

26



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA PATOGENIA
DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR (H5N2)
ALTAMENTE PATOGENO: ENCEFALO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

MIRNA MARGARITA HERNANDEZ RODRIGUEZ

ASESORES: MVZ. MC. ALEJANDRO HERNANDEZ MAGDALENO
MVZ. MC. MARIA TERESA CASAUBON HUGUENIN
MVZ PhD. JUAN GARCIA GARCIA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2000

Not 30



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

UNIVERSIDAD NACIONAL
 AUTÓNOMA DE MÉXICO

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García M...
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de: Tesis

Contribución al estudio de la patogenia del virus de
Influenza Aviar (H5N2) altamente patógeno: Encéfalo.

que presenta la pasante: Hernández Rodríguez Mirna Margarita
 con número de cueda: 8703740-7 para obtener el TÍTULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 3 de Marzo de 2000

PRESIDENTE	MC. Raúl Mar Cruz	<i>[Signature]</i>
VOCAL	MC. Alejandro Martínez R.	<i>[Signature]</i>
SECRETARIO	PhD. Juan García García	<i>[Signature]</i>
PRIMER SUPLENTE	MVZ. Carlos Avila Arreola	<i>[Signature]</i> 7/11/00
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ Adriana Garulo Fuentes	<i>[Signature]</i> 13/03/00

DEDICATORIAS

A MIS GRANDES AMORES

A MI ESPOSO:

HUGO RAMIREZ ALVAREZ *Quien gracias a su amor y compañía brindada, por el tiempo de seguir a mi lado en las buenas y en las malas, por su ayuda desinteresada, por su paciencia, por su alegría. Gracias amor por aceptarme y quererme tal como soy, por tu comprensión, pero sobre todo por tu gran amor.*

A MI MADRE (qepd):

CRISTINA RODRIGUEZ ZARATE *Quien gracias a su ejemplo, me enseñó a enfrentarme a la vida, a quien de manera especial dedico todos mis logros ya que fueron gracias a su ayuda moral y económica. Gracias te doy Mamá por tus regaños, tus consejos, tu apoyo siempre incondicional, por tu amor infinito, pero por sobre todo por haberme dado la vida. Que allá donde estás recibas esta tesis como símbolo de mi eterno agradecimiento. Por que eres madre presente, futuro, verdad y gloria, tu no te has ido, yo soy tu historia.*

A MI NIÑO:

RAÚL A. ESPINOSA HERNÁNDEZ *Quien gracias a su alegría y jovialidad, a su inocencia y ternura, a sus travesuras y tristezas, me ha enseñado ha quererlo como a un hijo. Gracias por ser tu mi niño consentido y por llenarme de mucha alegría, que esta tesis te sirva como ejemplo para tu futuro como un triunfador.*

A MI BEBE:

A quién aún sin conocerlo, sin saber aun su sexo, ya lo amo y necesito, porque es ya gran parte de mi vida presente y futura. Gracias bebe por darme otra gran alegría la de poder ser madre y brindarme la oportunidad de aprender a serlo.

Y NO MENOS IMPORTANTE

A DIOS TODO PODEROSO:

Por darme todo lo que tengo y sobre todo por dejarme llegar hasta aquí, por darme cada día el privilegio de soñar, de amar y ser amada; por guiarme y cuidarme, por enseñarme que la vida hay que vivirla en su momento, por que algún día le será devuelta, por que me dio la dicha de tener a mis padres, hermanos y amigos. Pero sobre todo por darme el don de la vida. A ti mi amigo mi eterno agradecimiento

AGRADECIMIENTOS

A MI PADRE: PEDRO HERNÁNDEZ E. *Por su gran ayuda, consejos y regaños, pero sobre todo por darme la vida, por creer en mí y sobre todo aun con forma de ser estricta me ha enseñado el camino largo con baches y flores que tiene la vida. Y que por adelantado me ha dado la mejor de las herencias. Mil gracias.*

A MIS HERMANOS Y HERMANAS: *Por compartir grandes alegrías y tristezas durante toda mi vida.*

A MI FACULTAD: FESC *Por haber sido mi casa durante cinco largos años.*

A ALEJANDRO HERNÁNDEZ MAGDALENO: *Por su enseñanza y apoyo desinteresado para la realización de esta tesis, por su amistad y por ser mi jefecito. Por que estaré siempre eternamente agradecida por lo mucho que me ha ayudado.*

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DE LA FACULTAD. *Por quienes las prácticas, las clases y las fiestas no hubiesen sido la mejor distracción.*

A MIS COMPAÑEROS DEL TRABAJO

A MIS MEJORES AMIGOS: LUIS B.A.A.; MARCO A.R.G. Y ADIANA I.A.C. *quienes con alegrías y problemas compartidos, he podido contar con ellos, gracias a ellos la rutina del trabajo y sus costumbres no podría ser tan diferente. Gracias por su apoyo y sus consejos.*

A LA DRA. MA. TERESA CASAUBON: *Por quien esta Tesis no hubiese sido posible y hubiese tardado más en terminarse. Mil gracias por su interés, su ayuda, sus enseñanzas, sus consejos y por que no, por sus regaños.*

A MIS SINODALES LOS DOCTORES: RAUL MAR, ALEJANDRO MARTINEZ, JUAN GARCIA, CARLOS AVILA Y ADRIANA GARULO. *Por su colaboración para la terminación de esta Tesis, Mil gracias.*

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
Dedicatorias	i
Agradecimientos	ii
Indice	iii
Lista de cuadros	iv
Lista de figuras	iv
Resumen	2
1. Introducción	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 Justificación	8
1.3 Hipótesis	8
1.4 Objetivos	9
1.4.1 Objetivos específicos	9
2. Material y métodos	10
2.1 Lugar	10
2.2 Animales de experimentación y alojamiento	10
2.3 Diseño experimental	10
2.4 Vacunación	10
2.5 Serología	10
2.6 Inoculación con una cepa de alta patogenicidad de influenza aviar	11
2.7 Colección de tejidos para histopatología e inmunohistoquímica	11
2.8 Técnica de inmunohistoquímica para la localización de la nucleoproteína	11
2.9 Calificación de lesiones	12
3. Resultados	13
3.1 Respuesta a la vacunación	13
3.2 Hallazgos histopatológicos en encéfalo	14
3.3 Inmunohistoquímica	20
4. Discusión	21
5. Literatura citada	24

LISTA DE CUADROS

NO. DE CUADROS	PÁGINA
1. Medidas geométricas	13
2. Frecuencia de lesiones	15
3. Porcentaje de aves con lesiones	17

LISTA DE FIGURAS

No. DE FIGURAS	PAGINA
1. Media histológica de lesiones	18
2. Encéfalo de ave susceptible	20

RESUMEN

"CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA PATOGENIA DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR (H5N2) ALTAMENTE PATÓGENO: ENCÉFALO" Tema de Tesis presentado por **MIRNA MARGARITA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ**. (Bajo la dirección de MVZ MC. Alejandro Hernández Magdaleno, MVZ. MC María Teresa Casaubon Huguenin y MVZ. PhD Juan García García). 2000

El objetivo de la presente investigación fue contribuir al estudio de la patogenia del virus de influenza aviar (H5N2) altamente patógeno en aves susceptibles (Av-Susc) y en aves inmunizadas (Av-Inm), durante las primeras 72 horas post-inoculación (hpi) a través del estudio histopatológico e inmunohistoquímica del encéfalo. Se formaron dos grupos de 80 aves libres de patógenos específicos (SPF) cada uno. A los 8 días de edad, uno de los grupos fue inmunizado con una vacuna emulsionada contra influenza aviar (IA) y el otro permaneció sin inmunizar. A las cuatro semanas de edad, ambos grupos fueron inoculados vía intranasal con 1×10^3 dosis letal embrión de pollo 50% (DLEP₅₀) del virus A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno. Se tomaron aleatoriamente 3 aves de cada grupo a las 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68 y 72 hpi, para estudio histopatológico y de inmunohistoquímica del encéfalo. Al examen microscópico las lesiones fueron calificadas con un método numérico para calcular la media histológica de lesiones (MHL). Las lesiones encontradas en las Av-Susc fueron: vasculitis, edema perivascular, meningitis no supurativa, gliosis focal y difusa, hiperemia, satelitosis y neuronofagia, y necrosis de la sustancia blanca. Las Av-Inm, no presentaron lesiones en encéfalo. No se pudo demostrar mediante inmunohistoquímica la presencia del virus en los tejidos. La inmunidad conferida por la vacuna emulsionada, protegió a las aves de la presentación de lesiones en el encéfalo, con lo que se protegieron sitios vitales del ave.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La industria avícola es una actividad que ha tenido un desarrollo sorprendente en poco tiempo (Balconi, 1994). En la avicultura comercial el número de empresas que adoptan la filosofía de la calidad total, está en aumento con el fin de mejorar la productividad y la calidad de sus productos y/o servicios. En los últimos años, las empresas han sufrido cambios importantes generados a partir de la intensificación de la producción avícola, lo que ha modificado la incidencia y la presentación de enfermedades en las aves (Tavera *et al.* 1996, Villegas, 1996).

