

01657  
2  
2e



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION

ASLAMIENTO DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A  
(CEPA A/POLLO/VALLE DE BRAVO/1994 H5N2) A  
PARTIR DE POLLO DE ENGORDA EN EL MUNICIPIO  
DE VALLE DE BRAVO, MEXICO, EN COINFECCION  
CON EL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA

**TESIS PRESENTADA ANTE LA**

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DE LA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DE LA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE

**MAESTRO, EN CIENCIAS VETERINARIAS;**

*(Economía Alimentación Animal)*

POR

**LUIS VERA NOGUEZ**



ASESORES:

MVZ, Ph.D. GUILLERMO TELLEZ ISAIAS

DR. JESUS CASASOLA FLORES

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermanos por su ayuda y comprensión

## **AGRADECIMIENTOS**

Expreso mi gratitud a todas aquellas personas que participaron en la realización de este trabajo.

Así como también a las siguientes empresas e instituciones por la ayuda y el financiamiento recibido:

Departamento de Producción Animal: Aves y el Departamento de Virología De la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México

Laboratorio de Virología y Departamento de Embriología del Desarrollo del Hospital Infantil de México "Federico Gómez"

US-AID University Linkage Project No. PCE-5063-A-00-2045-00

Departamento de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México

S.P.R. Productores Avípecuarios de R.L.

Biosíntesis Laboratorios S.A. de C.V.

## INDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>9</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>JUSTIFICACION</b>	<b>11</b>
<b>MATERIAL Y METODO</b>	<b>12</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>20</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>25</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>28</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>29</b>
<b>CUADROS</b>	<b>34</b>
<b>FIGURAS</b>	<b>37</b>

## RESUMEN

MVZ LUIS VERA NOGUEZ. AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (CEPA A/POLLO/VALLE DE BRAVO/1994 H5N2) A PARTIR DE POLLO DE ENGORDA EN EL MUNICIPIO DE VALLE DE BRAVO, MEXICO, EN COINFECCION CON EL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA

Se describió el aislamiento y caracterización de un virus de la familia *Orthomyxoviridae* en coinfección con el virus de la bronquitis infecciosa de las aves.

Para la clasificación del ortomixovirus se verificó: 1) su poder aglutinante de glóbulos rojos de ave y del grupo sanguíneo "O" humano; 2) la sensibilidad del poder hemoaglutinante del virus tratado a 56 C durante 30 min.; 3) la pérdida de infectividad ante solventes orgánicos y pH 3.0; 4) la estabilidad ante la congelación y descongelación; 5) la estabilidad frente a cationes divalentes; 6) la conservación del poder hemoaglutinante del virus tratado con 0.2% de formol 7) que no posee relación antigénica con el virus de la enfermedad de Newcastle; 8) que los viriones son pleomórficos y miden de 80 a 120 nm de diámetro con proyecciones de 8 a 12 nm en toda la superficie.

Se comprobó que el virus aislado pertenece al género *Influenza A*, por medio de pruebas de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales practicadas a células infectadas.

Se demostró que se trata de una cepa avirulenta, mediante el desafío intravenoso en aves susceptibles.

Se estableció la técnica de inhibición de la hemoaglutinación para detectar anticuerpos en el suero de aves y la prueba de inmunofluorescencia directa para detectar el antígeno viral en células infectadas. Estas pruebas se implementaron en el Departamento de Producción Animal: Aves de la F. M. V. Z. de la U. N. A. M.

Para la clasificación serológica, secuenciación de aminoácidos en su hemoaglutinina y determinación de virulencia, el líquido alantoideo conteniendo al virus de influenza fue remitido a la Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales, quienes a su vez remitieron al "National Veterinary Service Laboratory" ubicado en Ames, Iowa, E. U. A. El reporte fue que en el líquido alantoideo se encontró contenido un virus de influenza aviar tipo H5N2 no virulento y que su hemoaglutinina presentó la siguiente secuencia de aminoácidos:

	<u>HA1</u>	<u>HA2</u>
Pro Gln-----	Arg Glu Thr	Arg/Gly

## INTRODUCCION

En una explotación de 3 000 aves de engorda, de edades múltiples, ubicada en el municipio de Valle de Bravo, México, se presentaron cuadros clínicos de infecciones respiratorias desde el mes de diciembre de 1993 hasta el mes de abril de 1994. Estos cuadros se caracterizaron por afectar a aves de 7 a 9 semanas de edad. En un principio se observaron signos respiratorios caracterizados por estertores traqueales, exudado nasal y alimento adherido a las fosas nasales. En aquellos casos en que la difusión de la enfermedad fue lenta dentro de una misma caseta no fue posible determinar la presencia del virus de la bronquitis infecciosa de las aves. La mortalidad acumulada antes de comenzar el problema era de 3.5%; durante los 7 días siguientes al inicio de la infección, la mortalidad fue de 7 %, dando por resultado una mortalidad acumulada del 10.5%. En los estudios de necropsia de los estadios tempranos de la infección se observó congestión en la laringe y en algunos casos hemorragias petequiales; en la tráquea se hizo evidente una ligera congestión en el tercio superior con presencia de abundante exudado catarral. A medida que el cuadro clínico evolucionó, las lesiones traqueales fueron más extensas y severas, llegando en varios casos a afectar la tráquea en su totalidad. En algunas ocasiones se observaron hemorragias petequiales principalmente en la zona que abarca los primeros seis anillos traqueales superiores y la faringe. También a la necropsia aumentaron las incidencias de enfermedad respiratoria crónica complicada (ERCC) y del síndrome ascítico, llegando a presentarse en la mortalidad de un día el 60% de las aves con lesiones avanzadas de ERCC y el 40% presentaban líquido ascítico en la cavidad abdominal.

En repetidas ocasiones se realizaron antibiogramas de las bacterias aisladas de los problemas de ERCC, para poder realizar tratamientos con los medicamentos de elección. Cuando dichos tratamientos fueron administrados en las parvadas afectadas en la mayoría de los casos no se observó ningún efecto sobre la mortalidad. °

Las enfermedades virales del tracto respiratorio de las aves ocasionan pérdidas económicas por reducir el ritmo de crecimiento y aumentar el número de aves de desecho (34). Como facilitan la presencia de coinfecciones bacterianas, ellas también incrementan los costos de producción por medicaciones (4,16).

