

Artículo reseña

## ACTUALIZACIÓN Y PERSPECTIVAS EN EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR

Carmen Laura Perera, Heidy Díaz de Arce, L.J. Pérez

*Dpto. de Virología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: claura@censa.edu.cu*

**RESUMEN:** El virus de la influenza aviar provoca infección, enfermedad y muerte en diferentes especies de aves, además ha adquirido la capacidad de propagarse del hospedador aviar a humanos y otros mamíferos, provocando una enfermedad grave. Por ese motivo, existe una gran preocupación a nivel internacional en la detección del virus de la influenza aviar y las estrategias de diagnóstico. A pesar que los métodos de laboratorios convencionales son ampliamente usados para el aislamiento e identificación de los virus y para la detección de anticuerpos específicos en todo el mundo, nuevas tecnologías han sido rápidamente desarrolladas. Con el empleo de las herramientas moleculares se puede realizar en un mismo día de la detección, patotipificación y caracterización filogenética de los virus de influenza obtenidos a partir muestras clínicas.

*(Palabras clave: Influenza aviar; diagnóstico; diagnóstico molecular)*

---

### UPDATE AND PERSPECTIVES ON THE DIAGNOSIS OF AVIAN INFLUENZA VIRUS

**ABSTRACT:** Avian influenza virus causes infection, disease and death on different bird species and has also acquired the capability of transmitting from avian species to humans and other mammals causing severe diseases. For that reason, there is a great international concern on avian influenza virus detection and diagnostic strategies. Although conventional laboratory methods used for isolation and identification of the virus and for detection of specific antibodies continued to be widely applied, new technologies have been rapidly developed. With the use of molecular tools detection, pathotyping, and phylogenetic characterization of influenza A viruses obtained from clinical specimens can be done on the same day.

*(Key words: Avian influenza; diagnosis; molecular diagnosis)*

---

### INTRODUCCIÓN

Los virus de la influenza aviar pertenecen al género *Influenza virus A* de la familia *Orthomyxoviridae*. Son virus de ARN segmentados de simple cadena y de polaridad negativa. Los virus de influenza aviar del tipo A poseen nucleocapsida y proteínas de la matriz relacionadas antigénicamente y la clasificación en subtipo es en base a los antígenos de la hemoaglutinina (H) y la neuroaminidasa (N) (1). En la actualidad se reconocen 16 subtipos de H (H1–H16) y 9 de neuroaminidasa N (N1–N9).

Los virus de influenza aviar pueden ser clasificados en dos patotipos diferentes, de baja y de alta patogenicidad, basados en la capacidad de producir enfermedad y mortalidad en pollos (2). Los virus de influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP) solamente se han asociados con los subtipos H5 y H7, aunque no todos los virus de estos subtipos causan la IAAP. Tanto la IAAP como la influenza aviar de baja patogenicidad (IABP) provocan una enfermedad altamente contagiosa capaz de propagarse a poblaciones susceptibles en un corto periodo de tiempo. Esto puede provocar efectos devastadores en la industria avícola.

la, particularmente si se presenta en áreas de alta densidad de aves (3). Atendiendo a estas características y al riesgo que existe de que los virus H5 y H7 de baja patogenicidad se conviertan en virulentos por mutación, hacen que todos los virus de los subtipos H5 y H7 sean de notificación obligatoria a la Oficina Internacional de Salud Animal (OIE) (3).

La estrategia más eficaz para luchar con eficiencia contra la influenza aviar es realizando una detección y alerta temprana del virus, para de esta forma prevenir la propagación de la enfermedad y lograr un control efectivo. En este sentido es importante contar con metodologías diagnósticas rápidas y confiables que permitan realizar la confirmación de la enfermedad. En este trabajo se pretende realizar una actualización del diagnóstico de la influenza aviar tanto por los métodos convencionales como por las tecnologías moleculares.