Los sistemas intensivos de producción han creado la necesidad de contar con métodos de diagnóstico de las enfermedades rápidos y oportunos para tomar medidas rápidas y adecuadas de tratamiento, prevención, control y erradicación. Enfocado a evitar pérdidas económicas importantes debidas a morbilidad, mortalidad y disminución en el consumo de alimento, lo que a su vez reduce la producción de huevo y el crecimiento de las aves (Shane 1995 a, Soto 1994).

Durante los últimos cuatro años la avicultura mexicana ha sido fuertemente afectada por la influenza aviar (IA). Considerando los gastos ocasionados por la mortalidad, baja de postura, compra de vacunas e instauración de medidas de bioseguridad (SAGAR, 1997), la Unión Nacional de Avicultores, calculó las pérdidas monetarias del sector avícola durante el brote de IA de alta patogenicidad (IAAP) de diciembre a 1994 a mayo de 1995, en 49 millones de dólares.

La IA es una enfermedad viral que ha afectado a la industria avícola de algunos países por mucho tiempo y es considerada como una de las de mayor importancia económica (Eckroade *et al.* 1994, García *et al.* 1996 a, Mickle *et al.* 1996, Monroy *et al.* 1995), es causada por el virus de influenza tipo A, el cual pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* (Seen *et al.* 1996). Antigénicamente existen tres tipos diferentes del virus denominados A, B y C. El tipo A se diferencia de los tipos B y C con base a la identidad de los mayores antígenos proteicos internos (Harley *et al.* 1990).

Los virus de influenza A infectan a una gran cantidad de especies, incluyendo humanos, cerdos, caballos, mamíferos marinos y aves (Murphy y Webster 1990, Webster *et al.* 1992). Varios subtipos antigénicos del virus han sido recuperados de muchas especies aviares silvestres y domésticas en todo el mundo. Se ha establecido que las aves silvestres, incluyendo las aves acuáticas migratorias, marinas y costeras sirven como reservorio de estos virus (Brow *et al.* 1992, Easterday y Hinshaw 1991, Webster *et al.* 1992). La mezcla genética de los virus de influenza A en las aves acuáticas,

provee toda la diversidad requerida para que se generen virus que pueden llegar a ser pandémicos para humanos, otros animales inferiores y aves (Easterday y Hinshaw 1991).

Los virus de influenza A, en el aislamiento inicial son partículas pleomórficas pequeñas (80 a 120 nm de diámetro) que más tarde son esféricas, de simetría helicoidal y contienen una envoltura lipídica de dos capas derivadas de la célula hospedadora, en la cual se embeben las glicoproteínas codificadas por el virus, hemoaglutinina (HA) y neuroaminidasa (NA) (Kingsburry 1990, Murphy et al. 1990, SAGAR 1997).

El genoma de los virus de influenza A está compuesto de ocho segmentos de RNA de una sola cadena, de los cuales seis son monocistrónicos y dos codifican para la síntesis de dos proteínas cada uno. Por tanto los ocho segmentos codifican 10 productos reconocidos: las polimerasas PB1 (polimerasa básica 1), PB2 (polimerasa básica 2), PA (polimerasa ácida), las proteínas HA, nucleoproteína (NP), NA, las proteínas de la matriz M1 y M2, y las proteínas no estructurales NS1 y NS2 (Jawetz *et al* 1996, Kingsburry 1990, Murphy y Webster 1990, Webster *et al* 1992).

La HA es una proteína integrada a la membrana y el principal antígeno del virión, responsable de la patogenicidad, mediando la unión de los viriones a los receptores celulares del hospedero (Rott 1992, Perdue *et al.* 1996) y permite la entrada de la nucleocápside al interior de la célula en los estados iniciales de la infección (Webster et al. 1992). Actualmente en la naturaleza hay reconocidos 15 subtipos de HA (llamados H1 - H15) (Rohm *et al.* 1996), los cuales difieren en al menos 30% en la secuencia de amino ácidos de H1 y no muestran reactividad serológica cruzada (Murphy *et al.* 1990, Webster *et al.* 1992).

La NA es también una glicoproteína integrada a la envoltura y es el segundo antígeno mayor de la superficie del virión (Webster 1992). Su función es la de liberar las partículas virales de los receptores celulares del hospedero al fragmentarlos, permitiendo así que la progenie viral se libere de la célula que los originó y en consecuencia facilitar su diseminación (Kingsburry 1990, Murphy y Webster 1990, Webster *et al* 1992). Nueve subtipos de NA (llamados N1 - N9) han sido identificados en la naturaleza, careciendo de actividad serológica cruzada.

Los virus de influenza A son de particular interés para los médicos veterinarios, ya que infectan diferentes especies de mamíferos y aves. En mamíferos las manifestaciones clínicas, son el resultado de infecciones localizadas en el epitelio del tracto respiratorio, mientras que en aves se presentan cuadros asintomáticos, producidos por virus de baja patogenicidad (BP), que replican en

forma localizada en las mucosas, o infecciones sistémicas fatales causadas por variantes de IAAP (Rott 1992).

La IAAP se detecta cuando hay un incremento significativo en la mortalidad, asociada a un cuadro sistémico y en aves de postura una disminución marcada en la producción de huevo (García *et al.* 1995a, Hernández *et al.* 1995b). Los signos de la enfermedad son extremadamente variables y dependen de la especie afectada, cepa y subtipo viral, edad, sexo, infecciones asociadas y factores ambientales. Algunos signos reportados son: postración, disminución en el consumo de alimento, pérdida de peso; signos respiratorios de leves a severos; lagrimeo excesivo, edema de la cabeza y cara; cianosis de cresta, barbilla y metatarsos; desórdenes nerviosos y diarrea (Casaubon *et al.* 1996, Easterday and Hinshaw 1991, Harley *et al.* 1990, Hernández *et al.* 1995, Monroy *et al.* 1995). En algunos casos la enfermedad es fulminante y las aves son encontradas muertas sin signos previos, debido al periodo de incubación del virus que es extremadamente variable, pudiendo ir de unas pocas horas a 2 ó 3 días (Easterday and Hinshaw 1991).

La patogenicidad del virus de influenza se correlaciona con la capacidad de su HA de dividirse en dos subunidades, HA1 y HA2, conectadas por puentes disulfuro y que producen una partícula viral infecciosa madura. La diferencia en patogenicidad entre los virus de BP y AP es la susceptibilidad de la HA a la acción de las proteasas celulares que la dividen en HA1 y HA2 (Rott 1992, Alexander *et al.* 1996, Perdue *et al.* 1996). Los virus de IAAP tienen aminoácidos básicos al final de la cadena HA1 adyacente al sitio de división. En contraste, los virus de BP no tienen esos aminoácidos básicos, pero una sustitución resultante de una mutación puede incrementar su patogenicidad (Shane 1995b).