Entre los virus que afectan el tracto respiratorio de las aves comúnmente se encuentran involucrados el virus de la bronquitis infecciosa, el virus de la laringotraqueitis infecciosa, adenovirus, así como algunos paramixovirus y ortomixovirus (6,14,16,19). Entre los paramixovirus destaca en México el virus de la enfermedad de Newcastle y en otros países se han reportado infecciones por ortomixovirus.

Los ortomixovirus son una familia de virus que presentan afinidad por las mucinas del tracto respiratorio superior (4,14,16,23). Todos los ortomixovirus reconocidos hasta la fecha son considerados virus influenza y pueden ser clasificados como tipo A, B o C según sus antígenos de nucleocápside y proteína M, los cuales no presentan reacción cruzada entre sus diferentes tipos. Tienen en su genoma una cadena de ARN sencilla de polaridad negativa, la cual se ha demostrado que está formada de 8 segmentos. Los viriones son pleomórficos, tienden a presentar una forma esférica y su diámetro varía de 80 a 120 nm, las formas filamentosas pueden medir de 400 hasta 800 nm de largo, pero en su parte ancha generalmente no exceden los 120 nm. En los aislamientos realizados en embrión de pollo los virus generalmente presentan un mayor grado de agregación y pleomorfismo. El virus presenta en su superficie proyecciones que miden de 10 a 12 nm de largo, correspondientes a la neuroaminidasa (N) y a la hemoaglutinina (H); debido a esta última, la familia de estos virus posee la característica de aglutinar espontáneamente los glóbulos rojos de pollo.



La reacción de hemoaglutinación fue descubierta en 1941 por Hirst y McClelland-Hare (21). Esta reacción es de gran importancia práctica y teórica ya que proporciona un método simple para la detección y la valoración cuantitativa de los ortomixovirus. La inhibición de la hemoaglutinación proporciona una prueba altamente específica para la determinación de anticuerpos y mediante esta prueba fue posible conocer el mecanismo de infección de las células huésped, ya que los puntos receptores para el virus en los glóbulos rojos resultaron ser los mismos que los localizados en las células huésped sensibles; estos receptores son mucoproteínas que poseen un grupo ácido N-acetilneuramínico terminal (NANA). La adsorción del virus conduce a la liberación de NANA por una enzima vírica, la neuraminidasa; con ello, los glóbulos rojos se convierten en inaglutinables y las mucoproteínas solubles existentes en las secreciones respiratorias dejan de reaccionar con el virus (14,19).

Tanto la hemoaglutinina como la neuraminidasa sufren variaciones antigénicas; por esta razón, la Organización Mundial de la Salud ha propuesto las siguientes características para su identificación: tipo, especie y lugar de origen, número de serie (cuando exista), año de aislamiento y naturaleza antigénica de la hemoaglutinina, de la que existen 13, y de las 9 neuraminidasas (4,5,6,8,11,13,14,16,23).

Los ortomixovirus son relativamente estables a pH de 7.0 a 8.0, pero son lábiles a pH alcalino y pH ácido, formaldehído, beta-propiolactona, agentes oxidantes y luz ultravioleta. Su termoestabilidad es variable, dependiendo de cada cepa, algunas cepas sobreviven hasta por 6 horas a 56 C, así mismo su infectividad es relativamente lábil cuando se conserva a -15 o -4 C, pero a -70 C su infectividad se mantiene por periodos prolongados. Al igual como ocurre con todos los virus envueltos, los ortomixovirus son muy sensibles a la inactivación por solventes orgánicos (3,5,6,8,11,14,16,17,19,22,23,32,35,36).

Debido a que los ortomixovirus se replican típicamente en tracto respiratorio y digestivo, para su aislamiento se utilizan preferentemente exudados de vías respiratorias altas o isopos cloacales durante los tres primeros días de la infección, aunque pueden aislarse de aves muertas. En el caso de infecciones sistémicas causadas por cepas de alta virulencia el aislamiento se puede realizar virtualmente de cualquier órgano, debido a que alcanza niveles muy altos durante la viremia.

El aislamiento de los ortomixovirus comúnmente se realiza en: 1) huevos embrionados de pollo libres de patógenos específicos (SPF) de 10 a 11 días de edad y 2) cultivos celulares; las líneas celulares comúnmente utilizadas son la PRMK y Hep2C. El aislamiento en huevos embrionados se realiza con mayor frecuencia.

Una vez que se ha realizado el aislamiento de un ortomixovirus éste puede ser identificado por varios métodos: 1) Inmunofluorescencia, 2) Métodos serológicos y 3) Propiedades fisicoquímicas.

### **1.- Inmunofluorescencia:**

Esta técnica se basa en que ciertos compuestos fluorescentes (por ejemplo fluoresceína, rodamina) pueden insertarse por covalencia a las moléculas globulínicas, haciéndolas visibles mediante el empleo de luz ultravioleta en el microscopio de fluorescencia.

### **2.- Métodos serológicos**

Estos métodos resultan ser un camino rápido y económico para la identificación de los ortomixovirus, ya que se cuenta con antisueros específicos y cepas de referencia. Los métodos que con mayor frecuencia se utilizan son: inhibición de la hemoaglutinación, precipitación en agar y virus-neutralización.

*Inhibición de la hemaglutinación:* Esta reacción forma la base de varias pruebas diagnósticas para las infecciones virales, ya que muchos virus aglutinan a los eritrocitos y esta reacción puede ser inhibida por anticuerpos específicos.

*Precipitación en agar:* Con esta prueba se da una evidencia cualitativa de la reacción antígeno-anticuerpo sobre un agar semisólido y además indica si están presentes uno o varios sistemas antígeno-anticuerpo (6,13,14,17,24,28.).

*Seroneutralización:* Los anticuerpos neutralizantes se pueden evaluar mediante la inoculación de una mezcla de suero con una suspensión de virus en cultivos de células susceptibles. La presencia de anticuerpos neutralizantes se demuestra si los cultivos celulares no desarrollan efecto citopático. En algunos casos, la mezcla de virus-suero, puede inocularse en animales susceptibles de experimentación o huevos embrionados. La protección del huésped de los efectos virales demuestra los anticuerpos neutralizantes.

La cantidad de estos anticuerpos se puede determinar empleando una concentración constante de virus y diluciones de suero. Para poder establecer el diagnóstico se debe demostrar un aumento significativo en el título de anticuerpos durante el curso de la infección.