## DIAGNÓSTICO CLÍNICO

La IAAP puede variar los síntomas clínicos dependiendo del hospedador, la edad del ave, la presencia de otros microorganismos y las condiciones ambientales. Se puede observar desde una muerte súbita con pocos o sin signos aparentes, hasta una enfermedad característica con síntomas respiratorios, lagrimeo excesivo, fatiga respiratoria, sinusitis, edema de la cabeza y cara, cianosis de la piel no cubierta de plumas, diarrea y en gallinas ponedoras un descenso brusco en la producción de huevo. Los virus de IABP que normalmente no causan enfermedad o causan una enfermedad leve, pueden presentar un cuadro clínico similar a las cepas de IAAP si están presentes condiciones exacerbantes. Sin embargo, ninguno de estos signos puede considerarse patognomónico, por lo que el diagnóstico confirmativo de la influenza aviar se basa en los análisis de laboratorio.

## TÉCNICAS DE DETECCIÓN DIRECTA

### Aislamiento viral e identificación

Los protocolos de laboratorios para la detección e identificación del virus de la influenza aviar están basados en el aislamiento viral en embrión de pollo libres de patógenos específicos (LPE) o embriones específicamente libres de anticuerpos (LA) y/o cultivos celulares (MDCK). Esta metodología es considerada el estándar de oro para la detección del virus de la influenza aviar (3). Las muestras son inoculadas en los embriones de pollo por la vía de la cavidad alantoidea e incubadas de 35-37°C durante 4-5 días. Todos los embriones, tanto los vivos como los muertos, son evaluados para determinar la presencia de actividad

hemoaglutinante, pues la misma es indicativa de la presencia de un virus de influenza tipo A o de paramyxovirus aviar. Las muestras que den una reacción negativa se les debe realizar un pasaje en embriones de pollo.

Una vez obtenido el aislamiento de un virus hemoaglutinante se realiza la identificación del serotipo de la hemoaglutinina (H) por la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) para lo cual se necesitan antisueros mono-específicos contra los 16 subtipos de H. Mientras que para determinar el subtipo de neuroaminidasa (N) se necesita antisueros mono-específicos contra los nueve subtipos de N usando la prueba de inhibición de la neuroaminidasa (3). La determinación del tipo de N en aislados de H5 y H7 reviste gran importancia, para poder diferenciar entre las aves vacunadas e infectadas, pues en las estrategias de control se seleccionan cepas vacunales que tengan una N heteróloga respecto a los virus causantes del brote de la enfermedad y que permite diferenciar las aves vacunadas de infectadas, conocido con las siglas DIVA (4,5).

Una vez identificado un aislado del virus de la IA es necesario determinar su virulencia o patogenicidad para los pollos, sobre todo con los serotipos H5 y H7, que son los que pueden provocar la IAAP. Para la determinación de la patogenicidad existen dos métodos, el índice de patogenicidad intravenosa (IPIV), que consiste en la inoculación intravenosa de gallinas de cuatro a ocho semanas de edad, donde después de 10 días de observación si provoca una mortalidad igual o mayor al 75% o un IPIV >1,2 se clasifica la cepa como altamente patógenas para el pollo. El otro método es por predicción del patotipo por RT-PCR y secuenciación de ácidos nucleicos del segmento del gen de la H que codifica el sitio de procesamiento proteolítico de la hemoaglutinina. La presencia de múltiples aminoácidos básicos en este sitio se relaciona con las cepas altamente patógena de los serotipos H5 y H7 (6,7).

Aunque el aislamiento viral es el único método que puede determinar la presencia de virus infectivo en el medio, tiene como limitante que si las partículas virales no están viables en la muestra se emite un resultado falso negativo. Esto puede ser provocado porque la muestra a evaluar proceda de lugares lejanos, donde no es posible conservar bien la muestra en su traslado hacia el laboratorio (8).

