

88



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**“INMUNOLOGIA VETERINARIA APLICADA:  
ENFERMEDAD DEL PICO Y DE LAS PLUMAS DE LOS  
PSITACIFORMES”**

**TRABAJO DE SEMINARIO**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A :**

**Rodrigo Alejandro Ramírez Hernández**

**Asesor: M.C. Juan Carlos del Río García**

**CUATITLAN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2002**



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 CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES-CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

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

Con base en el art. 51 del Reglamento de Exámenes Profesionales de la FES-Cuautitlán, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de Seminario

Inmunología Veterinaria Aplicada "Enfermedad del pico y de las plumas  
de los Psittaciformes"

que presenta al pasante Rodrigo Alejandro Benítez Hernández  
con número de cuenta: 9139947-B para obtener el título de  
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VISTO BUENO

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Septiembre de 2002

MODULO	PROFESOR	FIRMA
I	M.C. Juan Carlos del Rio Garcia	
II	Q.F.B. Juana Alicia Alguicira Camacho	
III	Dr. Andrés Romero Rojas	

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## **INDICE**

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Justificación</b>	<b>2</b>
<b>Introducción</b>	<b>4</b>
<b>Etiología</b>	<b>7</b>
<b>Transmisión</b>	<b>8</b>
<b>Periodo de incubación</b>	<b>9</b>
<b>Morbilidad</b>	<b>10</b>
<b>Mortalidad</b>	<b>10</b>
<b>Enfermedad clínica</b>	<b>11</b>
<b>Cuadro hiperagudo</b>	<b>14</b>
<b>Cuadro agudo</b>	<b>15</b>
<b>Cuadro crónico</b>	<b>16</b>
<b>Lesiones macroscópicas</b>	<b>17</b>
<b>Lesiones microscópicas</b>	<b>23</b>
<b>Patogenia</b>	<b>28</b>
<b>Inmunidad</b>	<b>30</b>
<b>Diagnóstico</b>	<b>35</b>
<b>Tratamiento</b>	<b>44</b>
<b>Control</b>	<b>46</b>
<b>Vacunación</b>	<b>46</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>48</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>50</b>

## ENFERMEDAD DEL PICO Y DE LAS PLUMAS DE LOS PSITACIFORMES

### RESUMEN

En la década de los 70's se describe en los psitácidos una enfermedad caracterizada por alteraciones en el plumaje y pico, ocasionalmente se afectan las garras y finalmente sobreviene la muerte. Se le conoció inicialmente como Síndrome de la Enfermedad del Pico y las Plumas de los Psitácidos y en el perico australiano se le refirió como Muda Francesa, posteriormente al conocerse el agente etiológico, un virus DNA de 14 a 17 nm, se le nombró Psittacine Beack and Feather Disease (Pbfd) o Enfermedad del Pico y de las Plumas de los Psitaciformes (EPPP). Actualmente se especula que los primeros reportes de la enfermedad tratan del año 1888 en aves Australianas. El virus ha sido asociado como causa de degeneración o necrosis de órganos linfoides e inmunosupresión.

Históricamente esta enfermedad se restringía solo a psitácidos del viejo mundo y Pacífico sur, actualmente se ha reportado en aves cautivas de EEUU, Brasil, Europa y en aves silvestres de Sudamérica y África. En México no existen datos sobre la enfermedad. Para inicios de los 90's se reportaba en poco más de 35 especies de psitácidos.

El tratamiento hasta la fecha a sido sólo de mantenimiento y está dirigido solamente contra las infecciones secundarias, actualmente se habla de tratamientos que quizá lleguen a ser de utilidad para tratar a los pacientes con esta enfermedad, por otro lado, se ha trabajado ampliamente en diversos laboratorios para desarrollar vacunas efectivas y seguras que protejan sobre todo a las crías contra la enfermedad.

## JUSTIFICACIÓN

En el caso de aves psitácidas mexicanas se le puede considerar como un serio riesgo para la mayoría de las especies, debido a aspectos como son; la elevada mortalidad reportada en infantes<sup>5,11,16,23,26,34,36,37,40</sup>, la presentación crónica y de portador en adultos<sup>9,11,16,17,14</sup>, a que no se a encontrado un tratamiento efectivo para la enfermedad<sup>5,11,14,15,16,54</sup>, y a que no se ha desarrollado una vacuna efectiva y segura que ofrezca protección contra la enfermedad<sup>30,37</sup>, estos hechos marcan la importancia de difundir los datos existentes hasta la fecha para tratar de prevenir de esta enfermedad a una importante población de la fauna mexicana.

