamente el tratamiento combinado con RDE seguido de RBC logró eliminar las aglutininas inespecíficas de los sueros.

2. Evaluación de condiciones de trabajo del ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación.

Figura 23. Ejemplo de resultado del ensayo HI para cuatro muestras de suero de patos seleccionadas al azar, comparando entre incubación a temperatura ambiente por 30 minutos e incubación a 4 °C por una hora.



Luego de establecer el tratamiento más eficaz para eliminar las aglutininas inespecíficas presentes en los sueros, se compararon dos condiciones de incubación distintas reportadas para realizar el ensayo HI. En la Figura 23 se puede observar que en la incubación a 4 °C el botón formado en cada pozo es más compacto a diferencia de la incubación a temperatura ambiente, donde se forma un botón difuso en cada pozo de las diluciones más bajas de las muestras.

### 3. Calificación del ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación (HI):

#### a. Precisión.

Figura 24. Título de control positivo para H5N3 y negativo obtenido por medio del ensayo HI realizado en diez días diferentes. Para el control positivo, los límites de detección para considerarse un ensayo preciso son 40 U/μL (límite mínimo) y 160 U/μL (límite máximo).

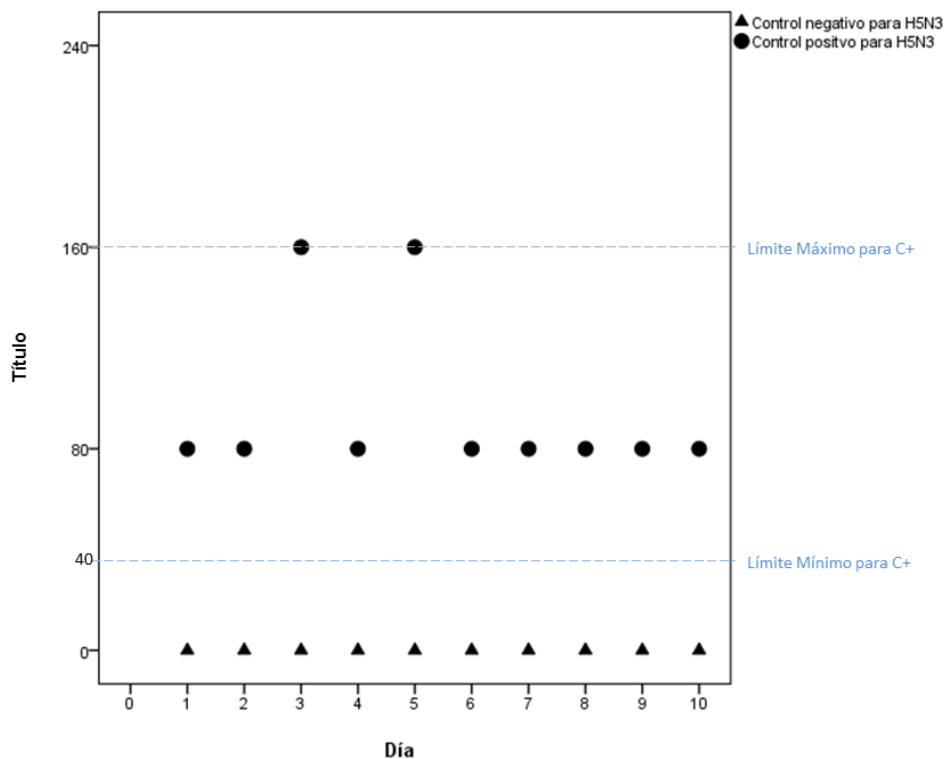
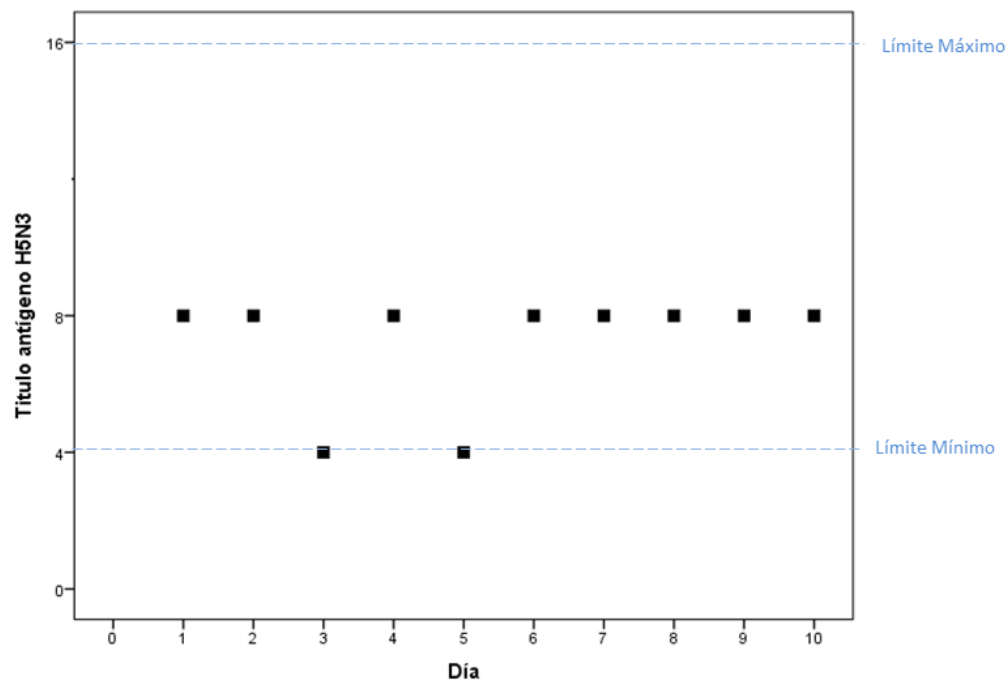