*Virus-neutralización:* Se mezcla una cantidad constante de un suero de referencia específico con diluciones del virus en estudio y se inoculan embriones o cultivos celulares. El logaritmo de la  $DL_{50}$  del virus testigo menos el logaritmo de la mezcla suero-virus es igual al logaritmo del índice de neutralización. El antilogaritmo de esta diferencia es igual al índice de neutralización.

### **3.- Propiedades fisicoquímicas**

Cuando no se cuenta con materiales de referencia tales como cepas o sueros, la identificación de los ortomixovirus se puede realizar mediante la determinación de sus características físicas y químicas, esto es, en base al tipo de ácido nucleico, al tamaño del virión, resistencia a solventes orgánicos y estudiando su relación antigénica con otros virus (6).

## **JUSTIFICACION**

Es necesario tener un conocimiento completo y preciso de la etiología del problema respiratorio que se presentó en una explotación avícola, del municipio de Valle de Bravo de diciembre de 1993 a abril de 1994, para poder desarrollar medidas encaminadas a su control y a disminuir las pérdidas económicas a otras explotaciones avícolas.

## **HIPOTESIS**

En el problema respiratorio que se presentó recientemente en la explotación avícola muestreada se encuentran involucrados uno o varios virus con afinidad por tracto respiratorio.

## **OBJETIVOS**

-Aislamiento y caracterización de los virus involucrados

-Caracterización y determinación de la virulencia del virus aislado en aves susceptibles.

-Establecimiento de las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación e inmunofluorescencia con la finalidad de realizar el diagnóstico de la influenza aviar en el Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.

## MATERIAL Y METODOS

**RECOLECCION DE MUESTRAS:** Se seleccionaron diez aves de 8 semanas de edad, provenientes de una parvada afectada por el problema en cuestión. Estas aves se mostraban tristes y presentaban como características comunes los orificios nasales con presencia de exudado catarral y estertores traqueales. Las aves se sacrificaron por dislocación cervical y se tomaron las tráqueas en forma aseptica.

**AISLAMIENTO DE LOS VIRUS INVOLUCRADOS:** Con la ayuda de un bisturí estéril, y en condiciones asepticas se realizó un raspado traqueal. El raspado obtenido de las 10 tráqueas recolectadas se suspendió en diez volúmenes de caldo nutritivo (DIFCO), posteriormente se centrifugó a 2,000 g durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana millipore con poro de 0.22  $\mu$ m y se colocó en un tubo estéril; se le agregaron 1,000 UI de penicilina y 1 mg de estreptomicina por cada mililitro. Una vez realizado esto, se inocularon 40 embriones SPF de la línea Hy Vac de 9 días de edad por vía cavidad alantoidea con 0.1 ml del material sospechoso, los embriones fueron observados a través de un ovoscopio a las 24 horas posteriores a la inoculación, descartándose los embriones muertos, considerándolos muertos por traumatismo. Los embriones se revisaron nuevamente a las 48 horas posteriores a la inoculación y esta vez se tomó el líquido alantoideo y amniótico de los embriones muertos, al líquido así obtenido se le realizó la prueba de hemoaglutinación, con glóbulos rojos de ave al 3%.

### A.- IDENTIFICACION DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA:

Con material de los embriones que no murieron se realizaron cuatro pases ciegos. Los embriones que murieron 6 días después de la inoculación en el cuarto pase y que se observaron con enanismo, enroscados en forma de ovillo y con inflamación del



mesonefro se utilizaron para la identificación del virus de la bronquitis infecciosa. Para obtener células de la membrana coriolantoidea, se colectó esta membrana con líquido alantoideo en un volumen igual de solución salina fisiológica estéril y se sometió a una agitación suave por 5 minutos, posteriormente se centrifugó el líquido a 1000 g durante 10 min. Se realizaron frotis del paquete celular, para realizar la identificación del virus de la bronquitis infecciosa mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales\*.

#### B.- IDENTIFICACION DE UN VIRUS HEMOAGLUTINANTE AISLADO CON EL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA.

DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DE LA HEMOAGLUTININA DEL VIRUS SOMETIDO AL TRATAMIENTO CON 0.2% DE FORMOL PARA REALIZAR EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL CON ADENOVIRUS: El material infectante se colocó en tubos pequeños de plástico y se comprobó su poder hemoaglutinante, posteriormente se agregó 0.2% de formol y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, y después se evaluó su capacidad hemoaglutinante a 1, 2, 6, 24, 48 y 72 horas (19).

INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION: La prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI) se realizó utilizando como antígeno el virus aislado y el procedimiento utilizado fue el sistema B.

\* Proporcionados por el MVZ. Angel Retana.

DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DE LA HEMOAGLUTININA DEL VIRUS SOMETIDO AL TRATAMIENTO CON CALOR PARA REALIZAR EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL CON PARAMIXOVIRUS TIPO 2 y 3: Se titularon las unidades hemoaglutinantes del material infectante antes de someterlo al tratamiento con calor, después se colocó en baño de agua a 56 C y se retituló a los 15 y 30 minutos (26).

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DEL VIRUS AISLADO CON EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE: La diferenciación se realizó de la siguiente manera: 1) Virus neutralización, 2) Seroconversión de aves desafiadas y 3) Desafío de aves expuestas a este virus con una cepa virulenta de la enfermedad de Newcastle.

1) Virus-neutralización: Esta prueba utiliza un suero específico contra el virus de la enfermedad de Newcastle. Se incubó una cantidad constante de suero con diluciones del virus y posteriormente se tomó una cantidad de la mezcla para inocular huevos embrionados de 9 días de edad. Se observó si la multiplicación del virus era inhibida por el suero específico.

2) Seroconversión de aves desafiadas: Se inocularon 10 aves de 4 semanas de edad susceptibles a la enfermedad de Newcastle por vía intramuscular con 300 000 DLEP<sub>50</sub> del virus hemoaglutinante, 15 días después se realizó una prueba de HI para determinar anticuerpos contra el virus de Newcastle y contra este virus.

3) Desafío con una cepa virulenta de la enfermedad de Newcastle de aves previamente inoculadas con el virus hemoaglutinante: Se inocularon 10 aves de 4 semanas de edad susceptibles a la enfermedad de Newcastle por vía intramuscular con 300 000 DLEP<sub>50</sub> del virus hemoaglutinante aislado, 21 días después de ser inoculadas.

las aves fueron desafiadas por vía ocular con una gota de un aislamiento patógeno de la enfermedad de Newcastle. En forma simultánea se desafiaron 10 aves que habían sido vacunadas 21 días antes con una vacuna de virus activo de Newcastle cepa La Sota por vía ocular.