La notificación oficial de la presencia de la IA en México por parte de la Dirección General de Salud Animal de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, fue el 24 de mayo de 1994, con el aislamiento de tres cepas de virus de IA procedentes de granjas avícolas de los estados de Querétaro, Hidalgo y México; que fueron identificadas posteriormente como H5N2 de BP. La IA hasta ese momento era considerada como una enfermedad exótica en el país (García *et al.* 1995b, Campos *et al.* 1996)

El 13 de enero de 1995 fue confirmado por el Laboratorio de la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA), el diagnóstico de un virus H5N2 de AP en tres granjas de postura comercial del estado de Puebla y posteriormente durante el mismo mes en el estado de Querétaro. Las cepas fueron identificadas como A/Chicken/Puebla/14585-622/94 (H5N2) y A/Chicken/Querétaro/14588-19/95

(H5N2). Mediante la prueba tradicional de patogenicidad en pollos, se comprobó que ambas cepas causaron la muerte del 100% de las aves inoculadas por vía endovenosa o intramuscular a diferentes dosis virales (Cerón *et al.* 1995,1996).

En el país, se iniciaron los trabajos de investigación encaminados a evaluar una vacuna que ayudara a prevenir los efectos devastadores de la enfermedad en las aves domesticas . Hernández *et al* (1995b) comprobaron que una vacuna inactivada y emulsionada, indujo protección a las aves contra el desafío experimental de un virus de AP. Con estos resultados la DGSA autorizó la vacunación, con lo cual México fue el primer país en el mundo en recurrir al empleo de una vacuna contra el subtipo H5N2 de IA, como medida de control. Sin embargo, la vacuna no previno la infección ni la eliminación viral, la cual pudo ser detectada hasta los 21 días post desafío (dpd) y en cantidad suficiente para causar la muerte de aves susceptibles puestas en contacto (Hernández *et al* 1995 a) .

Con base en estos resultados, Monroy *et al.* (1995) realizaron un estudio para diferenciar los signos clínicos y lesiones producidas por estas dos cepas AP en pollos Leghorn, Indian River y Rhode Island. Encontrando en el examen histopatológico: gliosis difusa, satelitosis, neuronofagia e infiltrado perivascular linfoide en encéfalo; despoblación linfoide en bolsa de Fabricio, bazo y timo; dermatitis ulcerativa y necrótica con infiltrado difuso de heterófilos en cresta y barbillas.

Posteriormente, Casaubon *et al.* (1996) informaron que pollos Leghorn e Indian River inoculados experimentalmente con la cepa A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2), no presentaron cambios significativos en hígado, páncreas y riñón. En órganos linfoides predominó hiperemia, atrofia moderada de la bolsa de Fabricio y necrosis unicelular dispersa en bazo, además, de encontrar gran cantidad de pigmento de origen hemático disperso en capilares subepidérmicos. Al estudio ultraestructural observaron grandes acúmulos de virus en el interior de extensas cisternas localizadas en el citoplasma de heterófilos, leucocitos mononucleares y células endoteliales.

En un estudio realizado por Hooper (1989), se encontró que pollos inoculados con la cepa A/Chicken/Victoria/85a/85 (H7N7), mostraron edema de barbillas y cresta; focos de necrosis en cerebro con gliosis y picnosis; además de pérdida de linfocitos en bolsa de Fabricio, observando que esta cepa afecta principalmente la bolsa de Fabricio, el páncreas y cerebro. Van Campen *et al.* (1989), informaron que pollos inoculados con la cepa A/Turkey/Ontario/7732/66 (H5N9) mostraron linfopenia severa, altos títulos virales en órganos linfoides acompañado de daño en las poblaciones de linfocitos y pusieron de manifiesto mediante la técnica de avidina-biotina-inmunoperoxidasa, la nucleoproteína viral en linfocitos en estados tempranos de la infección.

En 1989, se observó que la cepa A/Chicken/Pennsylvania/1370/1983 (HSN2), replica en células parenquimatosas de varios órganos del ave, especialmente en el epitelio respiratorio, cerebro, riñón, músculo y sistema linforreticular; pero no se describió la localización en endotelios vasculares, para lo cual Brown *et al.* (1992), realizaron un estudio empleando la técnica de inmunohistoquímica y encontraron que esta cepa tiene una afinidad por los endotelios de los capilares y el parénquima de ciertos órganos, especialmente en corazón y cerebro; además, esta afinidad varió dependiendo de la edad y tipo de aves.

Slemons y Swayne (1990), demostraron que la cepa A/mallard/Ohio/184/86 (H5N1) de BP inoculada por vía intravenosa (IV) en pollos de 6 semanas de edad tiene afinidad por células epiteliales de los túbulos renales e identificaron la nucleoproteína viral por la técnica de inmunoperoxidasa en el citoplasma y en el núcleo de estas células, así como en el núcleo de células epiteliales de las vellosidades del intestino delgado. Posteriormente estos mismos investigadores en 1992 emplearon la técnica de inmunohistoquímica por el método avidina-biotina-inmunoperoxidasa (ABC) en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina, localizando la nucleoproteína viral en el núcleo y citoplasma del epitelio necrótico de los túbulos renales.

Swayne *et al.* (1994) demostraron que la cepa A/Chicken/Alabama/7395/75 (H4N8) inoculada vía IV en aves Leghorn SPF y pollos de engorda al día 1 y a las 5 semanas de edad, causó la muerte de las aves debido a una falla renal aguda y reportan que la replicación viral se asocia con necrosis celular severa de los túbulos proximales.

Posteriormente, Swayne y Slemons (1994) utilizando la misma cepa y comparando con otras de baja patogenicidad en pollos SPF de 5 semanas de edad, inoculados vía intranasal (IN) e IV, causaron nefrosis, nefritis, traqueítis, bronquitis y neumonía. La nucleoproteína viral se localizó más frecuentemente por inmunohistoquímica en riñón de aves muertas y sacrificadas los 3 y 6 días post inoculación (dpi).

Shalaby *et al.* (1994) demostraron que esta misma cepa, en gallinas de postura inoculadas vía intratraqueal (IT) e IV, afecta principalmente los sistemas respiratorio y urogenital de las aves. Las aves inoculadas IT, presentaron una infección localizada en tracto respiratorio superior, mientras que las inoculadas IV, presentaron una infección sistémica, encontrando la nucleoproteína viral por inmunohistoquímica dentro de los túbulos renales.

De estos estudios es aparente que cada cepa de virus de IA tiene diferente afinidad por los tejidos y varía la manifestación de lesiones.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Los virus de influenza A, han sido estudiados a nivel molecular y se han realizado varios trabajos en donde se describen los cambios que causan en etapas avanzadas de la enfermedad. Se ha demostrado que muchas cepas altamente patógenas afectan al encéfalo, pero aun no se conoce cuales son los eventos que se suceden en el mismo durante las primeras horas post exposición al virus por vía respiratoria y si los eventos que se suceden tienen el mismo comportamiento en aves sin y con anticuerpos inducidos por vacunación

1.3 HIPOTESIS

En aves susceptibles que no presentan anticuerpos contra IA, las cepas altamente patógenas del virus afectan al encéfalo, mientras que en aves con anticuerpos inducidos por vacunación esto no sucede.

1.4 OBJETIVOS GENERAL

Contribuir al estudio de la patogenia del virus de influenza aviar (H5N2) altamente patógeno.

1.4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.- Describir los cambios histopatológicos en el encéfalo causados por el virus de influenza aviar altamente patógeno durante las primeras 72 horas post exposición en aves libres de patógenos específicos.

2.- Determinar si los cambios morfológicos que se suceden en el encéfalo durante las primeras etapas de la infección con el virus de influenza aviar altamente patógeno tiene el mismo patrón en aves sin y con anticuerpos inducidos por vacunación.

3 - Detectar mediante la técnica de inmunohistoquímica la nucleoproteína del virus de Influenza A en encéfalo.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Lugar

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio y de las unidades de aislamiento de máxima seguridad del Proyecto: Estrategias para el Control y Erradicación de la Influenza Aviar en México, Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, ubicadas en el Km. 15.5 de la Carretera Federal México-Toluca, Palo Alto, Cuajimalpa, México D.F.