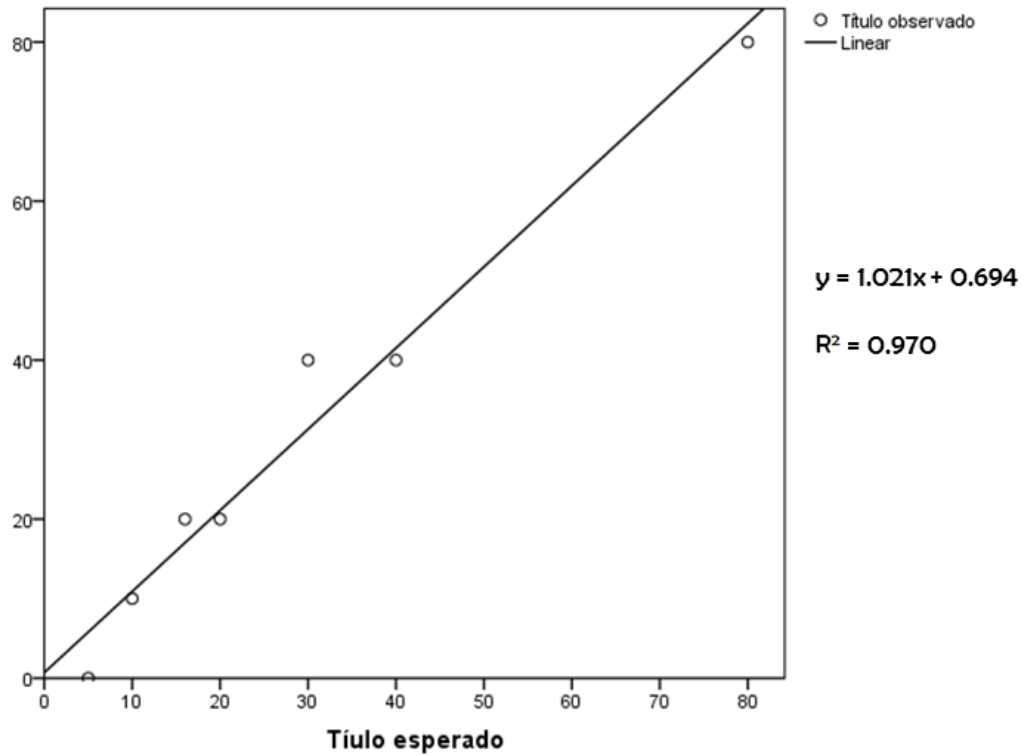
Figura 25. Titulación reversa de dilución de antígeno A/blue-winged teal/Guatemala/CIP049-09/2010(H5N3) para corroborar título de 8 uHA/ 50  $\mu$ L, durante 10 días diferentes. Para la titulación reversa, los límites de detección para considerarse un ensayo preciso son 4 U/50  $\mu$ L (límite mínimo) y 16 U/50 $\mu$ L (límite máximo).



En la Figura 24 se evalúa la precisión del ensayo HI utilizando el control positivo para H5N3 y control negativo para H5N3. Por otro lado en la Figura 25 muestra la precisión del ensayo HI en cuanto al control de la titulación en reversa para corroborar las 8 HA/50  $\mu$ L del virus. El título del control positivo y del BT no varió en más de una unidad de dilución en los 10 días analizados. Mientras que en el título del control negativo no se observaron cambios en los diferentes días ya que mantenía un título menor a 10 u/ $\mu$ L.

## b. Linealidad.

Figura 26. Comparación del título obtenido y título esperado de siete diluciones del control positivo para H5N3 para evaluar la linealidad del ensayo HI.



En la Figura 26 se compara el título observado con el título esperado de cada dilución realizada del control positivo para H5N3. Se puede observar que para las diluciones del control seropositivo que coinciden con la dilución seriada del ensayo HI (Figura 13): 1:10, 1:20; 1:40 y 1:80 se obtuvo un título de 0, 10, 20, 40 y 80 u/μL respectivamente, Por otro lado, para las diluciones intermedias 1:5, 1:16 y 1:30 del control positivo se obtuvo un

título de <10, 20 y 40 u/μL, respectivamente. Al comparar los datos del título obtenido con el título esperado se obtuvo un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.970.

c. Especificidad. Se evaluó la especificidad del ensayo HI con una muestra clínica de gallina seropositiva para el subtipo H5N2 y otra muestra de cerdo seropositiva para pH1N1. Al realizar el ensayo HI para detectar anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar de esta muestra, se obtuvo un resultado inespecífico evidenciado por la formación de un botón difuso hasta la dilución 1:20 (Apéndice II, Figura 30 A). Para el control seropositivo para pH1N1 se obtuvo un resultado negativo para el subtipo H5N3 por medio del ensayo HI (Apéndice II, Figura 30 B).

B. Muestras procesadas para la determinación de prevalencia de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar en patos domésticos de la costa sur de Guatemala (2013 – 2014).

Se realizó el ensayo HI para la detección de anticuerpos contra el subtipo H5N3 a las 98 muestras con resultado positivo para ELISA para detección de anticuerpos contra el virus de influenza. De estas 98 muestras, solamente una muestra fue positiva para el ensayo HI, obteniendo un título de 20 u/μL (Apéndice II, Figura 32). De las 97 muestras restantes, 67 obtuvieron un resultado inespecífico para el ensayo y 30 fueron negativas. Estas 97 muestras fueron consideradas como un resultado negativo para el subtipo H5N3 (A/blue-winged teal/Guatemala/CIP049-09/2010(H5N3)).

En el Cuadro 3 se muestra la tabla de contingencia realizada sobre la respuesta antigénica al virus H5N3 a partir del resultado obtenido del ensayo HI subtipo H5N3 a partir de las 98 muestras seropositivas para influenza A por ELISA. La muestra seropositiva para el subtipo H5N3 representa el 1.02% de la población de patos seropositivos para influenza A y el 3.85% de la población de patos seropositivos para Influenza A identificados durante la temporada migratoria. Al realizar la prueba de Chi-cuadrado se obtuvo que: debido a que el valor-p de 0.094 (Cuadro 4) es mayor al valor alfa de 0.05 no se rechaza la hipótesis nula indicando que no hay suficiente evidencia estadística para establecer que el título de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar es mayor en la temporada migratoria a comparación de la temporada no migratoria.

Cuadro 3. Respuesta antigénica al virus H5N3 (A/blue-winged teal/Guatemala/CIP049-09/2010(H5N3)) detectado por el ensayo HI en patos domésticos de la costa sur (2013-2014).

Temporada	Respuesta antigénica a H5N3		
	Positivos (%)	Negativos (%)	Total (%)
Migratoria (oct-mar)	1/26 (3.85)	25/26 (96.15)	26/98 (26.53)
No migratoria (abr-oct)	0/72 (0)	72/72 (100)	72/98 (73.47)
<b>Total</b>	<b>1/98 (1.02)</b>	<b>97/98 (98.98)</b>	<b>98/98 (100%)</b>

Cuadro 4. Análisis de Chi-cuadrado a partir de la relación entre temporadas (migratoria y no migratoria) y la respuesta antigénica a H5N3 de patos seropositivos para influenza A.

	<b>Valor</b>	<b>Grados de libertad (gl)</b>	<b>Valor-p</b>
<b>Chi-cuadrado de Pearson</b>	2.798	1	0.094
<b>N de casos válidos</b>	98		

## VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

A. Implementación de la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) para la detección de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar.

Con el objetivo de implementar la prueba HI para detectar anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar, se evaluó la eficiencia de diferentes tratamientos y condiciones que se han reportado para realizar el ensayo HI. En primer lugar se evaluaron diferentes pre-tratamientos de suero para la eliminación de aglutininas inespecíficas. Como segundo punto, se evaluaron dos diferentes condiciones de la incubación final dentro del procedimiento del ensayo HI.

1. Evaluación del tratamiento de muestras para eliminar aglutininas inespecíficas presentes en suero. El suero de varias especies de aves puede contener inhibidores como aglutininas inespecíficas que intervienen en el ensayo HI. Para ello se evaluó el uso de dos tratamientos comúnmente utilizado para eliminar las aglutininas inespecíficas, el tratamiento con RDE y RBC (Spackman, 2008, OMS, 2002). Se ha reportado que el uso individual de RDE para eliminar inhibidores del suero ha sido efectivo como pre-tratamiento de los sueros de muestras clínicas y de sueros de referencia utilizados como control (Noah *et al.*, 2009). Sin embargo, con el uso del tratamiento con RDE no se logró eliminar por completo las aglutininas inespecíficas encontradas en el suero de los controles del ensayo HI (Control positivo y negativo para H5N3) y en cuatro muestras seleccionadas al azar de los sueros colectados de patos domésticos. De igual forma se

probó el tratamiento individual con RBC, el cual tampoco fue efectivo para eliminar las aglutininas inespecíficas.