**INOCULACION DE CULTIVOS CELULARES:** El líquido alantoideo que hemoaglutinó glóbulos rojos de ave se inoculó en un cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo y células Hep2C. Los cultivos celulares fueron examinados a partir de las 24 horas hasta nueve días posteriores a la inoculación, y con aquellos que presentaron un efecto citopático se realizó la prueba de hemoadsorción.

**TITULACION DEL VIRUS:** El virus contenido en el líquido alantoideo o sobrenadante del cultivo celular se tituló en embriones de pollo SPF por el método de Reed y Muench para determinar la dosis letal embrión de pollo 50% (DLEP<sub>50</sub>) (10).

**ESTABILIDAD ANTE SOLVENTES ORGANICOS:** El líquido alantoideo infeccioso se colocó en un tubo con cuatro volúmenes de éter o cloroformo, se agitó enérgicamente y se mantuvo a 4 C durante 18 horas. Posteriormente esta mezcla fue centrifugada a 2000 g durante 5 minutos; la fracción acuosa resultante se utilizó para titular el virus.

**ESTABILIDAD A pH 3.0:** El material infectante fue diluido 1:10 en caldo nutritivo\*, se ajustó el pH a 3.0 con una solución 0.1 N de ácido clorhídrico y se mantuvo a 4 C durante 18 horas, una vez cumplido este periodo se realizó la titulación viral.

\* (DIFCO)

**ESTABILIDAD FRENTE A LA CONGELACION Y DESCONGELACION:** El material infectante se colocó en un criotubo y se congeló a  $-70\text{ C}$  durante una hora y después se descongeló en un baño de agua a  $37\text{ C}$  por dos minutos, este proceso se repitió cinco veces. El fluido sometido a este tratamiento se tituló inmediatamente.

**ESTABILIDAD ANTE CATIONES DIVALENTES:** El material infectante fue diluido 1:10 con agua destilada, esta dilución fue mezclada con un volumen igual de una solución 2 M de sulfato de magnesio y posteriormente se colocaron en baño de agua a  $50\text{ C}$  durante 30 minutos. Las muestras tratadas se titularon.

**EFFECTO DE LA 5-iodo-2'-desoxiuridina (IUDR) SOBRE LA REPLICACION:** El tipo de ácido nucleico del virus fue determinado indirectamente empleando la IUDR; para este fin se utilizaron cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo. Del líquido alantoideo que contenía al virus se realizó una dilución 1:10 en medio de mantenimiento, el cual contenía 0.05 mg/ml de IUDR. Cada cultivo celular se cubrió con 0.4 ml del virus diluido, se incubó a  $37\text{ C}$  durante 1 hora y se lavó tres veces con 3 ml de medio de mantenimiento conteniendo IUDR en la concentración anteriormente mencionada. Después se agregó a cada cultivo 5 ml de medio de mantenimiento que contenía IUDR, se reincubó a  $37\text{ C}$  y a las 24 y 72 horas se tomaron muestras de 0.5 ml a cada uno de los cultivos infectados. Las muestras así obtenidas se centrifugaron inmediatamente a 2000 g durante 5 minutos y el sobrenadante se congeló a  $-70\text{ C}$  para titularlo posteriormente. Esto se realizó por duplicado. También se utilizaron cultivos celulares como controles de referencia de la prueba, los cuales se cubrieron con 0.4 ml del virus diluido y no se les agregó IUDR.

**IDENTIFICACION DEL VIRUS DE LA INFLUENZA DEL GRUPO A:** La identificación se realizó empleando la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Con este propósito se agregó 2% de tripsina al líquido alantoideo que contenía al virus, con el cual se cubrieron los cultivos celulares de la línea Hep2C, se incubaron a 37 C durante 1 hora, se les agregó medio de mantenimiento y se reincubaron. Cuando se observó efecto citopático se obtuvo el líquido sobrenadante y se desprendieron las células que aún se encontraban adheridas al frasco por tripsinización, luego se mezcló el líquido sobrenadante y la tripsina que contenía a las células, para centrifugarlas a 2000 g durante 30 minutos. El paquete celular obtenido se resuspendió en 2 ml de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Después sobre un portaobjetos se colocaron seis gotas de esta suspensión celular, se fijaron con acetona durante 5 minutos, se cubrieron con anticuerpos monoclonales específicos para el grupo influenza A y se incubaron a 37 C durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron las laminillas con PBS, se cubrieron nuevamente con un anti-anticuerpo específico conjugado con isotiocianato de fluoresceína y se volvió a incubar durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se lavaron las laminillas con PBS y finalmente se observaron en un microscopio de inmunofluorescencia.

**MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION:** Se incubó una suspensión de glóbulos rojos de ave al 3% con el virus de la influenza para verificar la hemoaglutinación. La suspensión se centrifugó a 2000 g durante 20 minutos, el paquete celular que se formó en el fondo se resuspendió en solución salina fisiológica, este lavado se hizo 3 veces y por último se formó una suspensión al 0.1% de glóbulos rojos. Se tomó una rejilla de 400 perforaciones y se cubrió con la suspensión de glóbulos rojos. Posteriormente se hizo una tinción negativa con ácido fosfotúngstico. Las observaciones y las microfotografías se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL 1200 EX).

**DETERMINACION DE LA PATOGENICIDAD MEDIANTE EL DESAFIO INTRAVENOSO DE AVES SUSCEPTIBLES:** Mediante la técnica de HI se verificó que un grupo de 10 aves de 7 semanas de edad no tenían anticuerpos contra el virus de la influenza; estas aves fueron inoculadas por vía intravenosa con 300 000 DLEP<sub>50</sub> y se mantuvieron en observación durante 10 días. El criterio que se utilizó para evaluar la virulencia se basa en la capacidad para producir mortalidad y signos en las aves inoculadas, clasificándolo como virus de influenza aviar altamente virulento cuando mata al 80% o más de las aves inoculadas en menos de 10 días; los demás virus que no son capaces de producir esta mortalidad se deben denominar virus de influenza aviar. Dentro de este grupo se clasifican los virus de virulencia intermedia, los cuales son capaces de matar menos del 80% de las aves inoculadas, y los virus de baja virulencia, que son capaces de matar del 10 al 20% de las aves inoculadas y los apatógenos son considerados aquéllos que únicamente son capaces de producir signos respiratorios.