Estas especies pueden estar corriendo el mismo riesgo de contraer la enfermedad, ya que entre las especies reportadas como infectadas están; *Amazona autumnalis* (Loro cachete amarillo)<sup>11,18,39,20,47</sup>, *Ara macao* (Guacamaya roja)<sup>11,12</sup>, *Amazona ochrocephala oratrix* (Loro cabeza amarilla)<sup>34,38</sup>, *Amazona ochrocephala auropalliata* (Amazona nuca amarilla)<sup>18</sup> y psitácidos de Sudamérica como el *Pionus sordidus* (Loro pico rojo)<sup>11</sup>, *Amazona aestiva* (Loro verde del Amazonas)<sup>10,39</sup>, *Ara chloroptera* (Guacamayo de alas verdes)<sup>5,18</sup> y *Amazona leucocephala* (Amazona cubana)<sup>47</sup>.

Se desconoce exactamente el rango de hospedadores del virus de la Enfermedad del Pico y las Plumas de los Psitaciformes (VEPPP)<sup>17,34,36,38</sup>, no obstante, el VEPPP se a reportado solo en aves del Orden Psitaciformes<sup>11,12,14,15,16,17,46,39</sup>. El virus a sido demostrado en aves cautivas de EEUU<sup>36,57</sup>, Brasil<sup>60</sup> y Europa<sup>37,33</sup>, reportándose también en aves silvestres de Sudamérica, África<sup>46</sup>, Australia y el Pacífico sur<sup>11,16,27,21,22,31,23,26,46,36,37,50,51</sup>, mientras que en México no existen datos sobre la enfermedad, además de que es prácticamente desconocida.

Otro factor importante para considerar el estudio de esta enfermedad es el hecho de que existe un comercio mundial muy grande, con la introducción al país de aves como son; *Agapornis sp.* (Inseparables), *Nymphicus hollandicus* (Ninfas)<sup>11</sup>, *Cacatua sp.* (Cacatúas), y *Ara sp.* (Guacamayas), etc., en los cuales se debe poner un mayor énfasis en cuanto al control zosanitario para asegurar la protección de las poblaciones existentes en el país<sup>37</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Hablando en términos de taxonomía, los psitácidos son todos aquellos considerados dentro del Orden de los Psitaciformes, conformado por las familias Psittacidae, Cacatuidae y Loridae, y que está comprendido dentro de la Clase Aves<sup>44,11</sup>.

Los psitácidos se caracterizan por tener un pico curvado, mandíbula superior articulada con el cráneo, que junto con la mandíbula inferior sirven para sujetar el alimento y limpieza de semillas, su lengua es usualmente gruesa y se forma de un paquete muscular muy fuerte que también sirve para manipular objetos, el cuarto dedo (o dedo lateral) está dirigido hacia atrás, así como el primer dedo (dedo medial), el segundo y el tercero van hacia adelante llamándosele a esta conformación zigodactilia, y juntos forman una pinza para facilitarle trepar y sostener semillas, alimentos u otros objetos<sup>11</sup>.

De las 352 especies de psitácidos reportados en el mundo, México cuenta con 22<sup>25,44</sup>. La totalidad de estas, excepto tres especies, se encuentra listadas en los apéndices I y II de la Convención para el Comercio Internacional de Especies en Peligro CITES (Convention on International Trade in Endangered Species). Por otra parte, organismos internacionales como The World Conservation Union (UICN), incluyen en su listado a *Rhynchopsitta pachyrhyncha* (Cotorra serrana occidental), *Rhynchopsitta terrisi* (Cotorra serrana oriental), *Amazona oratrix* (Loro de cabeza amarilla) endémica de México en tres de sus subespecies y *Amazona viridigenalis* (Loro tamaulipeco) endémica del noroeste de México como vulnerables y *Aratinga brevipes* (Perico de Socorro) endémico de la Isla Socorro como raro. Una publicación reciente por parte de UICN titulada "Parrots: Status Survey and Conservation Actino Plan 2000-2004" enlista a seis especies de psitácidos mexicanos en alguna



categoría de riesgo: *Amazona oratrix*, *Rhynchopsitta pachyrhyncha* y *Amazona viridigenalis* como amenazadas, como vulnerables *Ara militaris* (Guacamaya verde), *Rhynchopsitta terrisi* y *Aratinga brevipes*, y propone a *Amazona auropalliata* (Loro nuca amarilla) como vulnerable y *Ara macao* como especie amenazada<sup>25</sup>.