Por último se evaluó el tratamiento combinado con RDE y RBC. Al realizar la placa donde se evaluaron los controles (positivo y negativo para H5N3) donde se evaluó el tratamiento combinado, se observó que el suero tratado con RDE seguido de RBC ya no contenía aglutininas inespecíficas (Apéndice II, Figura 27). Seguido de esta placa se realizó el ensayo HI utilizando el virus, donde de igual forma no se observaron aglutininas inespecíficas en la placa Con los controles (Anexos II, Figura 28). Este mismo resultado se obtuvo con las cuatro muestras seleccionadas al azar de los sueros colectados de patos domésticos. La eficiencia del tratamiento combinado se puede deber a que es necesario un primer tratamiento para eliminar aglutininas inespecíficas, seguido de un segundo tratamiento para remover los inhibidores que no pudo eliminar el primer tratamiento.

2. Evaluación de condiciones de trabajo del ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación. A realizar el ensayo HI de cuatro muestras de suero de patos seleccionadas al azar, se comprobó la ausencia de aglutininas inespecíficas al observar el resultado obtenido del control de suero que se incluye en la placa para cada muestra,

Sin embargo el resultado del ensayo HI para estas muestras era dudoso debido a la formación de un botón difuso al fondo de los pozos de las diluciones más bajas (Figura 23). Este botón difuso era similar al observado en los sueros que contenían aglutininas inespecíficas, sin embargo ya se había comprobado la ausencia de estos inhibidores en el

control de suero. Los ensayos HI descritos en este párrafo fueron realizados con una incubación final de 30 minutos a temperatura ambiente (OMS, 2013; Spackman, 2008).

Spackman (2008) indica que en algunos casos el virus utilizado para el ensayo HI puede tener una alta actividad de neuraminidasa, permitiendo la liberación del virus de los eritrocitos ya que la neuraminidasa rompe el enlace de ácido sálico de la célula y las glicoproteínas del virus (Matrosovich *et al.*, 2004). Esto podría explicar la aparición de un botón incompleto en los resultados del ensayo HI. Para evitar esto, se cambió las condiciones de la última incubación del ensayo HI a 4 °C por una hora, con el fin de reducir la actividad enzimática de la neuraminidasa según Spackman (2008).

En la placa control del ensayo HI utilizando las nuevas condiciones de incubación (4°C por una hora), se obtuvo los mismos resultados que la placa control con incubación a temperatura ambiente por 30 minutos (Apéndice II, Figura 29), indicando que esta modificación no afecta en la habilidad del virus de unirse a los eritrocitos.

En cuanto a las muestras de los sueros de patos domésticos, al comparar los resultados obtenidos con ambas condiciones de incubación (Figura 23) se puede observar que se obtiene un resultado más claro con la incubación final a 4 °C por 1 hora, ya que el botón formado se observa más compacto a diferencia de la incubación a media hora en donde se observa que en las diluciones más bajas el botón es formado parcialmente o se observa un margen borroso alrededor. Sin embargo el resultado obtenido con la incubación a 4 °C aún no fue completamente claro, lo cual se debe a un resultado inespecífico ya que el ensayo HI es muy específico a un mismo subtipo de Hemaglutinina. Para el subtipo H5 existen varias cepas que difieren en uno o varios epítomos (Petric, Comanor & Petti, 2006; Spackman, 2008).

### 3. Calificación del ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación (HI).

a. Precisión. El primer día que se tomó en cuenta para evaluar la precisión del ensayo HI, fue cuando se obtuvo por primera vez la concentración esperada del antígeno H5N3 al realizar la titulación en reversa. Los días anteriores a este en donde se realizó el ensayo HI, no fueron tomados en cuenta ya que fueron considerados como pruebas para adquirir las competencias necesarias para realizar del ensayo correctamente.

En las Figuras 24 y 25 se puede observar que al comparar el título obtenido en los diferentes días este no varía en más de una unidad de dilución para el control positivo para H5N3 y para la titulación en reversa del antígeno. Solo en dos de los 10 días se observó un cambio en la dilución y fue entre los primeros cinco días que se realizó el ensayo.

Es importante mencionar que la variación obtenida en el título del control positivo para H5N3 es consecuencia de la variación en el título del antígeno evaluado en el BT. Esto se debe a que la dilución del antígeno no fue adecuada para obtener las 8 u HA/ 50 $\mu$ L, y al tener una concentración menor de antígeno (4 U HA/50  $\mu$ L) el título del control positivo iba a aumentar en una dilución. En la dilución más alta de 1:160 del control positivo para H5N3, la cantidad del antígeno era menor a la cantidad de anticuerpos, permitiendo la unión de los anticuerpos al antígeno y así evitando la hemaglutinación de los eritrocitos.

b. Linealidad. El coeficiente de determinación obtenido de 0.970 indica

que existe una correlación lineal entre el título esperado y el título obtenido de las diluciones del control positivo para H5N3, por medio del ensayo HI. Por lo tanto, el ensayo HI para detectar anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar demostró ser lineal ya el título obtenido fue directamente proporcional a la cantidad de analito (título de anticuerpos) que se esperaba.

Por medio del ensayo de linealidad, se estableció la cantidad mínima de analito que puede ser detectada. La dilución más baja que aún pudo ser detectada por el ensayo fue 1:10, sin embargo un título de 10 U/ $\mu$ L no es considerado como un resultado seropositivo válido según la OMS y OIE. El título 16 U/ $\mu$ L (criterio de título seropositivo aceptado por la OMS y OIE) se demostró que puede ser detectado en la dilución 1:20 de este ensayo.

c. Especificad. El ensayo HI realizado demostró ser específico para detectar anticuerpos contra el virus A/blue-winged teal/Guatemala/CIP049-09/2010(H5N3) utilizado, ya que al realizar el ensayo HI para una muestra clínica seropositiva para H5N2 con este virus no se obtuvo un resultado positivo. El resultado obtenido fue inespecífico, evidenciado por la formación de un botón difuso (Spackman, 2008). Aunque la muestra clínica tuviera anticuerpos contra un virus de subtipo H5, este virus no era de la misma cepa que el virus H5N3 utilizado para realizar la prueba.

Las variaciones entre cepas del mismo subtipo de virus, se deben a variaciones en las regiones de reconocimiento antigénico de la Hemaglutinina (Spackman, 2008). Por otro lado, para el control seropositivo pH1N1 se obtuvo un resultado negativo para el subtipo H5N3 por medio del ensayo HI. Con este resultado se muestra que el ensayo HI es de

alta especificidad para la cepa de virus H5N3 utilizada, ya que otras muestras seropositivas para una cepa diferentes del subtipo H5 obtienen un resultado dudoso, reportado como inespecífico. Además, para muestras seropositivas de otro subtipo de hemaglutinina se obtiene un claro resultado negativo.

B. Muestras procesadas para la determinación de prevalencia de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar en patos domésticos de la costa sur de Guatemala (2013 – 2014).