### ELISA de captura de antígeno

El ELISA de captura de antígenos es utilizado en múltiples formatos a nivel mundial para la detección rápida de la influenza A. Los ensayos, originalmente fueron desarrollados para la detección en humanos,

mas tarde fueron aplicados en otras especies de animales, tales como pollos (9,10,11). Los métodos inmunoenzimáticos desarrollados para la detección de antígeno del virus de influenza generalmente son de una plataforma sencilla y pueden ser aplicados tanto en el laboratorio como en el campo. Los mismos se basan en la detección de una de las mayores proteínas virales (la hemoaglutinina o la neuroaminidasa) y no requieren que el virus esté viable en el campo para dar un resultado positivo. Recientemente, varios métodos de diagnóstico para la detección rápida de antígenos de influenza aviar en pollos han sido desarrollados y comercializados, por lo que en estos momentos esta metodología es de fácil adquisición, pues la misma es comercializada por muchas compañías internacionales.

La mayoría de estos diagnosticadores detectan antígenos de influenza tipo A (la proteína de la matriz o la nucleoproteína), por lo que no facilita ninguna información sobre el subtipo de la H o N, así como, del patotipo. Recientemente se ha desarrollado un ensayo de captura de antígenos que emplea un anticuerpo monoclonal específico contra el subtipo H5 (12). Sin embargo, trabajos relacionados con las experiencias de los laboratorios evaluando la utilidad de estos diagnosticadores, indican que los métodos de captura de antígeno tienen una utilidad limitada, dado por la baja sensibilidad y especificidad que tienen cuando se comparan con otros métodos (9 y 11). El límite de detección para la mayoría de los ELISA disponibles comercialmente es 1000 veces menor que el aislamiento viral y por lo general en un rango entre  $10^4$  y  $10^3$  DIE<sub>50</sub> (13). Por otro lado se ha sugerido que los ELISA de captura son más eficientes en detectar los antígenos virales cuando están asociados a células, que en muestras clínicas donde el virus se encuentra libre (14 y 15). Estos son elementos muy importantes a tener en cuenta a la hora de emitir un diagnóstico sobre la base de estos métodos (8).

Dada la baja sensibilidad de los ensayos inmunoenzimáticos en la detección de antígenos y teniendo en cuenta que la liberación de este virus se produce en un corto periodo de tiempo y con frecuencia en muy bajas concentraciones, los mismos no son recomendados para ser utilizados en los programas de vigilancia (13). Existen además, otras limitaciones para algunos formatos relacionadas con la interferencia de la peroxidasa endógena principalmente en muestras de sangre y tejido, así como, se ha reportado un bajo nivel de especificidad cuando están presentes otros patógenos relacionados (16).

## Ensayos de detección molecular

Todos los diagnosticadores moleculares comparan el mismo objetivo básico, el de amplificar altos niveles de ácidos nucleicos para facilitar su identificación en una muestra. La detección basada en la reacción en cadena de la polimerasa para el virus de la influenza aviar se ha incrementado de manera exponencial en los últimos años. Varios protocolos para la detección del RNA del virus de la influenza tanto en muestras clínicas como de laboratorio han sido desarrollados basados en diferentes metodologías moleculares, tales como transcripción inversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (9, 17, 18), RT-PCR-ensayo inmuno enzimático (RT-PCR-ELISA) (19), RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) (20, 21) y amplificación de ácidos nucleicos basados en secuenciación (NASBA) (22). Las técnicas de RT-PCR, RT-PCR-ELISA y el rRT-PCR son similares, solo se diferencia en que el producto de PCR es detectado por métodos diferentes.

La RT-PCR convencional para la caracterización del virus de la influenza aviar es utilizada por los laboratorios desde la década de 1990. La aplicación de esta metodología, además de conllevar a la detección rápida e identificación del subtipo (al menos de H5 y H7), el producto de PCR purificado puede emplearse en la secuenciación de ácidos nucleicos y con ello determinar la patogenicidad (3, 23).