2.2 Animales de experimentación y alojamiento

Se emplearon aves Leghorn, machos y hembras, libres de patógenos específicos (Aves libres de patógenos específicos, S.A., Tehuacán, Puebla) de un día de edad. Las aves se mantuvieron en baterías convencionales con calefacción local proporcionada por focos infrarrojos, recibieron alimento comercial no medicado, agua *ad libitum* y se identificaron individualmente con una banda en el ala. Las aves fueron alojadas en unidades de aislamiento con sistema de filtración a presión negativa, filtros absolutos y una cortina de luz ultravioleta a la salida del aire para evitar escape de virus al medio. Los grupos fueron manejados de manera independiente y apegándose a estrictas normas de bioseguridad.

2.3 Diseño experimental

Se formaron dos grupos de 80 animales cada uno. Uno de los grupos fue inmunizado contra IA y el otro permaneció sin inmunizar.

2.4 Vacunación

A los 8 días de edad, las aves de uno de los grupos (aves inmunizadas, Av.-Inm) se inmunizaron por vía subcutánea en el tercio medio posterior del cuello con 0.5 ml de una vacuna comercial, preparada con la cepa A/Chicken/CPA-238/94 (H5N2) apatógena, inactivada y emulsionada en aceite mineral. Las aves del otro grupo permanecieron sin inmunizar (aves susceptibles, Av.-Susc).

2.5 Serología

A los 0,7, 14 y 21 días post vacunación (dpv), se seleccionaron aleatoriamente 50% de las aves de cada grupo, de las cuales se tomó una muestra de sangre de la vena braquial para la obtención de suero. El suero se separó por los métodos convencionales y se almacenó a -20° C, para la posterior titulación de anticuerpos. Se realizó la técnica de la inhibición de la hemoaglutinación (IH) para detectar anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación específicos para IA, según el procedimiento descrito en la Norma Oficial Mexicana para la Campaña Nacional contra la Influenza Aviar (NOM-

044-ZOO-1995). Se empleó como antígeno a la cepa A/Chicken/CPA-238/94 (H5N2) inactivada con β -propiolactona. Se utilizó un suero positivo y uno negativo de referencia al momento de realizar la prueba.

2.6 Inoculación con una cepa altamente patógena de influenza aviar

A las cuatro semanas de edad ambos grupos de aves fueron inoculados con 0.2 ml/ave de fluido alantoideo infectado con la cepa A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) AP con un título viral de 1×10^3 DLEP₅₀/0.2 ml. El desafío se realizó instilando el fluido alantoideo dentro de las fosas nasales, con un catéter de teflón adaptado a una jeringa; el tiempo transcurrido de la inoculación de la primera ave con respecto a la última no excedió de 10 minutos.

La cepa A/Chicken/Querétaro/14588-19/(H5N2), fue aislada en enero de 1995 de una parvada de reproductoras pesadas, que presentaron cese total de la producción de huevo y lesiones compatibles con IAAP. Es una cepa altamente patógena, con alta eficiencia para producir placas en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo, altamente letal en pruebas de patotipificación en pollos y con una secuencia de aminoácidos en el sitio de rompimiento de la hemoaglutinina compatible con los virus AP (...Pro-Gli-Arg-Lis-Arg-Lis-Tre-Arg ↓ Gli...) (Swayne *et al.* 1997).

2.7 Colección de muestras para histopatología e inmunohistoquímica

Considerando el momento de la inoculación como la hora cero, se tomaron aleatoriamente 3 aves de cada grupo a las 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68 y 72 hpi. Las aves se sacrificaron humanitariamente y se colectó el encéfalo, el cual se fijó en una solución de formalina amortiguada al 10%, pH 7.0. Las muestras de encéfalo tuvieron una fijación de 24 - 48 horas, posteriormente fueron deshidratadas con alcoholes e incluidas en parafina a 56° C (Paraplas X-TRA Tissue embedding medium, Oxford, St. Louis, Mo.). Se realizaron cortes de 5 μ m de grosor que se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) y cortes sin teñir se emplearon para la técnica de inmunohistoquímica.

2.8 Técnica de Inmunohistoquímica para la localización de la nucleoproteína viral

Se realizó la técnica descrita por Slemons (1990) con modificaciones de Swayne (1995).

- 1). Se efectuó la recuperación del antígeno viral, mediante calentamiento de los cortes en horno de microondas en una solución de citratos pH neutro (Antigen Retrieval Citra Solution, Bio Genex, San Ramon, CA.).
- 2). El anticuerpo primario fue un monoclonal contra la nucleoproteína viral (proporcionado gentilmente por la Dr. V.S.Hinshaw, College of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Wis) a una dilución de 1:2,000 durante 24 horas a 4°C.

- 3). Se empleo un sistema comercial de amplificación de biotina-estreptavidina-fosfatasa alcalina (Super sensitive immunodetection system, inmunoglobulinas biotiladas contra anticuerpos de ratón, conejo, cuye y rata, Bio Genex San Ramon CA USA).
- 4). El cromógeno empleado fue Nueva Fushina (New Fuchsi Substrate Pack, Biogenex, San Ramon, CA, USA).
- 5). Como testigos positivos y negativos se emplearon muestras de órganos incluidos en parafina y laminillas donados por el Dr. David E Swayne (Southeast Poultry Research Laboratory, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Athens, Georgia).

2.9 Calificación de lesiones

Las lesiones fueron calificadas con un método numérico de acuerdo a su severidad (1= leve, 2= moderada, 3= severa), extensión (1= pequeña, 2= moderada, 3= amplia) y cantidad (1= escasa, 2= moderada, 3= abundante). La media histológica de lesiones (MHL), resultó de la suma de las calificaciones correspondientes a las lesiones observadas y divididas entre el número de pollos muestreados por grupo y por tiempo post inoculación.

RESULTADOS

3.1 Respuesta serológica post vacunación

La respuesta serológica de las Av-Inm después de la vacunación, se presenta en el cuadro 1. Los resultados representan la media geométrica de los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación específicos para IA y el porcentaje de seroconversión de las aves. Los anticuerpos se detectaron a los 7 dpv en un 33% de las aves; mientras que a los 21 dpv, el porcentaje de seroconversión fue del 100%. Las Av-Susc permanecieron seronegativas a IA durante los 21 días.

Cuadro 1. Medias Geométricas de los títulos de anticuerpos y porcentaje de seroconversión de aves inmunizadas con una vacuna inactivada contra IA.

<i>Días post vacunación</i>	<i>Media Geométrica</i>	<i>% Seroconversión</i>
	<i>n = 40</i>	
<i>0</i>	Neg [♣]	0
<i>7</i>	17	33
<i>14</i>	35	59
<i>21</i>	42	100

♣ Neg= Negativo (Sin títulos de anticuerpos contra IA).

3.2 Hallazgos histopatológicos en encéfalo

Las lesiones microscópicas en el encéfalo de las Av-Susc, fueron variadas conforme pasaron las hpi. El cuadro 2 presenta estas lesiones que fueron encontradas en las Av-Susc a las 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68 y 72 hpi con el virus de IAAP.

En el cuadro 3 se presenta los porcentajes correspondientes a las lesiones encontradas en encéfalo en el conjunto de Av-Susc y Av-Inm, muestreadas durante el periodo de 2 a 24, 28 a 48 y 52 a 72 hpi.

En la Figura 1, se muestra la MHL del encéfalo, ésta representa la severidad, extensión y cantidad de lesiones; cada punto en la gráfica representa la MHL de tres aves en cada uno de los grupo. La MHL se calculó de la siguiente manera: por ejemplo pollo 1 con meningitis severidad (1), extensión (1) y cantidad (1) al sumarse las tres calificaciones dan un total de 3, si el pollo 2 es de 5 y el pollo 3 es 4, al sumarse los tres pollos dan un grado de lesión de 12, al dividirse entre 3 nos da un grado total de lesión de 4, punto que en total se presenta en dicha gráfica. En Av-Susc, la cantidad de MHL comenzó a elevarse a las 16 hpi, siendo más significativo a las 60 hpi, en la Figura 2 se puede observar una de las lesiones más frecuentes (vasculitis severa, en flechas) en Av-Susc durante el tiempo de muestreo.