Con el objetivo de determinar la prevalencia de anticuerpos contra el subtipo H5N3, se realizó el ensayo HI a las 98 muestras de patos seropositivas para influenza A por ELISA. Estas muestras seropositivas para influenza A procedían del muestreo total de 1174 patos domésticos, durante los meses de octubre 2013 a octubre 2014. Se observó que en los meses de diciembre a febrero (temporada migratoria) y de mayo a julio (temporada no migratoria) fue donde se encontraron la mayor cantidad de muestras seropositivas para influenza A (Figura 20). Al comparar los resultados de muestras seropositivas en estos dos rangos de meses, se observó que en la temporada no migratoria había más muestras seropositivas para influenza A que durante la temporada migratoria.

Para comprobar el contacto de aves migratorias infectadas por un virus de influenza con aves domésticas, se esperaba encontrar durante la temporada migratoria una mayor respuesta antigénica (más muestras seropositivas) contra los virus que se han identificado en las aves migratorias de la costa de Guatemala. En estudios previos, el virus de influenza H5N3 (A/blue-winged teal/Guatemala/CIP049-09/2010(H5N3)), ha sido

identificado en aves migratorias de la costa de Guatemala, por lo que las muestras seropositivas para influenza A identificadas durante la temporada migratoria podrían contener anticuerpos contra este subtipo H5N3 (González-Reiche, 2012).

A partir de los resultados de ELISA de las 98 muestras seropositivas de un total de 1074 patos muestreados, se esperaba encontrar más muestras seropositivas para un virus proveniente de aves migratorias durante la temporada migratoria, en lugar de la temporada no migratoria, como se observó en los resultados de ELISA (Figura 20), a excepción de que en la temporada no migratoria existiera otra fuente de influenza aviar del subtipo H5N3 además de las aves migratorias. Sin embargo de estas 98 muestras seropositivas para influenza A, únicamente una muestra fue seropositiva para el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar identificado en aves migratorias.

El muestreo no se realizó como un seguimiento de los patos domésticos que fueron muestreados por primera vez. En lugar de esto, se realizó un muestreo aleatorio en las casas seleccionadas durante cada mes. Por lo tanto, es posible que el pato seropositivo para el subtipo H5N3 no fuera seleccionado nuevamente luego del muestreo realizado en el mes de diciembre 2013. Esto puede ser la razón de que ya no se obtuvieron más resultados seropositivos para el subtipo H5N3.

Otro aspecto importante que puede explicar que solo se obtuvo una muestra seropositiva para el subtipo H5N3, es que no se sabe con exactitud cuántas aves migratorias tienen el virus H5N3. Como se ha mencionado, como parte de la vigilancia de influenza se identificó el virus A/blue-winged teal/Guatemala/CIP049-09/2010(H5N3). Este virus fue detectado en solamente dos aves migratorias de un total de 1913 muestras

analizadas (González-Reiche, 2012). Por lo tanto, es posible que fueran pocas las aves domésticas en contacto con las dos aves migratorias infectadas con el virus H5N3.

Las dos muestras en donde se encontró el virus H5N3 representan el 0.10% del total de 1913 muestras de hisopados cloacales y traqueales de aves silvestres (González-Reiche, 2012). Este bajo porcentaje concuerda con otros estudios, donde se ha aislado el subtipo H5N3 en aves silvestres y también se ha encontrado una baja prevalencia de este virus en aves silvestres. En un estudio realizado en Rumania, el virus fue aislado en 47 muestras de hisopados (47 aves) de un total de 5520 hisopados de patos migratorios, representando el 0.61% (Coman *et al.*, 2014). Otro estudio realizado en Portugal sobre vigilancia de influenza A en aves silvestres en 2005 – 2009, solamente se encontraron tres muestras de las cuales se aisló el virus H5N3 de un total de 5691 muestras de aves silvestres, representando el 0.05% (Henriques *et al.*, 2011).

Con respecto a la prevalencia de anticuerpos contra el virus H5 en aves domésticas, también ha mantenido bajos porcentajes. En un estudio realizado en España sobre vigilancia de influenza en aves acuáticas, se encontró una prevalencia de anticuerpos contra el subtipo H5 de 1.1%, en donde los anticuerpos contra H5 que se detectaron incluían a los subtipos H5N3 y H5N1 (Jurado *et al.*, 2014). En Bangladesh, la seroprevalencia del subtipo H5N1 en patos fue de 0.09%, durante 2009 a 2012 (Khatun *et al.*, 2013). En otros casos de vigilancia, las poblaciones de patos domésticos estudiados han sido negativas para anticuerpos específicos contra influenza (Couacy-Hymann, 2012). Estos datos concuerdan, con el bajo porcentaje de muestras seropositivas contra subtipo H5N3 encontrados en este estudio.

La muestra seropositiva para el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar de Guatemala, fue colectada durante la temporada migratoria (diciembre 2013). Por lo tanto, este resultado sugiere que el pato doméstico, al cual pertenece la muestra, estuvo en contacto con un ave migratoria infectada con el virus H5N3. Las casas seleccionadas de Monterrico y La Candelaria se encuentran próximas a un canal de agua de la localidad (Canal Chiquimulilla). La mayoría de los patos domésticos tienen acceso a este canal ya que en las casas los patios no se encuentran cercados y los patos pueden dirigirse al canal (Figuras 16 – 18), esto sugiere que sí es posible el contacto directo entre las aves migratorias y las aves domésticas por medio del canal.

Las aves migratorias utilizan humedales, como Monterrico y La Candelaria, lagos o estanques como sitios de parada durante la ruta migratoria para descansar y alimentarse (Kim *et al.*, 2009; Davidson & Gauthier, 1993; Eisermann, 2006). Estas paradas pueden durar días o semanas, permitiendo la introducción de una nueva cepa de virus a la población de aves domésticas de la localidad (Kim *et al.*, 2009). La introducción puede ocurrir por medio de la contaminación de agua con el virus, esto ocurre cuando un ave infectada defeca en el agua, expulsando el virus y luego una segunda ave ingiere el agua contaminada (Kim *et al.*, 2009). Esto sugiere nuevamente que el canal de Chiquimulilla de Monterrico y La Candelaria, puede ser el sitio de la introducción del virus hacia el pato doméstico seropositivo para el subtipo H5N3.

Por otro lado, es importante mencionar que de las 97 muestras restantes con resultado seropositivo para influenza A, 30 fueron negativas para el ensayo HI y 67 muestras obtuvieron un resultado inespecífico. Al igual que la prueba para evaluar la especificidad del ensayo con una muestra seropositiva para el subtipo H5N2,

proporcionada por el MAGA, el resultado inespecífico de las muestras de patos se debe a que los anticuerpos presentes son específicos para otros subtipo de virus o para otra cepa del subtipo H5 (Spackman, 2008). Es posible que dentro de estas 67 muestras con resultado inespecífico se encuentren algunas seropositivas contra los subtipos de virus H5N4, H7N9, H3N8, H8N4 y H11N2, que también han sido identificados en aves migratorias de la costa de Guatemala, pero que aún no se han aislado para poder realizar el ensayo HI (González-Reiche, 2012).