Otras especies que se encuentran dentro del territorio nacional son; *Aratinga holochlora* (Perico verde mexicano) y *Forpus cyanopygius* (Periquito mexicano) ambos endémicos de México, *Amazona xantholora* (Loro Yucateco) endémico de Yucatán, *Amazona finschi* (Loro corona violeta) endémico del oeste de México, *Aratinga streruca* (Perico controamericano)<sup>25</sup>, *Bolborhynchus lineola* (Perico barrado)<sup>25</sup>, *Brotogeris jugularis* (Perico ala amarilla)<sup>25</sup>, *Pionopsitta haematotis* (Loro cabeza oscura)<sup>25</sup>, *Aratinga astec* (Perico pechisucio), *Aratinga canicularis* (Perico frentinaranja), *Pionus senilis* (Loro corona blanca), *Amazona albifrons* (Loro frentiblanco), *Amazona autumnalis* y *Amazona farinosa* (Loro verde)<sup>44</sup>.

En inicios de la década de los 70's una enfermedad de los psitácidos caracterizada por alteraciones en el plumaje y pico, en donde ocasionalmente se afectan las garras y finalmente sobreviene la muerte<sup>11,16,17,21,22</sup>, es considerada en 1981 por Perry R.A. como un síndrome de distrofia, pérdida de plumas y deformaciones del pico en psitaciformes y le nombra "Síndrome de la Enfermedad del Pico y las Plumas de Psitácidos"<sup>23,15</sup>, posteriormente al conocerse el agente etiológico se le conoce como Psittacine Beak and Feather Disease o Enfermedad del Pico y de las Plumas de los Psitácidos<sup>16</sup>; sin embargo, se especula que los primeros reportes de la enfermedad tratan de inicios de siglo en aves Australianas<sup>10,11,16,17</sup>. En *Melopsittacus undulatus* (Perico australiano) se le refirió como Muda francesa en 1975 por Arnall y Keymer<sup>23,51</sup>, actualmente el término Muda francesa se refiere solo a la alteración del

plumaje y se ha comprobado que dicha alteración es producida por más de un agente etiológico<sup>7,10,11,14,20,37,40,51</sup>.

Suele afectar animales jóvenes causándoles la muerte y cursar de forma crónica en adultos; no obstante, son susceptibles a esta enfermedad animales de todas las edades en diferentes formas clínicas con cuadros sobreagudos, agudos y crónicos. El pronóstico es casi siempre fatal en jóvenes con las formas sobreagudas y agudas<sup>11,16,23,34,36,37</sup>.

Históricamente esta enfermedad se restringía solo a psitácidos del viejo mundo y Pacífico sur, considerándose enzootica para las aves silvestres de este lugar, como son; *Cacatua galerita* (Cacatúa cresta sulfurada), *Eolophus roseicapillus* (Galah)<sup>21,50,39</sup> y *Trichoglossus haematodus* (Loros arcoiris)<sup>11,16,21,30,31,26,36,37,39,60</sup>, y quizás sea la enfermedad más frecuente en aves psitácidas cautivas en Australia<sup>27,22,31,23,26,51,36</sup>, además de que probablemente fue la causa del primer brote de una epizootia en psitácidos silvestres en Australia<sup>31</sup> la cual fue referida por Asbhy en 1907, quien atribuye la declinación en la población de *Psephotus haematotonotus* (Perico cola roja) ocurrida entre 1887 y 1888 en Australia a una enfermedad de "anormalidades" de las plumas que les imposibilitaba el vuelo<sup>31,10,56</sup>. La enfermedad se ha reportado en psitácidos del nuevo mundo, incluidos los géneros *Ara sp.*, *Amazona sp.*, y *Pionus sp.*<sup>11,12,16,17,37,46</sup>.