Existen varios elementos importantes a tener en cuenta para realizar el diagnóstico del virus de la influenza aviar por RT-PCR. Resultados obtenidos avalan que el diagnóstico puede verse afectado en dependencia de la muestra clínica que se utilice. Las muestras traqueales proporcionan una alta sensibilidad y especificidad con relación al aislamiento viral, mientras que las muestras de heces fecales carecen de sensibilidad, dado el alto número de inhibidores que presentan para las reacciones moleculares (24). Por otro lado, para alcanzar resultados confiables es necesario la amplificación biológica de la muestra inicial en embriones de pollos, para de esta forma obtener altos títulos del virus ( $1 \times 10^6$  DIEP<sub>50</sub>/mL o más) y realizar la extracción de RNA a partir del líquido alantoideo (25). Ensayos interlaboratorios realizados recientemente por la Unión Europea para la identificación directa por RT-PCR convencional para H5 y H7 a partir de muestras clínicas de pollos, demostraron que esta técnica no es capaz de detectar la presencia del RNA extraído directamente de la muestra clínica cuando existen bajos títulos del virus en la muestra, en particular en los casos de IABP (26).

La RT-PCR convencional es muy utilizada actualmente en los laboratorios de diagnóstico para la secuenciación del virus de la influenza aviar, principalmente del gen de la hemoaglutinina de los subtipos H5 y H7 de aislados obtenidos en brotes de campo (27). De esta forma se determina la patogenicidad de los mismos, así como proporciona datos filogenéticos sobre todo en la región variable del gen de la hemaglutinina, que permiten realizar estudios de epidemiología molecular entre los diferentes brotes de influenza aviar (28). A través de estos estudios se pudo conocer que los aislados H5 americanos son filogenéticamente distintos a los aislados de H5 europeos, y lo mismo es aplicable para los aislados de H7 de América y Eurasia, siendo esto un elemento muy importante a la hora de seleccionar los cebadores para realizar un diagnóstico molecular certero (29).

Por otro lado, el método RT-PCR - ELISA, tiene un alto riesgo de generar resultados falsos positivos producto de la contaminación cruzada que puede ocurrir entre las muestras, particularmente cuando se procesa un alto número de estas al mismo tiempo (8).

El rRT-PCR es un método rápido, altamente sensible y específico para realizar el diagnóstico de influenza aviar a partir de muestras clínicas. Esto hace que se convierta en la técnica de elección para realizar un diagnóstico oportuno y confiable ante la sospecha de un brote de influenza aviar, pues le permite a las autoridades veterinarias tomar medidas rápidas que permitan minimizar los devastadores daños que provoca un brote por esta entidad en poblaciones susceptibles de aves. Este método tiene como ventaja adicional que existe muy poca posibilidad de contaminación cruzadas, pues los resultados se obtienen en tiempo real. Además, muchas plataformas de rRT-PCR tienen un formato de 96 pozos, el cual combinado con un robot para la extracción del RNA, aumenta de manera significativa la capacidad de análisis de muestras a evaluar en una corrida.

Han sido descritos y validados varios ensayos de rRT-PCR para amplificar tanto regiones del gen de la matrix (M) como de la región HA2 del gen de la H. El gen M es conservado en los 16 subtipos de la H de todas las regiones geográficas, lo que lo hace ideal para la detección del virus de la influenza aviar. Mientras que la región HA2 es relativamente conservada dentro de los genes de la hemaglutinina, lo que hace que sea la de mayor interés para el diagnóstico de los subtipos H5 y H7 (30, 31).

Sin embargo, dado a que existe divergencia entre los virus de influenza aviar de los diferentes hemisferios, incluso dentro de la región HA2, se hace muy

difícil diseñar una pareja de cebadores sensibles para el rRT-PCR que permita la detección de virus de influenza aviar H5 o H7 de todas las regiones del mundo. Spackman y et al, (26) diseñaron una secuencia de cebadores/ sondas para la detección de aislamientos de H5 y H7 de América del Norte, los cuales no eran aplicables para el diagnóstico de los aislamientos euroasiáticos. Estos cebadores fueron modificados por Slomka y et al. (26), de manera que permitieran detectar la cepa H5N1 de influenza aviar del «linaje Asiático» y otros virus Euroasiáticos de influenza aviar de H5 que han sido aislados en los últimas décadas.