**ELABORACION DE UN CONJUGADO DE FLUORESCENCIA PARA DETECTAR VIRUS DE LA INFLUENZA A MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA:** Se preparó un conjugado con fluorocromo para determinar la presencia del virus de la influenza en los tejidos.

Cinco conejos Nueva Zelanda blancos se inmunizaron bajo el siguiente esquema: el primer día se inocularon 800 000 DELP<sub>50</sub> por vía intramuscular, al día cinco se aplicó 1 ml de una vacuna emulsionada con 22% de antígeno por vía intramuscular, al día 12 se inocularon 400 000 DELP<sub>50</sub> por vía intravenosa, al día 22 se realizó la prueba de HI. Aquellos conejos en que se obtuvieron los títulos más altos se sangraron a blanco y se determinaron los títulos de anticuerpos por medio de la prueba de seroneutralización. La precipitación de la fracción de gammaglobulinas se realizó con una solución saturada de sulfato de amonio; dicha fracción se dializó y después se conjugó

con isotiocianato de fluoresceína. El conjugado obtenido se evaluó mediante la preparación de inmunofluorescencia directa en cultivo de células Hep2C infectadas con el virus de la influenza y de células traqueales obtenidos apartir de aves infectadas experimentalmente. Las pruebas de inmunofluorescencia directa fueron comparadas con pruebas de inmunofluorescencia indirecta realizadas con anticuerpos monoclonales\*.

**CLASIFICACION SEROLOGICA, DETERMINACION DE LA VIRULENCIA Y SECUENCIACION DE LOS AMINOACIDOS DE LA HEMOAGLUTININA:** Para la clasificación serológica, determinación de virulencia y secuenciación de los aminoácidos de la hemoaglutinina, el líquido alantoideo con virus de influenza fue remitido a la Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales, quienes a su vez remitieron al "National Veterinary Service Laboratory" ubicado en Ames, Iowa, E. U. A.

\* (Baxter)

## **RESULTADOS.**

**ASLAMIENTO DE LOS VIRUS INVOLUCRADOS:** Después de inocular los embriones se obtuvieron 32 muertos a las 48 horas, que presentaban hemorragias en el cuerpo y la cabeza. El líquido alantoideo aglutinó los glóbulos rojos de ave en 3 minutos, aunque la elución no se pudo apreciar siete horas después.

**ASLAMIENTO DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA:** Se realizaron pases ciegos de siete embriones hasta el cuarto pase, cuando se observaron embriones en forma de ovillo, con enanismo y presencia de uratos en el mesonefro.

**DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA:** Se observó fluorescencia positiva en los frotis realizados para la identificación del virus de la bronquitis infecciosa.

**DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA HEMOAGLUTININA DEL VIRUS SOMETIDO AL TRATAMIENTO CON 0.2% DE FORMOL PARA REALIZAR EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL CON ADENOVIRUS:** Cuando el material infectante se trató con 0.2% de formol no perdió su poder hemoaglutinante ni aun después de 72 horas en que se realizó la última lectura.

**INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION:** Fue posible detectar anticuerpos contra el virus hemoaglutinante cuando las aves estuvieron en contacto con este virus.



**DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DE LA HEMOAGLUTININA DEL VIRUS SOMETIDO AL TRATAMIENTO CON CALOR PARA REALIZAR EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL CON PARAMIXOVIRUS TIPOS 2 Y 3:** El material infectante presentó 32 UHA/ml en un principio, a los 15 minutos de incubación continuó presentando 32 UHA/ml y a los 30 minutos de incubación ya no se detectó poder hemoaglutinante.

**DIAGNOSTICO DIFERENCIAL CON EL VIRUS DE NEWCASTLE:**

**1) Virus neutralización:** El virus hemoaglutinante no fue neutralizado por el antiseroo contra el virus de la enfermedad de Newcastle.

**2) Seroconversión de aves desafiadas:** Quince días posteriores a su inoculación se realizó una prueba de inhibición de la hemoaglutinación, no se detectaron anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle y se obtuvo un título de 1280 para el caso del virus en estudio.

**3) Desafío de aves con una cepa virulenta de la enfermedad de Newcastle.** Cuando aves que habían sido inoculadas previamente con el virus hemoaglutinante fueron desafiadas con el virus de la enfermedad de Newcastle, todas murieron 5 días más tarde, mientras que las aves que habían sido vacunadas contra la enfermedad de Newcastle sobrevivieron al desafío.

**INOCULACION DE CULTIVOS CELULARES:** Los cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo que fueron inoculados con el material infectante presentaron efecto citopático a las 24 horas. Las células Hep2C presentaron efecto citopático 9 días posteriores a su inoculación. Ambos cultivos fueron capaces de adsorber glóbulos rojos de ave.

**TITULACION DEL VIRUS:** El líquido obtenido del aislamiento primario después de haber sido filtrado por una membrana con poro de 220 nm presentó un título de  $10^{6.6}$  DLEP 50/ml.

**ESTABILIDAD ANTE SOLVENTES ORGANICOS:** El virus hemoaglutinante no fue recuperado en los embriones inoculados con el material original, demostrando ser sensible a los solventes orgánicos (Cuadro 3).

**ESTABILIDAD A pH 3.0:** El virus hemoaglutinante mostró ser sensible al pH 3.0, ya que no logró multiplicarse en los embriones inoculados con el virus sometido a este tratamiento (Cuadro 3).

**ESTABILIDAD ANTE LA CONGELACION Y LA DESCONGELACION:** Se demostró que el virus hemoaglutinante es resistente a la congelación y la descongelación, ya que el título obtenido de la muestra sometida a este tratamiento fue de  $10^{6.27}$  DLEP 50 / ml (Cuadro 3).

**ESTABILIDAD ANTE CATIONES DIVALENTES:** El título obtenido en las muestras sometidas a este tratamiento fue de  $10^{1.8}$  DLEP 50 / ml (Cuadro 3).

**EFECTO DE LA 5-iodo-2'-desoxiuridina sobre su replicación:** No se observó ningún efecto sobre su replicación, por lo cual se determinó que se trata de un virus ARN.

**RELACION ANTIGENICA CON EL GRUPO A DEL VIRUS DE LA INFLUENZA:** En la prueba de inmunofluorescencia indirecta se pudo observar fluorescencia en el citoplasma de las células, por lo cual se determinó que es un virus de la influenza A.