## ETIOLOGÍA

Se trata de un virus icosaedro no envuelto de 14 a 17 nm (10 a 17 nm<sup>47,32</sup>), conteniendo una molécula simple circular de DNA de aproximadamente 1.7 a 2.0 kilobases<sup>38,34,38,11,16,39,46</sup>.

Se considera un virus epiteliotrópico<sup>28,26,23,17</sup> y gonadotrópico<sup>17</sup>, frecuentemente asociado como causa de degeneración o necrosis de órganos linfoides<sup>11,33</sup>, cuadros de hepatitis aguda en infantes<sup>40,26</sup> y leucopenia en *Psittacus erithacus* (Loro gris africano)<sup>40,48</sup>. Por el momento ha sido colocado en la familia Circoviridae junto con el Virus de la Anemia de los Pollos (VAP) y el Circovirus Porcino (CP)<sup>28,36</sup> y muy probablemente se le agregue el Circovirus de la Paloma<sup>46,47</sup>, siendo los virus más pequeños reportados en animales<sup>46,16,9</sup>.

Las infecciones con cada uno de estos cuatro circovirus se asocian con procesos potencialmente fatales, en los cuales las alteraciones provocadas por el virus en el tejido linfoide y la inmunosupresión de los individuos son características comunes<sup>20,46,11,9,33,47</sup>.

Existen reportes que hablan de nuevos circovirus encontrados en cabras con cuadros respiratorios y abortos<sup>9</sup>, y otro asociado a cuadros hepáticos postransfusionales en el caso de humanos<sup>46</sup>.

El sitio primario exacto de replicación es desconocido<sup>11</sup>, se ha postulado a la bolsa de Fabricio como un sitio primario de replicación<sup>26,51</sup>. La excreción es principalmente a través de plumón<sup>11,16</sup> y heces del paciente<sup>30</sup>. En los reportes se toma en consideración al VAP y el CP que se replican en el núcleo de las células del hospedador<sup>11,9</sup>. Pese a diversos trabajos el virus no ha podido ser replicado *in vitro*<sup>23,28,33,37,51</sup>.

## TRANSMISIÓN

### Vertical

Bajas concentraciones del virus han sido recuperadas del buche de aves diagnosticadas positivas a EPPP con lo cual se cree que ésta sea una forma de transmisión a las crías<sup>11,16,17,33,38</sup>. Otra vía que se ha postulado es a través de ovario u oviducto, ya que existe evidencia de que estos son infectados<sup>17,57</sup>, además de las observaciones en crías de madres *Cacatua sanguinea* (Cacatúa corella) virus positivas, que posterior a incubación y alimentación artificial desarrollaron la enfermedad<sup>11,16,17</sup>.

Se plantea que el virus observado en las muestras del buche se originó quizás en células infectadas del mismo órgano o en el epitelio del esófago, e incluso puede que se deposite aquí después de deglutir epitelio exfoliado del pico o de lesiones de la mucosa bucal, con lo cual se puede considerar la posibilidad de que un adulto transmita el virus a los recién nacidos durante la alimentación que incluye la regurgitación del alimento y con ello epitelio de exfoliación del tracto digestivo<sup>11,16</sup>.

### Horizontal

Experimentalmente se ha logrado la infección a través de las vías oral, intracloacal e intranasal, sugiriendo con esto que se dé una transmisión de forma natural por estas vías<sup>16,34,51,38</sup>.

Altas concentraciones del virus han podido ser demostrado en el polvo (restos celulares) de las plumas colectadas de salas en donde se mantuvieron alojadas aves con el cuadro clínico de la enfermedad, las cuales, a pesar de

haber sido limpiadas y desinfectadas, segulan conteniendo partículas virales, debido principalmente al sistema de ventilación contaminado<sup>11</sup>, implicando esto que el polvo contaminado de cualquier fuente es un vehículo para la persistencia ambiental y la transmisión natural del virus<sup>36,16,17,37</sup>. Se ha postulado que la presencia de cuerpos de inclusión viral en tejidos del paladar, esófago, buche, intestino e hígado sea la causa de la diseminación viral en heces<sup>17,11,16,38</sup>.

Un pequeño número de aves puede eliminar el virus y posiblemente quedar como portador diseminando partículas virales<sup>17,16,11</sup>.