Cuadro 2. Frecuencia de lesiones histológicas encontradas en el encéfalo de aves susceptibles después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

Horas post-inoculación (hpi)	Lesiones microscópicas	No. de aves que presentaron lesión/ número de aves muestreadas
02	SCPS ^A	3/3
04	SCPS	3/3
08	SCPS	3/3
	Vasculitis	1/3
12	SCPS	3/3
16	Edema perivascular	3/3
	Meningitis no supurativa	1/3
	Gliosis focal	1/3
20	SCPS	1/3
	Vasculitis	1/3
	Edema perivascular	1/3
24	Edema perivascular	1/3
	Vasculitis	1/3
	Hiperemia	2/3
28	SCPS	1/3
	Edema perivascular	1/3
	Vasculitis	1/3
32	Edema perivascular	2/3
	Meningitis no supurativa	1/3
	Gliosis focal	2/3
36	SCPS	1/3
	Edema perivascular	1/3
	Meningitis no supurativa	1/3
40	SCPS	1/3
	Vasculitis	1/3
	Edema perivascular	1/3

44	SCPS	1/3
	Vasculitis	1/3
	Edema perivascular	1/3
	Gliosis focal	1/3
	Satelitosis y neuronofagia	1/3
48	Edema perivascular	3/3
	Gliosis focal	3/3
	Satelitosis y neuronofagia	1/3
52	Vasculitis	1/3
	Edema perivascular	2/3
	Gliosis focal	2/3
	Satelitosis y neuronofagia	2/3
	Gliosis difusa	2/3
56	Vasculitis	1/3
	Edema perivascular	3/3
	Gliosis difusa	2/3
	Necrosis de la sustancia blanca	1/3
60	Vasculitis	1/3
	Edema perivascular	2/3
	Gliosis focal	1/3
64	SCPS	1/3
	Vasculitis	1/3
	Edema perivascular	1/3
68	Vasculitis	1/3
	Edema perivascular	2/3
	Meningitis no supurativa	2/3
	Gliosis focal	3/3
72	Vasculitis	3/3
	Edema perivascular	2/3
	Gliosis focal	3/3

^A Sin Cambios Patológicos Significativos

Cuadro 3 Porcentajes de aves con lesiones en encéfalo después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno. Las lesiones fueron agrupadas por lapsos de tiempo y números de aves muestreadas correspondientes a dicho tiempo.

HALLAZGOS HISTOPATOLOGICOS	AVES SUSCEPTIBLES			AVES INMUNIZADAS ^A		
	02-24hpi ^B n=21 ^C	28-48hpi n=18	52-72hpi n=18	02-24hpi n=21	28-48hpi n=18	52-72hpi n=18
SCPS ^D	57	22	5	0	0	0
VASCULITIS	14	16	50	0	0	0
EDEMA PERIVASCULAR	23	50	66	0	0	0
MENINGITIS NO SUPURATIVA.	5	11	11	0	0	0
GLIOSIS FOCAL	5	33	50	0	0	0
GLIOSIS DIFUSA	0	0	22	0	0	0
SATELITOSIS Y NEURONOFAGIA	0	11	11	0	0	0
NECROSIS DE LA SUSTANCIA BLANCA	0	0	5	0	0	0

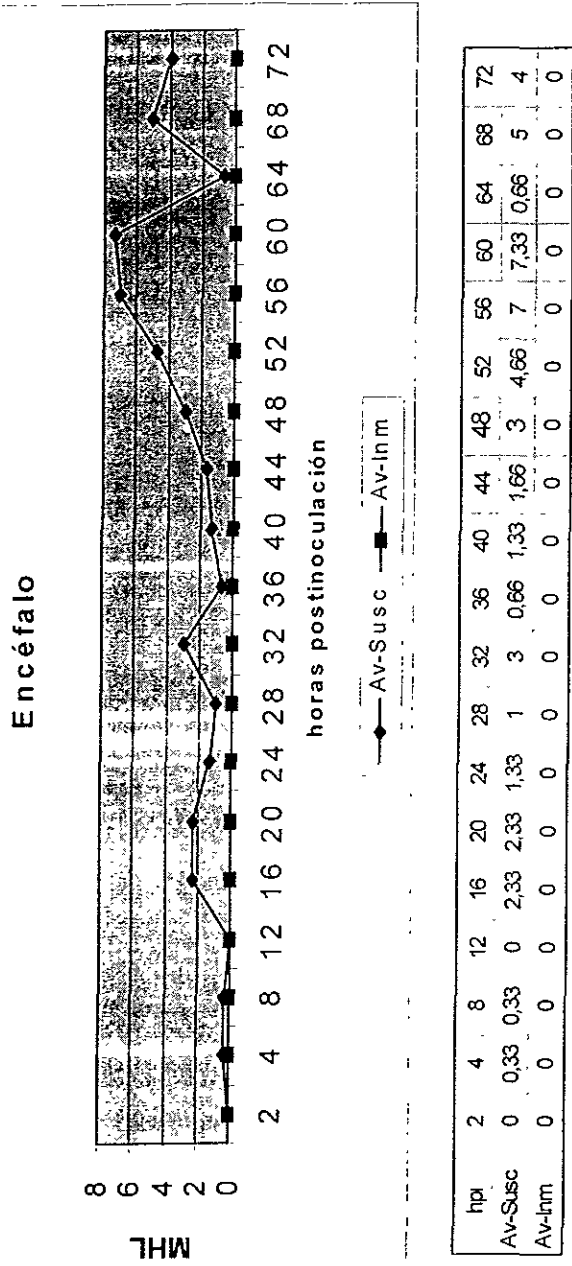
^A Aves inmunizadas con una vacuna inactivada y puestas en contacto con el virus 21 días después.

^B hpi= horas post inoculación.

^C n= número de aves muestreadas en el período correspondiente.

^D SCPS= sin cambios patológicos significativos.

Figura 1. Media histológica de lesiones en encefalo de aves susceptibles y aves inmunizadas posterior al desafío con el virus de influenza aviaria (H5N2) altamente patógeno: A/chicken/14588-19/95.

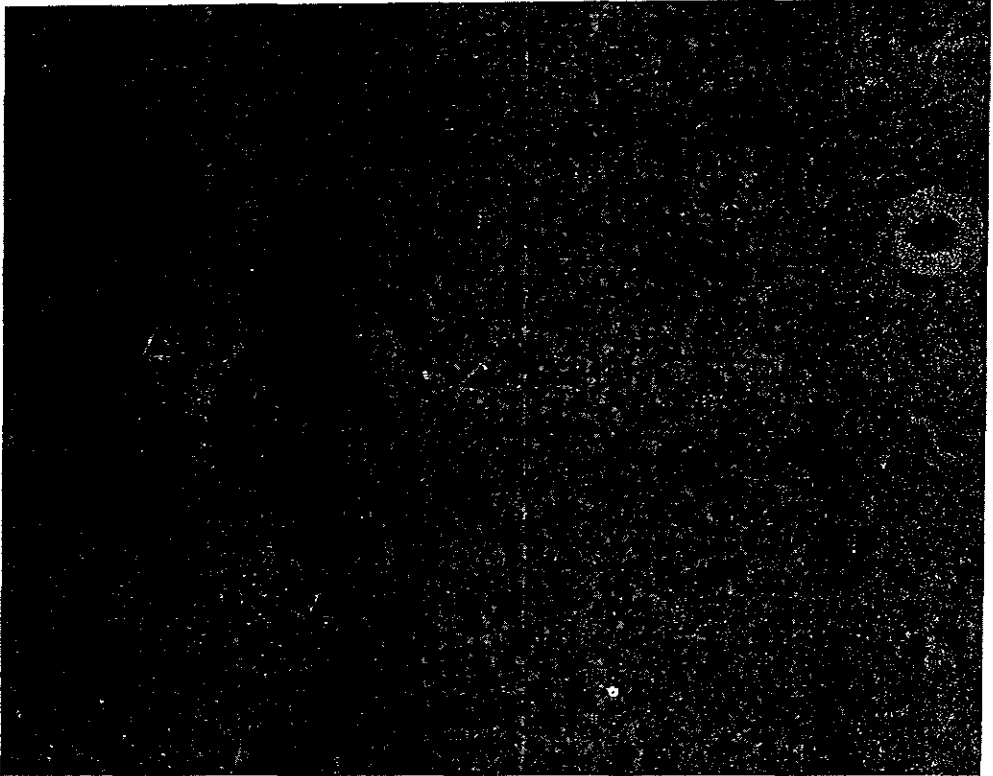


Av-Susc: Aves no inmunizadas y desafiadas con el VIAAP.