**MICROSCOPIA ELECTRONICA:** Las partículas observadas fueron pleomórficas, aproximadamente esféricas, con un diámetro exterior de alrededor de 110 nm y un centro interno denso al paso de los electrones, de 70 nm. Además de las formas esféricas existen partículas alargadas que poseen las mismas proyecciones de la superficie (figuras 1 y 2).

**DETERMINACION DE LA PATOGENICIDAD MEDIANTE EL DESAFIO INTRAVENOSO DE AVES SUSCEPTIBLES:** No se observaron signos clínicos, por lo que se determinó que se trata de un virus de influenza aviar (avirulento) y no de un virus de influenza aviar altamente virulento.

**ELABORACION DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES PARA EL DIAGNOSTICO DE INFECCION POR VIRUS INFLUENZA A:** El título más alto en la prueba de HI fue de 20480 y el suero que se obtuvo de este animal presentó un índice de virus neutralización de 3.8 y el título del conjugado fue 1000. Además se observaron células con citoplasma fluorescente tanto en las células de cultivo Hep2C como en las células traqueales obtenidas de las aves infectadas; las observaciones fueron similares a las obtenidas con los anticuerpos monoclonales.

**CLASIFICACION SEROLOGICA, DE VIRULENCIA Y SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA HEMOAGLUTININA:** Los resultados reportados por la Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales fueron textualmente de la siguiente manera:

Investigación CPA No:	294-94
Especie muestreada:	Ave
No. de muestras:	1 Líquido alantóideo



## DISCUSION

Los virus que con mayor frecuencia infectan las vías respiratorias de los pollos son los paramixovirus, coronavirus, herpesvirus, ortomixovirus y adenovirus. Dentro de los paramixovirus, el que comunmente se presenta es el virus de la enfermedad de Newcastle, de los coronavirus es el virus de la bronquitis infecciosa, de los herpesvirus es el virus de la laringotraqueitis infecciosa y del grupo de los ortomixovirus se encuentra el virus de la influenza A (4,7).

Influeza aviar es el nombre común que se asigna a la infección que ocurre en especies aviares tanto domésticas como silvestres y que es producida por cualquiera de las variantes antigénicas del virus tipo A del género Influenza (16,19).

Así como Bankowski y col. en 1967 (4) demostraron la presencia de más de un agente viral en un cuadro clínico, en este trabajo se logró demostrar la presencia de dos agentes virales en parvadas de pollo de engorda que presentaron un cuadro clínico respiratorio en el Municipio de Valle de Bravo de diciembre de 1993 a marzo de 1994. El primer agente viral que se identificó en las tráqueas recolectadas de aves afectadas, fue el virus de la bronquitis infecciosa, esta conclusión esta basada en la observación de enanismo embrionario en forma de ovillo y presencia de uratos en el mesonefro de los embriones inoculados con material obtenido de las tráqueas recolectadas (6,13,19,22,27). La confirmación de la presencia de este virus fue mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales, la cual es altamente específica (6,12). El líquido alantoideo obtenido de los embriones inoculados mostró poder hemaglutinante, lo cual indicó la presencia de otro agente viral (6,11,13,19).

Dentro de los virus hemoaglutinantes que afectan las vías respiratorias de las aves, se encuentran los paramixovirus, algunos adenovirus, coronavirus y los ortomixovirus (16). Para lograr clasificar y caracterizar al virus hemoaglutinante se realizaron varias pruebas con el material aislado.

El agente viral hemoaglutinante no presentó el fenómeno de elución, lo que podría interpretarse erróneamente como que este virus careciera de neuroaminidasa, pero mediante pruebas serológicas se demostró que sí posee neuroaminidasa. Cabe señalar que en el examen realizado mediante la microscopía electrónica de transmisión se pudo apreciar la adherencia del virus a los eritrocitos después de 72 horas de iniciada la reacción de hemoaglutinación (figura 2). Su poder hemoaglutinante permaneció estable al tratarlo con 0.2% de formol durante 30 minutos, lo que es sugestivo de que no se trata de un adenovirus, ya que el poder hemoaglutinante de los virus de esta familia que producen problemas respiratorios no resisten este tratamiento (16). El agente viral hemoaglutinante presentó estabilidad de su poder infectante ante la congelación y descongelación y al tratamiento con cationes divalentes, sin embargo al tratarlo con solventes orgánicos el virus perdió su poder infectante, dando así la evidencia de que posee una envoltura (3,13,15). Esta envoltura se observó mediante el estudio de microscopía electrónica de transmisión (figuras 1 y 2) (15). El virus perdió su infectividad al tratarlo con pH 3.0. No fue inhibida su replicación al estar en contacto con la 5-iodo-2' desoxiuridina, lo cual indicó presencia de ARN en el genoma del virus (6). Al someter el virus a 56 °C durante 30 minutos se destruyó su infectividad, pero ésta se logró estabilizar al añadir sulfato de magnesio 1 M. Esto fue demostrado anteriormente por Franklin en 1959 y Laver en 1963, entre otros (23). En el examen de microscopía electrónica de transmisión los viriones se observaron pleomórficos y de un tamaño aproximado de 80 a 120 nm., con proyecciones de 8 a 12 nm en toda la superficie, esta morfología es ampliamente descrita en la literatura como característica de los ortomixovirus (14,15,19,23,24,30). El virus hemoaglutinante no presentó relación antigénica con el paramixovirus tipo 1, lo cual fue demostrado mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación en sueros obtenidos de aves previamente inoculadas con el virus hemoaglutinante. Las mismas aves fueron desafiadas con una cepa virulenta del virus de la enfermedad de Newcastle (paramixovirus tipo 1), produciéndose el 100%

de mortalidad, mientras que aves que habían recibido una dosis vacunal del virus de la enfermedad de Newcastle sobrevivieron al desafío (2,9,12,13,14,19,23). Por todas sus propiedades biogénicas, el virus fue clasificado como un ortomixovirus, pero también se utilizó la prueba de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales contra los virus influenza tipos A, B y C, obteniéndose únicamente fluorescencia positiva contra el grupo A, lo que resulta concluyente (6,12)

El cuadro clínico reportado en este trabajo no coincide con lo reportado por otros investigadores (Hinslaw y col.; 1982 (20), Alexander y col.; 1982 (1) y Eckroade y col; 1987 (17). Esta diferencia puede atribuirse a factores del medio ambiente, enfermedades concomitantes, estado fisiológico, sexo y a la variedad de razas y edades. Sin embargo las observaciones morfológicas realizadas en este trabajo coinciden con las reportadas por Murphy al tratar un caso de influenza aviar en 1987 (29) y por Kingsbury en 1990 (24).