Los rRT-PCR necesitan ser validados al igual que todas las técnicas de diagnóstico. Los dos elementos más importantes a los que debe estar dirigida la validación son la sensibilidad y la especificidad. Con relación a la sensibilidad debe comprobarse que el nuevo método desarrollado detecta de manera exitosa diferentes virus de la influenza aviar. Los PCRs genéricos deben detectar los 16 subtipos H, mientras que los rRT-PCR de H5 y H7 deben detectar un número considerable de aislamientos dentro del subtipo correspondiente. Dada la diversidad genética que existe entre los virus de los subtipos H5 y H7 del hemisferio Este y Oeste es muy importante incluir virus de influenza aviar de los subtipos H5 y H7 de diferentes regiones geográficas (29). Con relación a la especificidad debe ser demostrado que el nuevo rRT-PCR de influenza aviar no muestren señales falsas positivas. Para ello se deben incluir en la evaluación varios patógenos aviarios que no se correspondan con cepas de influenza aviar (especialmente el virus de la enfermedad de Newcastle) y un panel de muestras clínicas que deben ser negativas a influenza aviar por aislamiento viral (25).

Es importante demostrar que el nuevo método es aplicable a muestras clínicas. Las muestras deben ser evaluadas tanto por el nuevo rRT-PCR para influenza aviar como por aislamiento viral en embriones pollos, por ser el «estándar de oro». Esto determinará si el nuevo rRT-PCR para influenza aviar es más sensible que el aislamiento viral. Las muestras clínicas pueden obtenerse de aves infectadas experimentalmente o de aves de campo procedentes de un brote de influenza aviar.

## TÉCNICAS DE DETECCIÓN INDIRECTA

### Ensayos serológicos

Las técnicas serológicas se utilizan para demostrar la presencia de anticuerpos específicos. Estos pueden detectarse aproximadamente siete días después de la infección. Con los estudios serológicos se

pueden detectar tanto los anticuerpos de grupo (frente a virus Influenza A, sin discriminar el subtipo), como los anticuerpos específicos frente a las distintas HA y NA (32).

Las técnicas serológicas van a tener una mayor aplicación para demostrar la infección por cepas de IABP. Una de las principales aplicaciones del diagnóstico serológico es para la certificación de aves para el comercio. Sin embargo, la serología carece de valor en las aves infectadas con cepas de IAAP, debido a que la mayoría mueren antes de desarrollar una respuesta de anticuerpos (20).

### **Agar gel difusión**

La técnica de agar gel difusión (AGID) detecta la presencia o ausencia de anticuerpos frente a nucleocapsida o antígeno de la matriz, los cuales son similares en todos los virus de la IA. Este ensayo utiliza como antígeno un fluido sobrenadante inactivado con formalina procedente de homogenado de membranas corioalantoideas de embriones de pollo inoculados con el virus. El AGID sirve para detectar anticuerpos en gallinas y pavos, pero no para las demás especies, ya que no todas las especies aviares producen anticuerpos precipitantes, especialmente los patos (33, 3).

### **ELISA**

Es una técnica más sensible que el AGID. Los ELISAs indirectos para la detección de anticuerpos en gallinas y pavos han sido ampliamente utilizados por muchos laboratorios de diagnóstico desde hace más de una década y están disponibles comercialmente. Sin embargo, tienen como dificultad que no pueden ser empleados para la detección en investigaciones serológicas en otras especies, como patos y aves silvestres. Actualmente se ha desarrollado un ELISA de competición que permiten la detección de anticuerpos frente a Influenza A, independientemente de la especie que se trate (34).