Av-Inm: Aves vacunadas y desafiadas con el VIAAP a los 21 días post-vacunación.

MHL: Media histológica de lesiones. En el cuadro inferior a la figura se aprecia los resultados totales de la MHL, la cual se calificó con un método numérico en base a su severidad: 1= Leve, 2=moderada, 3=severa; a su extensión: 1= pequeña, 2=moderada, 3=amplia; y a su cantidad: 1=escasa, 2=moderada, 3=abundante, y fue calculada sumando estas calificaciones correspondientes a las lesiones de las tres aves y dividida entre tres.

Figura 2. Encéfalo de un ave susceptible, 52 hpi con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno. Vasculitis severa (flechas) H&E 270X .



3.3 Inmunohistoquímica en encéfalo

No se pudo demostrar la presencia de la nucleoproteína del virus de IA, durante las primeras 72 hpi. En los testigos positivos la nucleoproteína viral se observó como puntos de color rojo en el citoplasma de diferentes células.

4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se utilizó una vacuna elaborada con la cepa A/Ck/CPA-238/94 (H5N2) apatógena, inactivada y emulsionada con aceite mineral. Al estudio serológico por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (IH) los niveles de anticuerpos se detectaron a partir de los 7 dpv en un 33% y a los 21 dpv seroconvirtieron hasta un 100%, estos resultados concuerdan con estudios que otros investigadores realizaron (Hernández *et al* 1995 a, b, García *et al* 1995 a, b, c, Palacios *et al* 1996, Rodríguez *et al* 1995, 1996 a, b), corroborando que la vacunación sí induce una buena respuesta de anticuerpos en el ave. Sin embargo, aunque la vacuna previene la mortalidad y la presentación de los signos, no inhibe la infección ni la excreción viral (Hernández *et al* 1995 a).

En aves infectadas con el virus de IAAP, la afección del sistema nervioso central es una de las lesiones histológicas más comunes (Webster and Kawaoka 1988; Hooper, 1989; Alexander 1990, Easterday and Hinshaw 1991, Cheville 1994). Narayan (1972) demostró que el encéfalo es afectado por la presencia del virus en sangre infectando el endotelio vascular. Además Swayne *et al* (1997) demostraron que las cepas mexicanas AP de acuerdo al patrón de los órganos afectados y la distribución del antígeno viral indica una capacidad común para diseminarse más allá del tracto respiratorio confirmando su naturaleza pantotrópica, patobiológica y letal del virus.

Kobayashi *et al* (1996) estudiaron la neuropatología en encéfalo de las cepas A/chicken/Victoria/1/85 (H7N7), A/turkey/England/50-92/91 (H5N1) y A/tern/South Africa/61 (H5N3) AP en pollos SPF con diferentes títulos virales, inoculados por vía intranasal (IN) y oral. Estos autores señalaron que generalmente, las cepas causaron una microglitosis focal y necrosis, endoteliosis vascular e infiltración de células mononucleares alrededor de los vasos, meningitis y ventriculitis con necrosis en células ependimales. Estas lesiones fueron detectadas a los 2,3,4 y más días post inoculación.

A diferencia de la investigación de Swayne *et al* (1997) que señala que a las 72 hpi, las aves desafiadas con el VIAAP presentaron meningoencefalitis linfocitaria multifocal moderada con prominente gliosis, y cuerpos de inclusión eosinofílicos intranucleares. En el presente trabajo y a partir de las 16 hpi, en Av-Susc se observó vasculitis, edema perivascular, meningitis no supurativa, gliosis focal, necrosis de sustancia blanca, hiperemia, satelitosis y neuronofagia, y gliosis difusa; en tanto que las Av-Imm, no se encontró lesión alguna. Sin embargo, pese a las lesiones histológicas encontradas en el encéfalo no se observaron signos nerviosos durante el tiempo de muestreo, en ninguna de las aves desafiadas con IAAP.

La evaluación de las lesiones histológicas a partir de la MHL permitió cuantificar de una manera más precisa el efecto que tiene el virus sobre el encéfalo, puesto que se consideraron la severidad, extensión y cantidad de lesiones al mismo tiempo. Algunos autores han usado métodos numéricos de evaluación de lesiones, tomando sólo en cuenta la severidad, la extensión y cantidad de lesiones por separado, más no el conjunto de las tres características (Swayne y Slemons 1992, Swayne *et al* 1994, Kobayashi *et al* 1996, Mo *et al* 1997).

La severidad, extensión y cantidad de lesiones tuvo una MHL de forma ondulante, teniendo picos a partir de las 60-20 hpi con 2.33, a las 32 hpi con 3, alcanzando el pico más alto de 7.33 a las 60 hpi, descendiendo drásticamente a las 62 hpi a 0.66 y aumentando después hasta 5 a las 68 hpi. Esto quizás se deba a una posible intervención de la respuesta inmune celular, Webster *et al.* (1991) señalaron que la inmunidad celular también interviene en la protección de las aves contra el VIA, puesto que consideran que los Linfocitos T bloquean al virus evitando que afecte los centros vitales del organismo, así como la muerte, más no suprime la infección. Sin embargo, al buscar la nucleoproteína del virus de IAAP mediante inmunohistoquímica, en este trabajo, no se pudo localizar ni demostrar la presencia del mismo.

Swayne (1997) demostró que la primera causa de muerte en aves infectadas con VIAAP, es por lesiones severas en encéfalo, causando la muerte de neuronas; su rápida replicación causa una trombosis en el endotelio vascular del encéfalo siendo uno de los posibles mecanismos patógenos responsable de la enfermedad y la muerte; demostró por inmunohistoquímica la presencia de la nucleoproteína del virus de IAAP de las cepas mexicanas Querétaro y Puebla, en núcleo y citoplasma de las neuronas de Purkinje y en menor frecuencia en neuronas de la medula oblonga y hemisferio cerebral.

A pesar de que las Av-Susc utilizadas en este trabajo, mismas que fueron seleccionadas al azar y sacrificadas, y a las que se le observaron signos clásicos de la enfermedad, a través de histopatología se confirmó los daños causados por el virus, sin embargo, no fue posible demostrarlo por inmunohistoquímica, quizás esto debido a que el título viral era escaso o al llegar y lesionar a las células del encéfalo, éstas degeneraban y fragmentaban, liberando la nucleoproteína por actividad de la NA.

Hernández (1998) demostró que en aves susceptibles desafiadas con una cepa del IAAP a partir de las 28 hpi, en el 100% de ellas se puede aislar e identificar al virus circulante en sangre, alcanzando un título viral de 10^{6-12} DLEP₅₀/ml y hasta 10^{9-04} DLEP₅₀/ml a las 72 hpi, lo cual refleja que la cantidad de partículas virales en tejidos es escasa, sugiriendo además que este virus tuvo varios

ciclos de replicación, antes de diseminarse. Swayne (1997, citado en Hernández 1998) señala que para poder identificar al VIA por inmunohistoquímica se requiere de por lo menos de 10^5 partículas virales por gramo de tejido.