Por otra parte, cuando se inocularon aves susceptibles con la metodología descrita en 1991 por Beard (8) para determinar su virulencia, se observó que se trata de una cepa avirulenta, lo cual coincide con los resultados de la prueba de virulencia realizada por The National Veterinary Service Laboratory en Ames, Iowa, E.U.A. para la misma cepa. Una de las pruebas existentes para evaluar su patogenicidad es el desafío intravenoso de aves susceptibles; si el virus produce el 80% de mortalidad o más se considera que se trata de una cepa virulenta. "The U.S. Animal Health Association" en 1987 (33) sugiere descartar los términos de "apatógenos y baja patogenicidad" y designarlos únicamente como "influenza aviar" o "influenza aviar de alta patogenicidad". En este estudio se observó que cuando se inocularon aves susceptibles mostraron signos respiratorios apenas perceptibles, sin mostrar mortalidad, por lo que designamos a este padecimiento como "influenza aviar" en coinfección con el virus de la bronquitis infecciosa.

## CONCLUSIONES

Se aisló el virus de la influenza A.

El virus se aisló apartir de aves que tenían una infección concomitante del virus de la influenza A y el virus de la bronquitis infecciosa.

La prueba de inhibición de la hemoaglutinación con el sistema B es una prueba adecuada para detectar anticuerpos contra el virus de la influenza aislado en este trabajo.

Se puede detectar la presencia del virus de la influenza A en tejidos por medio de la prueba de inmunofluorescencia.

De las aves muestreadas se aisló el virus de la bronquitis infecciosa en el cuarto pase, lo que es indicativo de una cepa no vacunal de bronquitis infecciosa.

La serotipificación del virus de la influenza aislado en el presente trabajo se realizó mediante la prueba de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales

En el estudio de microscopia electrónica de transmisión los viriones se observan pleomórficos y miden de 80 a 120 nm con proyecciones de 8 a 12 nm en toda la superficie.



## BIBLIOGRAFIA

1. Alexander, D.J. Avian Influenza: Recent developments. Yer Bull., 52: 341-359 (1982)
2. Allan, W. H., Lancaster, J. E. and Toth., B. Newcastle disease vaccines, their production and use. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Series, No. 10 Rome. 1978.
3. Andrews, C., and Horstmann, D. The susceptibility of viruses to ethyl ether. J. Gen. Microbiol., 3: 290-296. (1946).
4. Bankowski, R.A. Conrad, R.D. and Reynolds, B.. Avian influenza A and paramyxoviruses complicating respiratory disease diagnosis in poultry. Avian Dis., 259-277. (1967)
5. Beard, C.W. Avian influenza overview. Proceedings of the 28th National Meeting on Poultry Health and Processing. 1-3. (1993).
6. Beaud, C. W. Influenza. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3rd ed. American Association of Avian Pathologists. 1990.
7. Beard, C. W., Brugh, M. and Webster G. R. Emergence of amantadine-resistant H5N2 avian influenza virus during a simulated layer flock treatment program. Avian Dis. 31:533-537 (1987).

8. **Beard, C. W., and Helfer, D. H.** Isolation of two turkey influenza viruses in Oregon. Avian Dis., 16: 1133-1137. (1972).
9. **Brugh, M. A.** Simple method for recording and analyzing serological data. Avian Dis., 22: 362-365. (1978).
10. **Cambell, J. M. and Cambell, J. B.** Laboratory mathematics: medical and biological applications, 3rd ed. The C. V. Mosby Co. St. Louis, Mo. 1984.
11. **Castro A. E., Peter, D., Webster, R. G., Reynolds, B., Anderson, M. L. and Lozano L.F.** Aislamiento e identificación de una cepa del virus de la influenza avar/codorniz/california/4794/90 (H4 N6), antigénicamente similar al A/pato/czechoslovaco/56 (H4 N6), en una parvada de codornices en California. Proceedings of the 40th Western Poultry Disease Conference. 42-43 . (1991).
12. **Cottral, G. E. Ed.** Manual of standardized methods for veterinary microbiology. National Academy of Sciences, National Research Council, Washington, D.C., 731. 1978 .
13. **Cunningham, C. H.** A laboratory guide in virology. 7th ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN. 1973.
14. **Davis, B. D. Dubelcco, R., Eisen H. N. y Ginsberg H. S.** Tratado de Microbiología. 3a ed. Salvat. 1984
15. **Doane, F. W. and Anderson, N.** Electron microscopy in diagnostic virology. Cambridge University Press, New York. 1987.

16. **Easterday, B.C. and Hinshaw, V. S.** Influenza. In: *Diseases of Poultry*, 9th ed. B. W. Claneck, H. J. Barnes, C. W. Beard, W. M. Reid and H. W. Yorder Jr. eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 1991.
- 17.- **Eckroade, R. J, Silverman-Bhachin L.A.** Avian influenza in Pennsylvania. The beginning. *Proceedings 2nd International Symposium Avian Influenza*, pp. 22-32 US. Animal Health Association, Athens, GA: (1987).
18. **Franklin, 1959** citado por **Jawets, E., Melnick, J. L. y Adelber, E. A.** *Manual de Microbiología Médica* 8a ed. El Manual Moderno. 1979.
19. **Hawkes, R. A.** General principles underlying laboratory diagnosis of viral infections. In: *Diagnostics procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*, 5th ed. E. H. Lennette and N: j. Schmidt, eds. American Association, Washington, D. C. 1-48. 1979.
20. **Hinshaw, V. S., Webster R. G.** The natural history of influenza A viruses. In: *A.S. Beare (ed). Basic and Applied Influenza Research*, pp. 79-104. CRC. Press, Inc., Boca Raton, FL. 1982.
20. **Hirst y McClelland-Hare, 1941** citado por **Jawets, E., Melnick, J. L. y Adelber, E. A.** *Manual de Microbiología Médica* 8a ed. El Manual Moderno. 1979.
22. **Hitchner, S. B** Virus propagation in embryonating eggs. In: *Isolation and identification of avian pathogens*. S. B. Hitchner, C. H. Domermuth, II. G. Purchase and J. E. Williams, eds. American Association of Avian Pathologists, College Station, Texas. 120-121. 1980.