### **Inhibición de Hemaglutinación**

La inhibición de la hemoaglutinación (IHA) es utilizada para la detección de anticuerpos específicos frente a los distintos subtipos de HA. Se basa en la capacidad de los anticuerpos presentes en el suero de unirse a la hemaglutinina vírica y evitar la aglutinación de eritrocitos de pollos por el virus. Es una prueba cuantitativa que permite determinar el título de anticuerpos en el suero. Cuando la técnica IHA se utiliza para detectar subtipos específicos de H con subtipos desconocidos de N, se recomienda utilizar dos antígenos que contengan la misma H con diferentes N, para de esta forma eliminar la posible interferencia en IHA con los anticuerpos N (35).

## **CONCLUSIONES**

A pesar que la OIE reconoce el aislamiento viral como el «estándar de oro» en el diagnóstico de la IA, nuevas tecnologías en el diagnóstico de este virus continúan evolucionando. Las técnicas moleculares en particular han incrementado la velocidad en el diagnóstico dado por su alta sensibilidad y a la vez han permitido realizar la detección, tipificación patogénica y la caracterización filogenética a partir de muestras clínicas en muy poco tiempo, hasta en un mismo día.

Los laboratorios que tengan bajo su responsabilidad realizar el diagnóstico de esta entidad debe contar con algoritmos diagnósticos que contemplen tanto las técnicas convencionales como moleculares, de manera que les permita realizar tanto un diagnóstico pasivo como parte de los programas de vigilancia de los países, como activo ante la sospecha de la enfermedad en el campo. Para de esta forma establecer de manera rápida un conjunto de medidas que eviten o minimicen los devastadores daños provocados por esta enfermedad.

## **REFERENCIAS**

1. World health organization expert committee. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum. Bull WHO. 1980; 58:585-591.
2. Swayne DE, Suarez DL. Highly pathogenic avian influenza. Rev Sci Tech 2000;19:463-482.
3. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Part 2. Section 2.1. Chapter 2.3.4. Avian Influenza. 2008; 465-481. Available from: <http://www.oie.int/>.
4. Cattoli G, Terregino C, Brasola V, Rodriguez JF, Capua I. Development and preliminary validation of an ad hoc N1-N3 discriminatory test for the control of avian influenza in Italy. Avian Dis. 2003;47:1060-1062.
5. Capua I, Terregino C, Cattoli G, Mutinelli F, Rodriguez JF. Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing an heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. Avian Pathol. 2003;32:47-55.
6. Suarez DL, Senne DA, Banks J, Brown IH, Essen SC, Lee CW, et al. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak. Chile. Emerg Infect Dis. 2004;10:693-699.

7. Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis.* 1996;40:425-37.
8. Cattoli G, Capua I. Diagnosing avian influenza in the framework of wildlife surveillance efforts and environmental samples. *Journal of Wildlife Diseases.* 2007;43Suppl 3:S35-S39.
9. Cattoli G, Drago S, Maniero A, Toffan E, Bertoli S, Fassina C, et al. Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. *Avian Pathol.* 2004;33:432-437.
10. Bai GR, Sakoda Y, Mweene AS, Kishida N, Yamada T, Minakawa H, et al. Evaluation of the Espline<sup>®</sup> Influenza A&B-N kit for the diagnosis of avian and swine influenza. *Microbiology and Immunology.* 2005;49:1063-1067.
11. Woolocock PR, Cardona CJ. Commercial immunoassay kits for the detection of influenza virus type A: Evaluation of their use in poultry. *Avian Dis.* 2005;49:477-481.
12. He Q, Velumani S, Du Q, Lim CW, Ng FK, Donis R. Detection of H5 influenza viruses by antigen capture ELISA using H5-specific monoclonal antibody. *Clin Vac Immunol.* 2007;14:617-23.
13. Charlton B, Crossley B, Hietala S. Conventional and future diagnostics for avian influenza. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 2009;32:341-350.
14. Ryan-Poirier KA, Katz JM, Webster RG, Kawaoka Y. Application of Directigen FLU-A for the detection of Influenza A virus in human and nonhuman specimens. *J Clin Micro.* 1992;30:1072-1075.
15. Quinlivan M, Cullinane A, Nelly M, Van Maanan K, Heldens J, Arkins S. Comparison of sensitivities of virus isolation, antigen detection, and nucleic acid amplification for detection of equine influenza virus. *J Clin Micro.* 2004;42:759-63.
16. Amano Y, Cheng Q. Detection of influenza virus: traditional approaches and development of biosensors. *Anal Bioanal Chem.* 2005;381:156-64.
17. Lee MS, Chang PC, Shien J H, Cheng MC, and Shieh HK. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods.* 2001;97:13-22.
18. Munch MLP, Nielsen KJ, Handberg PH, Jorgensen. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch Virol.* 2001;146:87-97.
19. Dybkaer K, Munch M, Handberg KJ, Jorgensen PH. Application and evaluation of RT-PCR-ELISA for the nucleoprotein and RT-PCR for detection of low-pathogenic H5 and H7 subtypes of avian influenza virus. *J Vet Diagn Invest.* 2004;16:51-56.
20. Suarez DL, Das A, Ellis E. Review of Rapid Molecular Diagnostic Tools for Avian Influenza Virus. *Avian Dis.* 2007;51:201208.
21. Spackman E, Suarez DL. Use of a novel virus inactivation method for a multicenter avian influenza real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction proficiency study. *J Vet Diagn Invest.* 2005;17:76-80.
22. Collins RA, Ko LS, Fung KY, Chan KY, Xing J, Lau LT, et al. Rapid and sensitive detection of avian influenza virus subtype H7 using NASBA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;300:507-515.
23. Senne DA, Pedersen JC, Suarez DL, Panigrahy B. Rapid diagnosis of avian influenza (AI) and assessment of pathogenicity of avian H5 and H7 subtypes by molecular methods. *Dev Biol* 2006;126:171-177.
24. Koch G. Laboratory issues: Assessment of the sensitivity and specificity of PCR for NDV on cloacal and tracheal swabs compared to virus isolation. Proceedings of the Joint Eighth Annual Meetings of the National Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of Countries of the European Union, Padova, Italy. Commission of the European Communities; 2003:114-117.
25. Hoffmann B, Beer M, Reid SM, Mertens P, Oura CAL, Rijn PA, et al. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: Sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Veterinary Microbiology.* 2009;1-23.

- 26.Slomka MJ, Pavlidis T, Banks J, Shell W, McNally A, Essen S, et al. Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005-2006. *Avian Dis.* 2007;51:373-377.
- 27.Bao Y, Bolotov P, Dernovoy D, Kiryutin B, Zaslavsky L, Tatusova T, et al. The influenza virus resource at the nationalcenter for biotechnology information. *J Virol.* 2008;82:596-601.
- 28.Banks J, Speidel ES, Moore E, Plowright L, Piccirillo A, Capua I, et al. Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. *Arch Virol.* 2001;146:963-973.
- 29.Rohm C, Horimoto T, Kawaoka Y, Suss J, Webster RG. Do hemagglutinin genes of highly pathogenic avian influenza viruses constitute unique phylogenetic lineages? *Virology.* 1995;209: 664-670.
- 30.Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, et al. Development of a real time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 haemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3256-3260.
- 31.Lee CW, Suarez DL. Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. *J Virol Methods.* 2004;119:151-158.
- 32.Guan Y, Peiris JS, Lipatov AS, Ellis TM, Dyrting KC, Krauss S, et al. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99:8950-8955.
- 33.Commission Decision of approving a Diagnostic Manual establishing diagnostic procedures, sampling methods and criteria for evaluation of the laboratory tests for the confirmation of Avian Influenza. Commission of the European Communities (en discusión); 200:95.
- 34.Starick E, Werner O, Schirmeier H, Kollner B, Riebe R, Mundt E. Establishment of a competitive ELISA (cELISA) system for the detection of influenza A virus nucleoprotein antibodies and its application to field sera from different species. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2006;53(Oct):370-5.
- 35.Zambon M. C. The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol.* 2001;11:227-241.

**(Recibido 5-8-2010; Aceptado 10-12-2010)**