Ya que no se obtuvieron resultados seropositivos para el subtipo H5N3 en ambas temporadas (migratoria y no migratoria) y que el resultado seropositivo obtenido no es significativo, se determinó por medio de la prueba Chi-cuadrado que no hay suficiente evidencia para determinar si existe variación en la respuesta antigénica hacia el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar durante la temporada migratoria y no migratoria, en la población de patos domésticos de la Costa Sur de Guatemala durante 2013 a 2014.

## IX. CONCLUSIONES

- A. La presencia de una muestra seropositiva para el subtipo H5N3, sugiere el contacto de aves domésticas con aves migratorias infectadas con el virus A/blue-winged teal/Guatemala/CIP049-09/2010(H5N3).
- B. El ensayo HI implementado, es una prueba precisa y específica para la detección de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza en muestras de suero de patos domésticos de la costa sur de Guatemala.
- C. No hay suficiente evidencia estadística para determinar si existe variación en el título de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar durante la temporada migratoria y temporada no migratoria en patos domésticos de la costa sur de Guatemala, durante noviembre de 2013 a octubre de 2014.

## X. RECOMENDACIONES

- A. Para estudios futuros, se recomienda dar un seguimiento a la detección de anticuerpos contra el subtipo H5N3 del virus de influenza aviar en patos domésticos de la costa sur de Guatemala en años posteriores al 2014.
- B. Aislar otros subtipos de virus de influenza aviar que han sido identificados en aves silvestres de Guatemala, en donde se incluirían los subtipos H5N4, H7N9, H3N8, H8N4 y H11N2 que han sido identificados en estudios previos, con el objetivo de crear una biblioteca de reactivos de referencia. A partir de esta biblioteca, realizar un tamizaje y determinar la prevalencia de anticuerpos contra estos subtipos en patos domésticos de la costa sur de Guatemala durante 2013 a 2014.
- C. Para evaluar de una mejor forma la hipótesis propuesta, es necesario modificar los objetivos para detectar anticuerpos contra una biblioteca de virus aislados de aves migratorias y de esta forma determinar si existe variación en la respuesta antigénica contra estos subtipos durante la temporada migratoria y no migratoria.
- D. Es importante introducir una variable sobre la edad de los patos domésticos de este estudio, ya que hay variaciones en la respuesta inmune de los patos dependiendo de su edad (Kim *et al.*, 2009).

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander, D. 2000. *A review of avian influenza in different bird species*. Veterinary Microbiology. 74: 3 - 13.

Babakir-Mina, M. *et al.* 2009. *Origin of the 2009 Mexico influenza virus: a comparative phylogenetic anyalysis of the principal external antigens and matrix protein*. Archives of Virology. 154(8): 1342 - 1352.

Barriga, G.; C. Arumir & F. Mercado 2006. *Aspectos actuales de la influenza aviaria*. Rev Mex Patol Clin. 53(2): 77 - 84.

Belshe, R. 2005. *The Origins of Pandemic Influenza - Lessons from the 1918 Virus*. The New England Journal of Medicine 353(21): 2209 - 2211.

Biere, B., B. Bauer & B. Schweiger 2010. *Differentiation of Influenza B virus Lineages Yamagata and Victoria by Real-Time PCR*. J. Clin. Microbiol 48(4): 1425 - 1427.

Bodewes, R. *et al.* 2013. *Recurring Influenza B Virus Infections in Seals*. Emerg Infect Dis. 19(3): 511 - 512.

Carbey, E. *et al.* 1974. *Hemagglutination and Hemagglutination inhibition test with Newcastle disease virus-microtiter technique*. 17th Annual Proc. Am. Assoc. of Vet. Lab. Diagn. Pp. 1-6.

Carver, D. Sin fecha. *Preventing Avian Infuenza In Backyard Poultry Flocks*. 3 pp.

Castillo, S. 2008. *El Virus de la Influenza (Ortomixovirus)*. En: <http://pathmicro.med.sc.edu/spanish-virology/spanish-chapter13.htm>. [Con acceso: 17/09/14].

CDC. 2005. *Transmission of Influenza A Viruses Between Animals and People*, Centers for Disease Control and Prevention: 1.

CDC 2010. *Estimaciones de los CDC sobre casos, hospitalizaciones y muertes por influenza H1N1 2009 en Estados Unidos, de abril de 2009 al 13 de marzo de 2010*. En: [http://espanol.cdc.gov/enes/h1n1flu/estimates/April\\_March\\_13.htm](http://espanol.cdc.gov/enes/h1n1flu/estimates/April_March_13.htm). [Con acceso: 2/08/14].

CDC. 2010. *The 2009 H1N1 Pandemic: Summary Highlights, April 2009-April 2010*. En: <http://www.cdc.gov/h1n1flu/cdcresponse>. [Con acceso: 22/07/14].

CDC 2012. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases, Public Health Foundation*.

CDC 2013. *Avian Influenza A (H7N9) Virus*. En: <http://www.cdc.gov/flu/pdf/avianflu/h7n9-reassortment-diagram.pdf>. [Con acceso: 7/10/14].

CDC. 2013. *Avian Influenza A (H7N9) Virus*. En: <http://www.cdc.gov/flu/avianflu/h7n9-virus.htm>. [Con acceso: 19/09/14].

CDC. 2013. *How Flu Spreads*. En: <http://www.cdc.gov/flu/about/disease/spread.htm>. [Con acceso: 28/08/14].

CDC. 2014. *Síntomas y gravedad de la influenza*. En: <http://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/disease/symptoms.htm>. [Con acceso: 26/08/14].

CDC. 2014. *Los virus de la influenza*. En: <http://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/viruses/>. [Con acceso: 20/09/15].

CEPAL/OPS-OMS. 2010. *Evaluación Preliminar del Impacto en México de la Influenza AH1N1*. México, CEPAL 62.

Chan, P. 2002. *Outbreak of Avian Influenza A(H5N1) Virus Infection in Hong Kong in 1997*. Clin Infect Dis. 34(Supplement 2): S58 - S64.

Chen, J., K. Lee, et al. 1998. *Structure of the Hemagglutinin Precursor Cleavage Site, a Determinant of Influenza Pathogenicity and the Origin of the Labile Conformation*. Cell 95(3): 409 - 417.

Coman, A. et al. 2014. *Avian Influenza Surveillance in the Danube Delta Using Sentinel Geese and Ducks*. Influenza Research and Treatment. DOI: 10.1155/2014/965749.

Couacy-Hymann, E. et al. *Surveillance for Influenza Viruses in Poultry and Swine, West Africa, 2006 - 2008*. Emerging Infectious Diseases. 18(9): 1146 - 1452.

Cruse, J. & R. Lewis. 2010. *Atlas of Immunology*. CRC Press.

Cruz, V. et al. 2013. *Síntomas de influenza y medidas preventivas que practicaron los habitantes de la Ciudad de México durante la epidemia de influenza AH1N1*. Revista de Investigación Clínica 66(4): 284 - 290

Davidson, I. & M. Gauthier. 1993. *Wetland Conservation in Central America*. Report No. 93-3. North American Wetlands Conservation Council (Canada). Ottawa, Ontario. 87 p.