## PERÍODO DE INCUBACIÓN

En un experimento para determinar el periodo de incubación se determinó que éste es de entre 21 a 25 días<sup>34,37</sup>, mientras que en otros trabajos se observó un periodo de incubación en crías de *Cacatua roseicapilla* de 4 semanas<sup>51,26</sup>, mientras que utilizando pruebas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en sangre se han comprobado periodos de 18 meses<sup>16</sup>, actualmente se a determinado que puede ser de años<sup>5,23,16,11,12,47</sup>, esto puede atribuirse a distintas concentraciones de anticuerpos transmitidos por la madre, el titulo de virus infectante o la repuesta del huésped ante el virus<sup>34,11,16</sup>. El aspecto del plumaje de las aves dependerá en gran medida de la edad del individuo, así como de la etapa de desarrollo de las plumas al momento de la infección<sup>14</sup>. Actualmente se considera que aves que presentan signos clínicos en una etapa avanzada de vida se hayan infectado a una edad más joven y permanecido con una infección latente<sup>34,51</sup>.

## MORBILIDAD

En la literatura consultada no se reportan datos sobre el porcentaje de morbilidad. En estudios de infección experimental se sugiere una susceptibilidad al virus relacionada con la edad<sup>34</sup>; no obstante, es probable que este resultado se haya debido quizá a monitoreos durante periodos inapropiados de las aves, sin que influya la edad de las mismas al momento de la infección<sup>51,11,14,16</sup>.

En contraste a los cuadros fatales, se ha observado que en un pequeño grupo de aves en los que solo se observaron cuerpos de inclusión intranucleares en células epiteliales hubo una recuperación espontánea, no obstante, éstos casos deberán continuarse observando a fin de detectar recurrencia de la enfermedad<sup>17</sup>.

## MORTALIDAD

La muerte ocurre posterior a los cambios inducidos por bacterias oportunistas, hongos, clamidias, y otros agentes virales, o por cambios terminales que producen severa pérdida de peso, y en los cuales se requiere de eutanasia<sup>11,14,15,16,9</sup>.

La sobre vivencia de un ave se ha determinado en un promedio de 6 meses a un año después de la presencia de los signos clínicos<sup>5,26</sup>. En el caso de crías de entre 48 y 208 días de edad, la mortalidad fue evaluada en 100%<sup>26,40</sup>. Muchas aves infectadas han llegado a sobrevivir de 6 meses a un año o menos después de la infección, y se sabe de algunas aves que sobreviven 10 años o quizás mucho más en un estado de pérdida de plumas<sup>9,11,16,17,14</sup>.

El pronóstico de recuperación es más favorable en caso de especies como: *Melopsittacus undulatus*, *Agapornis sp.*, *Trichoglossus sp.*<sup>15,16,17,36,56</sup>, *Pionus sp.* y *Ara sp.*<sup>11,16</sup>, en los cuales se observaron lesiones de la enfermedad con una recuperación aparente. Existe otro reporte de recuperaciones espontáneas en aves sudamericanas<sup>55</sup>.

Se a observado que generalmente pacientes que desarrollan cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en macrófagos tienen un cuadro progresivo y mortal<sup>17,36</sup>, mientras que aves que presentan solamente cuerpos de inclusión intranucleares en células epiteliales tienen recuperaciones espontaneas<sup>36</sup>; sin embargo, esto no siempre ocurre<sup>11</sup>.

## ENFERMEDAD CLÍNICA

Al parecer la enfermedad se ha podido estar confundiendo con otras enfermedades o diagnosticándose erróneamente ya que los casos de plumaje anormal forman parte de las alteraciones más comunes en estas especies, estos factores sumados al desconocimiento de la enfermedad hacen que se confunda con cuadros de estrés, malnutrición, alergias, cuadros psicológicos o fisiológicos, disfunciones endocrinas o metabólicas, parasitosis o infecciones virales como poliomavirus y adenovirus<sup>12,32,37</sup>, intoxicaciones por metales pesados, reacción a medicamentos<sup>37</sup>, etc. debiendo establecerse diversos diagnósticos diferenciales<sup>7,5,12,14,15,17,23,26,32,33,36,20,6,54,55</sup>.

La enfermedad se caracteriza básicamente por distrofia progresiva simétrica de las plumas, deformación de pico y ocasionalmente garras. Generalmente las primeras plumas en verse afectadas son las productoras de polvo o plumón, seguidas por las del contorno o coberteras, las plumas se

observan distróficas y detienen su desarrollo poco después de emerger del folículo<sup>14,15,16,12,10,5,17,22,23,34,36,37,38,57</sup>.