Cabe mencionar que Hooper *et al* (1990) demostraron en cepas de IAAP como de BP con inmunoperoxidasa, la nucleoproteína de cepas AP se localizaba en el páncreas, cerebro, riñones, corazón y músculo esquelético; en tanto que las cepas de BP las lesiones fueron específicas únicamente a nivel de riñones, de aves muertas por la enfermedad. Y en 1995 por medio de estudios histológicos comparativos de tejidos de aves infectadas con el VIA de diferente grado de virulencia, encontraron distintas formas de la enfermedad dependiendo de la virulencia del virus y la susceptibilidad de las aves.

De igual manera Mo *et al* (1997) utilizaron cinco virus de IA tanto de BP como de AP, demostrando en cuatro de ellos, por la tinción inmuno-específica, la nucleoproteína del virus más comúnmente en células del corazón, pulmón, riñón y cerebro de los pollos muertos desafiados por vía IT; en tanto que en el último no se detectó la nucleoproteína a pesar que se demostró serológicamente la infección, lo que se atribuyó a una nula persistencia del virus en los tejidos.

Es posible que la ausencia de la nucleoproteína del virus en el encéfalo de las Av-Susc muestreadas en este trabajo se vea influenciado por el corto tiempo de exposición del virus, así mismo como su sacrificio. En Av-Inm, a pesar de la inmunidad humoral quizás también haya intervenido la inmunidad celular, ya que no se apreciaron signos clínicos ni lesiones en el encéfalo.

Por todo lo anteriormente citado, es necesario recalcar que el tiempo promedio de muerte en las aves infectadas con este virus y de las lesiones las cuales varían en su presentación o severidad, dependen indiscutiblemente de la cepa, ruta de inoculación, dosis, cantidad de título viral, edad y susceptibilidad de las aves y la raza (Kobayashi *et al* 1996; Shalaby *et al.* 1994; Swayne *et al.* 1994; Swayne y Slemons, 1994).

Por lo que se concluye que el sitio y la severidad del desarrollo de la patogenia del VIAAP están determinados por la naturaleza sistémica o localizada de la infección, así como por el grado bajo o alto de patogenicidad (Shalaby *et al* 1994). Y para que pueda ser localizada la nucleoproteína viral por inmunohistoquímica, depende del tiempo de exposición al virus o bien en órganos de aves naturalmente muertas por el virus y no sacrificadas como en esta investigación se hizo, comparando con lo que han demostrado varios autores antes citados, ya que existe variabilidad en la severidad y distribución de lesiones entre los diferentes virus de alta patogenicidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alexander D.J.: Orthomyxoviridae (avian influenza). In: Poultry Diseases, 3rd, Edit., F.T.W. Jordan, Ed., Baillière Tindall, London, pp 137-146, 1990.

Alexander, D.K, Wood, G.W., Collins, M.S., Banks, J. and Manvell, R.J.: Recent works on the pathogenicity of avian influenza viruses and the pathogenicity and antigenicity of Newcastle disease virus. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45th Western poultry disease Conference. Cancún, Q.R. Mayo 1996. pp 1-4 ANECA, WPDC.

Balconi I.R.: Responsabilidad y Calidad Editorial en el Medio Avípecuario. Tecnología Avípecuaria, 78: 26, 1994.

Brown, C.C. Olander, H.J., and Senne, D.A.: A pathogenesis study of highly pathogenic avian influenza virus H5N2 in chickens, using Immunohistochemistry *J Comp Path* 107: 341-348, 1992.

Camacho F.E., Soto P E. et al.: Un año de experiencias de campo con el virus de Influenza Aviar en México. Memorias del Séptimo curso de actualización Avi-Mex, México D.F. 1995.

Campos, L.H., Rivera, C.E., e Irastosa, E.M.: Situación y perspectivas del programa de erradicación de la influenza aviar en México. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45th Western poultry disease Conference. Cancún, Q.R. Mayo 1996. pp 13-16 ANECA, WPDC.

Casaubon, H.M., Hernández, M.A , García, G.J. y Rosales, M.L.: Estudio morfológico y consideraciones sobre la evolución de las lesiones cutáneas causadas por 5 aislamientos de virus de influenza aviar (IA) en México. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45th Western poultry disease Conference. Cancún, Q.R. Mayo 1996. pp 48-50 ANECA, WPDC.

Casaubon, H.M., Hernández, M.A., García, G.J. y Rosales, M.L.: Lesiones cutáneas causadas por el virus de Influenza aviar A/Ck/Querétaro/14588-619/95 (H5N2) altamente patógeno. Memorias Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Morelos México, pp 91, 1996.

Ceron H.M , Rodríguez V.H., Hernández M A., Blasco R.K., García G.J. y Webster R.G.: Estudios básicos de las cepas de desafío de Influenza Aviar y evaluación de la prueba de patogenicidad. *Vet. Méx* 26, suplemento 2:106, (1995).

Ceron H.M , Rodríguez V.H., Hernández M.A., Blasco R.K., García G.J. y Webster R.G.: Estudios básicos de las cepas de desafío de Influenza Aviar y evaluación de la prueba de patogenicidad, Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Ciencias Avícolas y la 45th Western Poultry Disease Conference, pp 50-51, ANECA, 1996.

Contreras T.M.: Comparación de varias líneas genéticas comerciales de pollo de engorda. *Tecnología Avipecuaria*, 82: 5, 1994.

Cheville, N.F.: Cytopathology of viral diseases. In: *Ultrastructural Pathology. An Introduction to Interpretation*, Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp 491-615, 1994.

Easterday C.B. and Beard, C.W.: Avian influenza. In: *Diseases of Poultry* Edit., M.S. Hofstand, H J. Barnes, C.W. Claneck, W.M. Reid and H.W. Yoder, Eds, Iowa State University Press, Ames Iowa USA, pp 482-496, 1984.

Easterday C.B. and Hinshaw S.V.: Influenza, In: *Diseases of Poultry*. Edited by: Calnek, W.B., Bernes W.C., Reid M.W. and Yorder W.H. Iowa State University Press, Ames Iowa USA 523-551. 1991.

Eckroade R J. y Davison.: Influenza: Epidemiología e impacto sobre la industria avícola. *Revista Avícola de México*, Organó Oficial de la UNA, 7: 40, 1994.

Fraire Ch.M. y Paz R.P.: Aislamiento en México del virus de la Influenza Aviar, Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Ciencias Avícolas y la 45th Western Poultry Disease Conference, Cancún, Q.R. Mayo 1996. pp 97-99, ANECA.

García G J , Hernández M.A., y Rodríguez V.H.: Factores de Patogenicidad e Inmunización contra Influenza Aviar, Memorias de la XX Convención Anual de la Asociación Nacional de Ciencias Avícolas. Acapulco, Guerrero. Mayo 1995. pp 397-404, ANECA.

García G.J., Méndez M.A. y Rivera C.E.: Estudio descriptivo de los Aislamientos del Virus de la Influenza Aviar de Baja Patogenicidad de enero a septiembre de 1994. *Vet Mex* 26, suplemento 2:100 (1995).

García G.J., Rodríguez V.H., Hernández M.A., y Ceron H.M.: Vacunas contra Influenza Aviar. Memorias del curso de Bioseguridad para el control y prevención de la Influenza Aviar, pp 27 - 35, México 1995.

García G.J., Rodríguez V.H., Hernández M.A., y Ceron H.M., Alvarado M., Gómez D.C.: Utilización de Formalina como inactivante en la vacuna de Influenza Aviar. *Vet Mex* 26, suplemento 2:103 (1995).

García G.J., Hernández M.A., Rodríguez V.R.: Factores de patogenicidad e inmunización contra Influenza Aviar. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Ciencias Avícolas y la 45th Western Poultry Disease Conference, Cancún, Q.R. Mayo 1996. pp 397-404, ANECA. WPDC.