Dengler, L. 2014. *Immunophenotyping of mouse models after influenza A infections. Infection Genetics*. Hannover, University of Veterinary Medicine Hannover. Doctor rerum naturalium: 89.

Eisermann, K. 2006. *Evaluation of Waterbird Populations and their Conservation in Guatemala*. Sociedad Guatemalteca de Ornitología. 74 p.

Erickson, G. et al. 2005. *How to evaluate herds using swine influenza serology*. J Swine Health Prod. 13(4): 222 - 224.

Escobar, B. 2012. *Informe Final Integrado de EDC "Unidad de Investigación para el Conocimiento, Uso y Valoración de la Biodiversidad"*. Centro de Estudios Conservacionistas – CECON y Asociación Vivamos Mejor Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Subprograma EDC-Biología. 43 pp.

Fiore, A. et al. 2008. *Prevention and Control of Influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)*. Recommendations and Reports 57(7): 1 - 60.

Gan, S. & K. Patel. 2013. *Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Journal of Investigative Dermatology 133(12).

Gangurde, H. et al. 2011. *Swine Influenza A (H1N1 virus): A pandemic disease*. Systematic Reviews in Pharmacy 2(2): 110 - 124.

García, J. 2014. *Influenza Aviar: Control Epidemiológico* FAO: 10.

García, J. & C. Ramos. 2006. *La influenza, un problema vigente de salud pública*. Salud pública Mex. 48(3): 244 - 267.

Gil, J. et al. 2010. *Pulmonary Pathologic Findings of Fatal 2009 Pandemic Influenza A/H1N1 Viral Infections*. Arch Pathol Lab Med 134: 235 - 243.

González-Reiche, A. et al. 2012. *Influenza A Viruses from Wild Birds in Guatemala Belong to the North American Lineage*. PLoS ONE 7(3): e32873 doi:32810.31371/journal.pone.0032873.

Gonzalez-Reiche A.; A. Ramirez, et al. 2013. *Influenza A virus in Swine Farms from Guatemala: Evidence of zoonotic transmission*. ASTMH 62nd Annual Meeting. Washington, DC.

Greenbaum, A. and J. Bresee. 2013. *Influenza*. En: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2014/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/influenza>. [Con acceso: 17/09/14].

Gutiérrez, R. et al. 2009. *A(H5N1) Virus Evolution in South East Asia*. Viruses 1(33): 335 - 361

Heid, C., J. Stevens, et al. 1996. *Real time quantitative PCR*. Genome Research 6: 986 - 994.

Heinen, P. 2003. *Swine influenza a zoonosis*. [http://www.col.ops-oms.org/prevencion/influenza/docsgenerales/Swine\\_Influenza.htm](http://www.col.ops-oms.org/prevencion/influenza/docsgenerales/Swine_Influenza.htm). [Con acceso: 17/09/14].

Henriques, A. et al. 2011. *Multiyear surveillance of influenza A virus in wild birds in Portugal*. *Avian Pathology*. 40(6): 597 - 602.

Jurado, E. et al. 2014. *Surveillance of Influenza Viruses in Waterfowl Used As Decoys in Andalusia, Spain*. *PLoS One*. 9(6): e98890.

Khatun A. et al. 2013. *Surveillance of Avian Influenza virus type A in semi-scavenging ducks in Bangladesh*. *BMC Veterinary Research*. 9: 196.

Killian, M. 2008. *Avian influenza virus sample types, collection, and handling*. *Methods in Molecular Biology*. Avian Influenza virus.

Kim, J. et al. 2009. *Ducks: The "Trojan Horses" of H5N1 influenza*. *Influenza Other Respi Viruses*. 3(4): 121 – 128.

Koneman, E. & S. Allen. 2008. *Diagnóstico Microbiológico*. Ed. Médica Panamericana.

Lazarus, R. & P. Lian. 2015. *Avian Influenza: Recent Epidemiology, Travel-Related Risk, and Management*. *Curr Infect Dis Rep*. 17:456.

Li, Q., L. Zhou et al. 2014. *Epidemiology of Human Infections with Avian Influenza A(H7N9) Virus in China*. *New England Journal of Medicine* 370(6): 520-532.

*Manual técnico del kit para la detección de anticuerpos contra el virus de la Influenza A*. *Idexx laboratories*, paginas 17-19.

Martínez, I. 2013. *Influenza, Infuenza A (H1N1) , Influenza A (H7N9)*. En: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/influenza.html>. [Con acceso: 9/07/15].

Maxwell, I. 2007. *Real-time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*, Horizon Scientific Press.

Matrosovich, M. et al. 2004. *Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium*. J Virol. 78(22): 12665 - 12667.

Mcdonald, J. 2014. *Handbook of Biological Statistics*. 3rd ed. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland. P. 186 – 189.

Monto, A. et al. 2000. *Clinical Signs and Symtoms Predicting Influenza Infection*. Arch Inter Med 160: 3243 - 3247.

Murphy, M. 2011. *Molecular Diagnosis in Dermatology and Dermatopathology*. Springer Science & Business Media.

NIAID .2011. *Antigenic Drift*. En: <http://www.niaid.nih.gov/topics/flu/research/basic/pages/antigenicdriftillustration.aspx>. [Con acceso: 17/09/14].

Ngoc, P. et al. 2006. *Risk Factors for Human Infection with Avian Influenza A H5N1, Vietnam, 2004*. Emerg Infect Dis. 12(12): 1841 - 1847.

Nucamendi, G. 2014. *Influenza*. S. d. Salud. México, Dirección General Adjunta de Epidemiología 43.

Ohishi, K., et al. 2002. *Serological evidence of transmission of human influenza A and B viruses to Caspian seals (Phoca caspica)*. Microbiol Immunol 46(9): 639-644.

OIE. 2005. Gripe Aviar. *Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004*, OIE. 580 - 595.

Ortiz, J. 2013. *Modelaje Matemático para una Pandemia de Influenza en Guatemala*. Boletín Epidemiológico, Instituto Guatemalteco de Seguridad Social 39: 23.

Peiris, J., M. de Jong & Y. Guan. 2007. *Avian Influenza Virus (H5N1): a Threat to Human Health*. Clinical Microbiology Reviews 20(2): 243

Petric, M.; L. Comanor & C. Petti. 2006. *Role of the Laboratory in Diagnosis of Influenza during Seasonal Epidemics and Potencial Pandemics*. The Journal of Infectious Diseases. 194: S98-110.

Public Health Agency of Canada. 2011. *Pathogenic Safety Data Sheet - Infectious Substances*. En: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/influenza-grippe-b-c-eng.php>. [Con acceso: 29/09/15].

Qi, X., D. Jiang, et al. 2014. *Calculating the burden of disease of avian-origin H7N9 infections in China*. BMJ Open 4(1).

Ray, A. 2015. *Antigenic Drift Vs. Antigenic Shift*. En: <http://www.buzzle.com/articles/antigenic-drift-vs-antigenic-shift.html>. [Con acceso: 10/11/15].

Rojas, O. (2006). *Inmunología*, Ed. Médica Panamericana.

Senne, D. 2003. *Avian Influenza in the Western Hemisphere Including the Pacific Islands and Australia*. *Avian Diseases*. 47(s3): 789 - 805.