23. **Jawets, E., Melnick, J. L. y Adelber, E. A.** Manual de Microbiología Médica 8a ed. El Manual Moderno. 1979.
24. **Kingsbury, D. W.** Orthomyxoviridae and their replication. In: Fundamental Virology, 2nd ed. Fields, B. N. and Knipe, D. M. Raven Press New York. 1990.
25. **Laver 1963** citado por **Jawets, E., Melnick, J. L. y Adelber, E. A.** Manual de Microbiología Médica 8a ed. El Manual Moderno. 1979.
26. **Lozano, L. F. and Castro A. E.** Comparison of the hemagglutination activity of parainfluenza virus 1, 2 and 3 and field isolates of NDV and PMV-2 after heat treatment. Proceedings of the 40th Western Poultry Disease Conference. 156-157. (1991).
27. **Lukert, P. D.** Virus identification and classification. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3rd edition. American Association of Avian Pathologists. 1990.
28. **Murgia, S. T., Casasola, F. J. Rosales, U. S., Nava, I. V. y Navarrete, N. S.** Brote de infección por virus sincicial respiratorio en una unidad de cuidados intensivos neonatales en la ciudad de México. Boletín del Hospital Infantil de México. 50 No. 10. (1993).
29. **Murphy, T. M.,** The control of avian influenza in Ireland. Proceedings 2nd International Symposium Avian Influenza, pp. 39-50 US. Animal Health Association, Athens, GA: (1987).
30. **Rovozzo, G. C., and Burke, C. N.** A manual of basic virological techniques. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. 1993.

31. Selmons, R. D., Cooper, R. S. and Osborn J. S. Isolation of type A influenza viruses from imported exotic bird. Avian Dis., 17: 746-751. (1973).
32. Subbarao, E. K., London, W. and Murphy B. R. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is determinant of host range. Journal of Virology. 67: 1761-1764. (1993).
33. Subcommittee of the USAHA (1988). Report of the Subcommittee on Reevaluation of the Definition of Avian Influenza and Establishing Criteria for Evaluation of Pathogenicity of Isolates. Proceedings 91st Annual Meeting of the USAHA, Salt Lake City, Utah. pp. 394-398. (1987)
34. Webster, R. G., Kawaoaka, Y., Bean W. J., Beard, C. W., and Brugh, M. Chemotherapy and Vaccination: A possible strategy for the control of highly virulent influenza virus. Journal of Virology. 55: 173-176. (1985).
35. Webster, R. G. and Campbell C. H. An inhibition test for identifying the neuraminidase antigen on influenza viruses. Avian Dis. 16: 1057-1066. (1972).
36. Webster, R. G., William, J. B. Gorman, O. T., Chambers, T. M. and Kawoaka, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiological reviews. 55: 152-179. 1992.

### **Cuadro 1**

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO A 56 C SOBRE EL PODER  
HEMOAGLUTINANTE DE LA CEPA A POLLO/ VALLE DE  
BRAVO/1994/ H5N2**

<b>TIEMPO (min.)</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>30</b>
<b>UNIDADES HEMOAGLUTINANTES</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>0</b>

## Cuadro 2

CAPACIDAD HEMOAGLUTINANTE DE LA CEPA  
A POLLO/ VALLE DE BRAVO/1994/ H5N2  
TRATADA CON 0.2% DE FORMOL

TIEMPO (hrs.)	1	2	6	24	48	72
HEMOAGLUTINACIÓN	+	+	+	+	+	+

### Cuadro 3

#### EFEECTO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS

SOBRE LA DLEP 50\* DE LA CEPA

A/POLLO/Valle de Bravo/1994/H5N2

TRATAMIENTO	TITULO DLEP 50	
	NO TRATADO	TRATADO
SOLVENTES ORGANICOS	10 <sup>6.6</sup>	0
pH 3.0	10 <sup>6.6</sup>	0
CONGELACION Y DESCONGELACION	10 <sup>6.6</sup>	10 <sup>6.27</sup>
CATIONES DIVALENTES	10 <sup>6.6</sup>	10 <sup>5.7</sup>

\*DLEP 50 : DOSIS LETAL EMBRION DE POLLO 50%



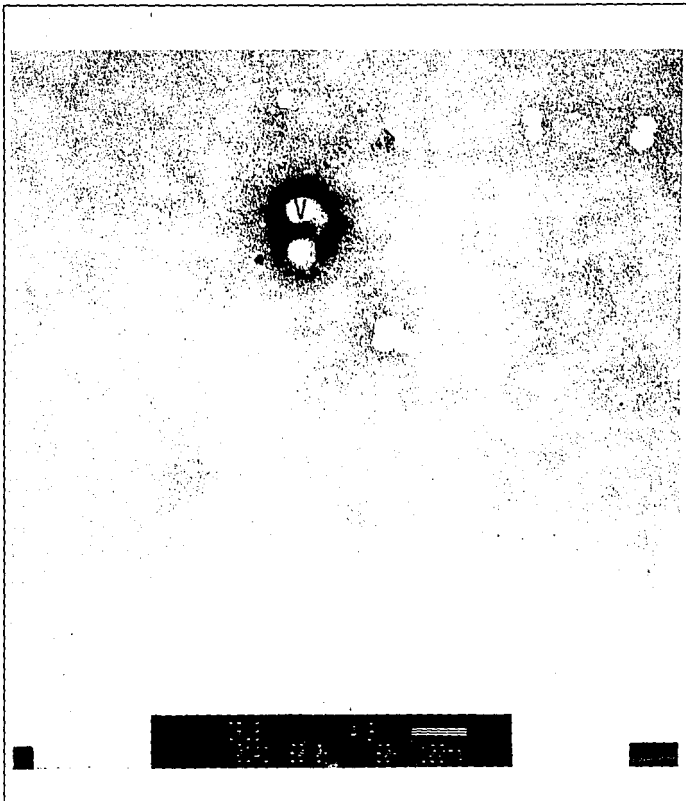


FIGURA 1. Microfotografía electrónica que muestra el virus de la influenza A (Cepa A/pollo/ Valle de Bravo/ 1994 H5N2) (v). Se pueden apreciar proyecciones cortas que cubren la superficie del virus (60,000x).



FIGURA 2. Microfotografía electrónica del virus de la influenza A (Cepa A/pollo/ Valle de Bravo/1994 H5N2) (v) adheridos a un eritrocito de ave (E), se aprecian partículas víricas filamentosas (L), las cuales no exceden de 100 nm en su parte más ancha (50,000x).