García G.J., Rodríguez V.H., Hernández M.A., Ceron H.M., y Blasco R.K.: Evaluación de vacunas inactivadas de la Influenza Aviar en México, prueba de laboratorio y de campo. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Ciencias Avícolas y la 45th Western Poultry Disease Conference, Cancún, Q.R. Mayo 1996. pp 40-42, ANECA. WPDC.

Harley, V.R., Hudson, P.J., Coupar, B.E., Sellec, P.W., Westburg, H., and Boyle, D.B. Vaccinia virus expression and sequence of an avian influenza nucleoprotein gene: potencial use in diagnosis. *Arch Virol* 113:133-141, (1990).

Hernández M.A.: Estudio de la patogenicidad del virus de influenza aviar (H5N2) altamente patógeno mediante inmunohistoquímica. Tesis de Maestría. FMVZ, UNAM, D.F. 1998.

Hernández M.A., Rodríguez V.H., y García G.J.: Protección conferida por una vacuna inactivada emulsionada ante el desafío de una cepa altamente virulenta de Influenza Aviar (H5N2). *Vet Mex* 26, suplemento 2:104, (1995).

Hernández M.A., Rodríguez V.H., Rivera, C.E y García G.J.: Evaluación de una vacuna comercial emulsionada contra Influenza Aviar. Memorias V Jornada Médico Avícola. México, D.F., Abril 1995, pp 59-62. FMVZ, UNAM.

Hooper, P.T.: Lesions in chickens experimentally infected with H7N7 avian influenza virus. *Aust. Vet. J.* 66:155-156 (1989).

Hooper P.T., Russell G.W., Selleck P.W. and Stanislawek W.L.: Observations on the relationship in chickens between the virulence of some avian influenza viruses and their pathogenicity for various organs. *Avian Diseases* 39:458-464, (1995).

Jawetz E., Melnick J.L. y Adelberg E.A.: Microbiología medica. Editorial El manual moderno, S.A. de C.V., décimo quinta edición, pp. 555 - 567, México D.F. 1996

Kingsburry, W.D.: Orthomyxoviridae and their replication. In: *Virology*, Second Edition, editado por B.N. Fields, D.M. Knipe et al. Raven Press, Ltd., New York, 1990.

Kobayashi Y., Horimoto T., Kawaoka Y., Alexander D.J. and Itakura C.: Neuropathological studies of chickens infected with highly pathogenic Avian Influenza Viruses. *Journal Path* Vol. 114, 131-147, (1996).

Mickle T.R., Kinney N., Taylor J., Gettig R., Paoletti E., Swayne D.E., Beck J.R. and Webster R.G. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Ciencias Avícolas y la 45th Western Poultry Disease Conference, Cancún, Q.R. Mayo 1996. pp 448, ANECA.

Mo I.P., Brugh M., Fletcher O.J., Rowland G.N. and Swayne D.E.: Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with Avian Influenza Viruses of low and high pathogenicity. *Avian Diseases* 41:125-136, (1997).

Monroy, B.J., González, S.D., Hernández M.A. y García G.J.: Estudio diferencial de signos clínicos y lesiones producidas por dos cepas de virus altamente patógeno de Influenza Aviar en tres estirpes de pollos. *Vet. Méx.* 26, suplemento 2:101 (1995).

Murphy, R.B. and Webster, G.R.: Orthomyxoviruses. In *Virology*, Second Edition, Edited by: Fields, L.N., and Knipe, D.M. Raven Press, Ltd. New York, 1990.

Narayan O.: Pathogenesis of lethal influenza virus infection in turkeys, II. Central nervous system phase of infection. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 32, 51-71, 1972.

Perdue, L.M., García M, Crawford, J., and Latimer, J.: Heterogeneidad en la proteína de la hemoaglutinina entre los aislamientos del virus de influenza aviar H5N2 procedentes del centro de México. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45th Western Poultry Disease Conference, Cancún, Q.R. Mayo 1996. pp 8-13, ANECA, WPDC.

Rodríguez V.H., Beltrán R.J., Diosdado V.F., Socci E.G., Morilla G.A., y García, G.J.: Estudio comparativo sobre la eficiencia de la aplicación de la vacuna de Influenza Aviar en pollos al día de edad y a los 8 días de edad. *Vet. Méx.* 26, suplemento 2:105 (1995).

Rott, R.: The pathogenic determinant of influenza virus. *Vet. Microbiology* 33:303-310, (1992).

SAGAR: La Influenza Aviar en México, Memoria. Subsecretaría de Agricultura y Ganadería, pp 23 - 27, México D.F. 1997.

Senne, A.D., Rivera, C.E., Panigrahy, B., Fraire, M., Kawaoka, Y., and Webster, G.R.: Caracterización de avian influenza H5N2 isolates recovered from chickens in Mexico. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Ciencias Avícolas y la 45th Western Poultry Disease Conference, Cancún, Q.R. Mayo 1996. pp 5-8, ANECA. WPDC.

Shalaby, A.A., Slemons, R.D. and Swayne, D.E.: Pathological studies of A/chicken/Alabama/7395/75 H4N8 influenza virus in specific-pathogen-free laying hens. *Avian Diseases* 38:22-32, (1994).

Shane, S.M.: El diagnóstico de algunas enfermedades aviarias emergentes y significativas. *Tecnología Avípecuaria*, 7(86): 14, (1995).

Shane, S.M Situación Actual de la Influenza Aviar en el mundo. Memorias del Séptimo curso de actualización Avi-Mex, pp 60 - 69, México D.F. 1995.

Slemons, R.D., Locke, L.N., Sheerar, G.M., Duncan, R.M., Hinshaw, S.V., and Easterday, B.C: Kidney lesions associated with mortality in chickens inoculated with waterfowl influenza viruses. *Avian Diseases* 34: 120-128 (1990)

Slemons, R.D. and Swayne D.E.: Replication of a waterfowl-origin influenza virus in the kidney and intestine of chickens. *Avian Diseases* 34:277-284, (1990).

Soto, P.E.: Influenza Aviar. Memorias del Sexto curso de Actualización Avi-Mex, procesos patológicos que afectan la productividad avícola e Influenza Aviar. pp 69 - 75, México D.F. 1994.

Swayne, D.E., Perdue, M.L., García, M., Rivera, C.E., Brugh, M.: Pathogenicity and Diagnosis of H5N2 Mexican Avian Influenza Viruses in chickens. *Avian Diseases* 1997 (en prensa)

Swayne, D.E., Radin, M.J. Hoepf, T.M. and Slemons, D.R.: Acute renal failure as the cause of death in chickens following intravenous inoculation with avian influenza virus A/chicken/Alabama/7395/75 (H4N8). *Avian Diseases* 38: 151-157, (1994).

Swayne, D.E., and Slemons, D.R.: Comparative pathology of a chicken-origin and two duck-origin influenza virus isolates in chickens: The effect of route of inoculation. *Vet Pathol* 31: 237-245, (1994).

Swayne, D.E., and Slemons, D.R.: Evaluation of the kidney as a potential site of avian influenza virus persistence in chickens. *Avian Diseases* 36:937-944 (1992).

Tavera C.S, Valladares et al.: Reporte de los casos de diagnóstico remitidos al Departamento de Producción Animal:Aves. IV jornada Médico-Avícola, FMVZ, UNAM, México 1993.

Van Campen, H., Easterday, C.B., and Hinshaw, S.V.: Destruction of lymphocytes by a virulent avian influenza A virus. *J. gen. Virol.* 70:467-472 (1989).

Villegas P.: Calidad total en los programas de vacunación. *Avicultura Profesional*, 14 (.2): 50 (1996).

Webster, G.R, Kawaoka, Y., Taylor, J., Weinberg, R., and Paoletti, E.: Efficacy of nucleoprotein and haemagglutinin antigens expressed in fowlpox virus as vaccine for influenza in chickens. *Vaccine* 9: 303-308 (1991).

Webster, G.R., Bean, J.W., Gorman, T.O., Chambers, M.T., and Kawaoka, Y.: Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews* 56:152-179 (1992).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**