Senne, D. 2007. *Avian Influenza in North and South America, 2002 - 2005*. *Avian Diseases*. 51(S1): 167 - 173.

Spackman, E. 2008. *Avian Influenza Virus*. Springer Science & Business Media. 142 pp.

Suarez, D. & S. Schultz. 2000. *Immunology of avian influenza virus: a review*. *Dev Comp Immunol*. 24(2 - 3): 269 - 283.

Suarez, D.; E. Spackman; D. Senee. 2003. *Update on Molecular Epidemiology of H1, H5, and H7 Influenza Virus in Poultry in North America*. *Avian Diseases*. 47(S3): 888 - 897.

Thomas, J. & J. Noppenberger. 2007. *Avian Influenza: A Review*. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 64(2): 149 - 165.

Tolf, C. *et al*. *Individual Variation in Influenza A Virus Infection Histories and Long-Term Immune Responses in Mallards*. *PLOS ONE*. 8(4): e61201.

Tong, S., X. Zhu, *et al*. 2013. *New world bats harbor diverse influenza A viruses*. *PLoS Pathog* 9(10): 10.

*Twice-Weekly Delivery of Fresh Turkey Red Blood Cells*. 2011. CDC. <https://www.fbodaily.com/archive/2011/01-January/26-Jan-2011/FBO-02365043.htm>. [Con acceso: 20/08/15].

Vaqué, J. *et al.* 2009. *Principales características de la pandemia por el nuevo virus de influenza A (H1N1)*. Medicina Clínica 133(13): 513 - 521.

Walnwright, S. *et al.* 2012. *High Pathogenic Avian Influenza in Mexico (H7N3)*. *Expres Watch*. 26: 1 - 9.

Wang, G. *et al.* 2014. *Serological evidence of H7, H5 and H9 avian influenza virus co-infection among herons in a city park in Jiangxi, China*. *Scientific Reports*. (4): 6345.

Webster, R. *et al.* 1992. *Evolution and Ecology of Influenza A Viruses*. *Microbiological Reviews*. 56(1): 152 – 179.

Webster, R. 2002. *The importance of animal influenza for human disease*. *Vaccine* 20: 16 - 20

Wilschut, J. *et al.* 2006. *Rapid Reference to Influenza publication*. ELSEVIER. En: <http://www.rapidreferenceinfluenza.com/chapter/B978-0-7234-3433-7.50009-8/aim/influenza-virus-structure>. [Con acceso: 7/07/14].

Zheng,W & J. Tao. 2013. *Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex*. *FEBS Letters* 587(8): 1206 - 1214.

Wahlgren, J. 2011. *Influenza A viruses: an ecology review*. *Infection Ecology and Epidemiology*. 1:6004.

OMS. 1980. *A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum*. *Bulletin of the World Health Organization* 58(4): 585 - 591

OMS. 2002. *WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance*. Geneva, World Health Organization (document WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5, En: <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsrncs20025rev.pdf>. [Con acceso: 9/07/14].

OMS. 2005. *Evolution of H5N1 Avian Influenza Viruses in Asia*. *Emerging Infectious Diseases* 11(10): 1515 - 1521.

OMS. 2009. *CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A(H1N1)*. United States CDC Atlanta: 8.

OMS. 2013. *Serological detection of avian influenza A(H7N9) virus infections by turkey haemagglutination-inhibition assay*. Beijing, Chinese National Influenza Center: 12.

Yang, M. *et al.* 2011. *Serologic detection of Avian influenza H5 antibodies using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. *Journal of Veterinary Medicine and Health*. 3(4): 56 – 61.

Zhang, J., Y. Feng, *et al.* 2013. *Rapid and Sensitive Detection of H7N9 Avian Influenza Virus by Use of Reverse Transcription–Loop-Mediated Isothermal Amplification*. *Journal of Clinical Microbiology* 51(11): 3760 - 3764.

## XII. APÉNDICE I

### A. Componentes de solución Alsever (1 L):

- 8.0 g Citrato de Sodio
- 0.55 g Ácido Cítrico
- 4.2 g Cloruro de Sodio
- 20.5 g Dextrosa

### XIII. APÉNDICE II

Figura 27. Ejemplo de resultado obtenido de placa de suero control (ensayo HI sin agregar virus) para confirmar la ausencia de aglutininas inespecíficas.

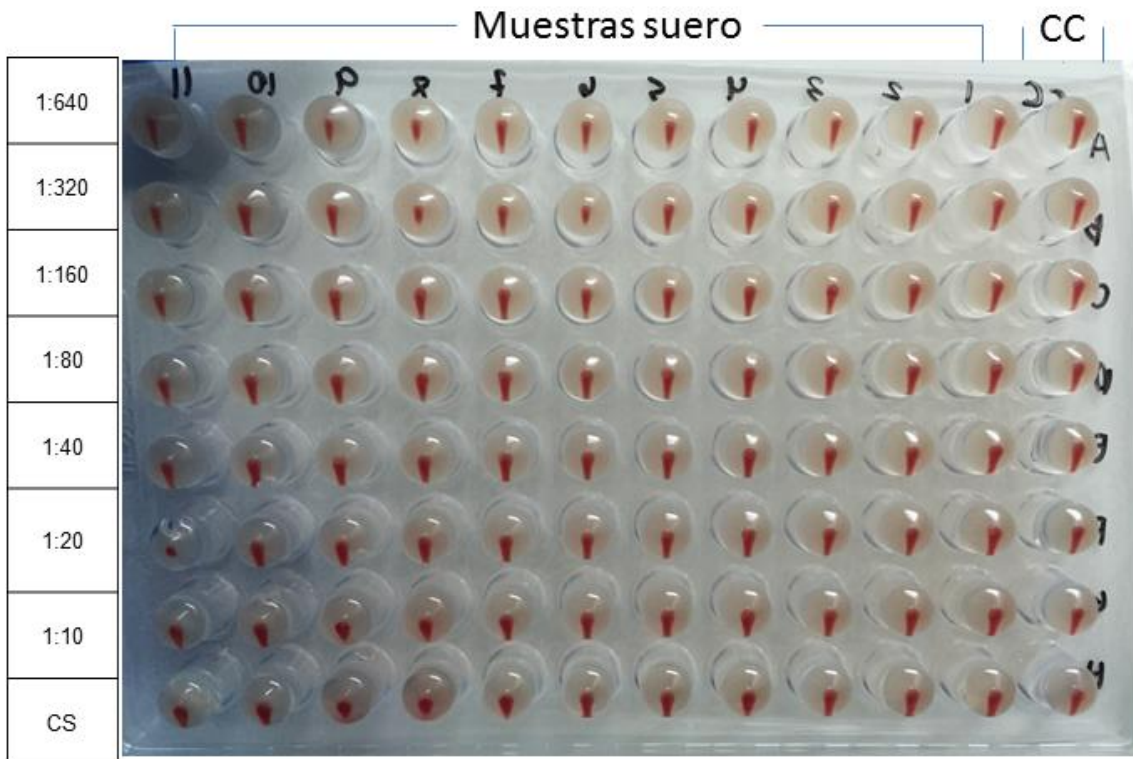


Figura 28. Ejemplo de resultado obtenido para los controles del ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación. Los controles positivo y negativo fueron tratados con RDE seguido de RBC y para el procedimiento del ensayo HI se utilizó la condición de incubación a temperatura ambiente por 30 minutos luego de agregar la solución de RBC a los pozos con suero y virus.

	C-	C+	BT	CC	
1:640					1:128
1:320					1:64
1:160					1:32
1:80					1:16
1:40					1:8
1:20					1:4
1:10					1:2
CS					CS

Figura 29. Ejemplo de resultado obtenido para los controles del ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación. Los controles positivo y negativo fueron tratados con RDE seguido de RBC y para el procedimiento del ensayo HI se utilizó la condición de incubación a 4 °C por 1 hora luego de agregar la solución de RBC a los pozos con suero y virus.

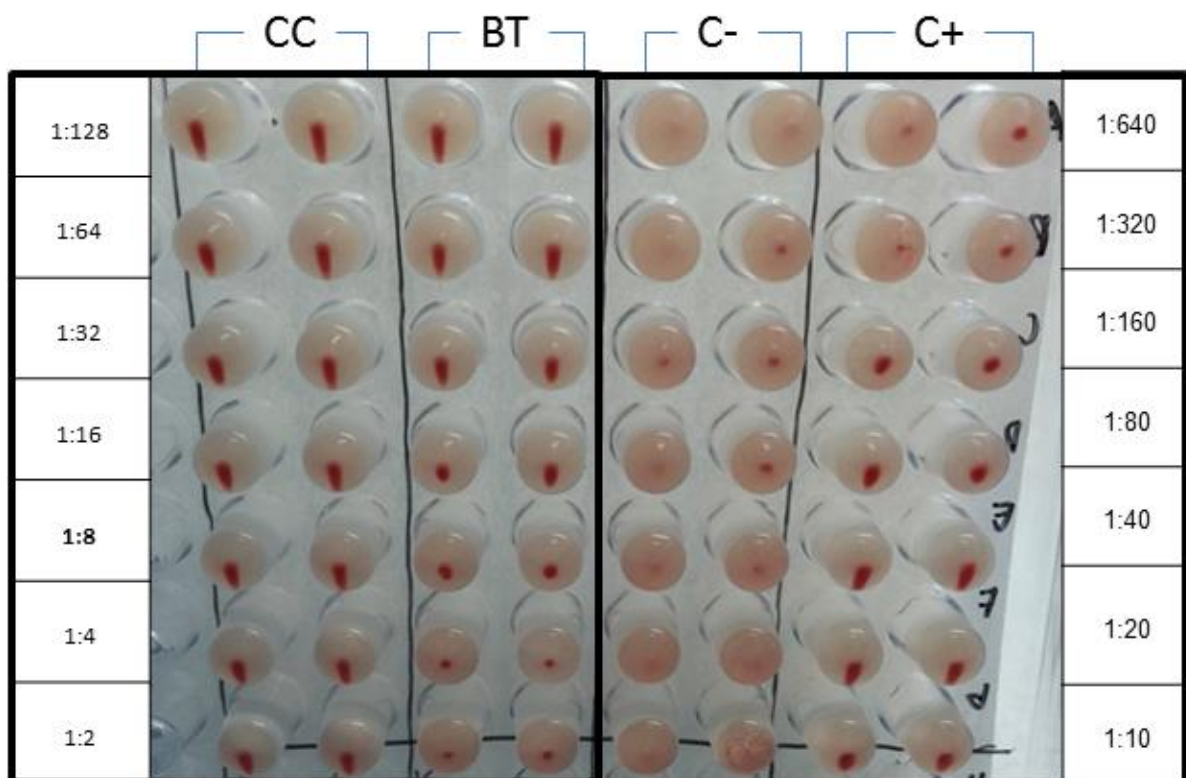


Figura 30. (A) Resultado inespecífico para el ensayo HI para el subtipo H5N3 de muestra clínica de gallina proporcionada por el MAGA reportada como positiva para el subtipo H5N2. (B) Resultado negativo para el ensayo HI para el subtipo H5N3 de control seropositivo pH1N1.

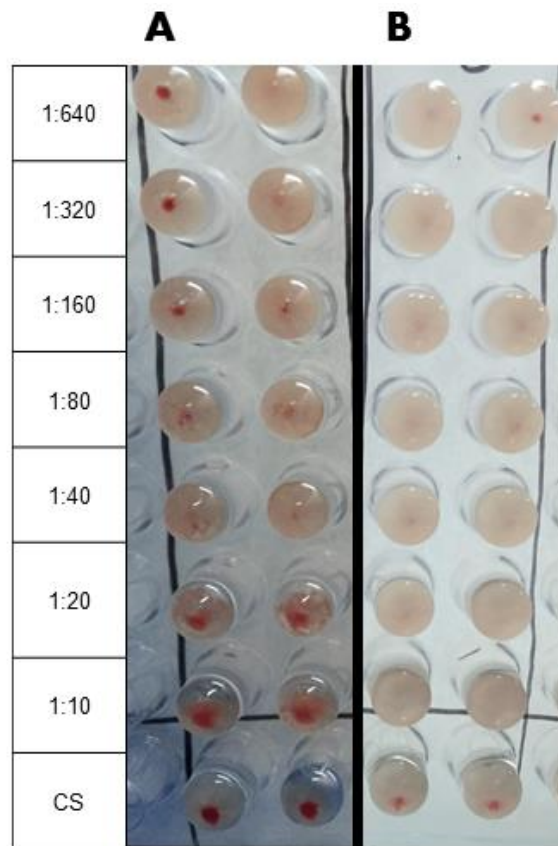
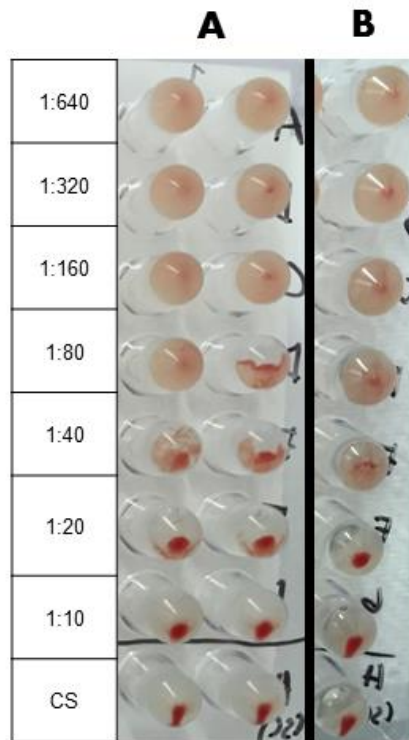




Figura 32. (A) Resultado seropositivo dudoso para el subtipo H5N3 de una muestra de suero de patos. (B) Resultado de ensayo HI confirmatorio para la muestra con resultado seropositivo dudoso para el subtipo H5N3.



#### XIV. CONTACTOS

Estudiante: Martha Patricia Herrera González

Teléfono: 58252140

Correo electrónico: [pattyhe12c@hotmail.com](mailto:pattyhe12c@hotmail.com)

Asesor: MSc. Lucía Ortiz

Teléfono: 23640336 ext. 406 ó 533.

Correo electrónico: [lortiz@ces.uvg.edu.gt](mailto:lortiz@ces.uvg.edu.gt)