Generalmente la EPPP es una enfermedad de aves jóvenes, es decir, de menos de 3 años de edad<sup>22,23,36,38,51,54,57</sup>, aunque individuos adultos de entre 10 y 20 años de edad pueden desarrollar signos clínicos, en este caso las aves adultas quizás fueron infectadas de jóvenes, manteniendo la infección en estado latente<sup>11,14,17</sup>, además de que en el adulto se ha observado que la enfermedad no es altamente mortal como ocurre en los jóvenes<sup>9,30,34</sup>. En un estudio difundido por la Universidad de Georgia se señala que en el periodo comprendido entre 1980 y 1996 la EPPP fue una de las tres principales enfermedades virales en psitácidos examinados, afectando principalmente a las cacatúas<sup>57</sup>.

El primer signo de la EPPP en aves no infantiles es la aparición de plumas distróficas y necróticas. El patrón de distrofia y pérdida de plumas es variable y se relaciona probablemente con la etapa del desarrollo de la pluma cuando inician los signos clínicos, la edad del individuo y la especie afectada. En aves jóvenes pueden afectarse todos los trayectos de plumas en el transcurso de una semana, en tanto que en aves mayores la enfermedad tiene un inicio de presentación más prolongado, teniendo cambios progresivos en las plumas durante las siguientes mudas<sup>11,23,14,15,22,17,37</sup>.

En pollos inoculados experimentalmente durante los primeros días de vida, no se desarrollan alteraciones en las plumas al momento de la muerte<sup>21</sup>, mientras que en algunas crías en edad de cambio del plumón por plumas, todo el tracto de las mismas se vio afectado en el transcurso de una semana<sup>37</sup>.



Si se desarrollan alteraciones del pico, estas pueden incluir; necrosis palatina, elongación progresiva, fracturas transversas o longitudinales, necrosis e inflamación del epitelio de revestimiento de la lengua, cavidad del pico y buche<sup>22,14,23,17,36,38</sup>, mientras que otras llegan a mostrar alteraciones semejantes a las del pico en las garras<sup>21,5</sup>, incluso la caída de las mismas<sup>5</sup>.

Por un lado algunas aves manifiestan heces de color verde brillante y uratos<sup>30,26,50</sup>, mientras que otras ocasionalmente tienen diarreas intermitentes sin cambios de color<sup>50</sup> y que no responden al tratamiento manteniendo un apetito normal<sup>38</sup>. En el caso de la piel se ha observado en algunos ejemplares un tono verde claro periorbital asociado a hepatitis<sup>26,40</sup>, mientras que en otras se reporta que la piel desnuda toma un aspecto oscuro<sup>5,22,23,8</sup>.

En *Psittacus erithacus* con cuadro hiperagudo (sin presentar alteraciones en el plumaje o pico) se reportan datos sobre Aspartato aminotransferasa (AST) y Creatín quinasa (CK) que al compararlos con los resultados biliares se observan datos altamente sugestivos de daño hepático<sup>40,48</sup>, en la misma especie se reporta una anemia no regenerativa severa<sup>40,43</sup> con típicos cuerpos de inclusión en la médula ósea<sup>11,36</sup> y leucopenia severa<sup>40</sup> (con linfopenia<sup>48</sup>), observada también en cacatúas<sup>14</sup>; sin embargo, no se ha determinado si esto ocurre como causa de la misma infección viral o es el resultado de patógenos secundarios<sup>11</sup>. Se sabe que algunas aves con cuadro crónico solo manifestaron lesiones clásicas de candidiasis<sup>5</sup>, aspergilosis<sup>42</sup> y criptosporidiosis<sup>11,17,19,50</sup>.

Basado en las marcadas diferencias en la presentación clínica de la enfermedad se describen 3 cuadros clínicos; hiperagudo, agudo y crónico<sup>11,14,16,34,36,37</sup>.

**CUADRO HIPERAGUDO**

Esta puede ser la causa de muerte en crías de menos de 6 meses de edad que muestran signos de septicemia, neumonía, enteritis, rápida pérdida de peso y muerte<sup>11,16,23,26,32,40,42,21</sup>, además de severa leucopenia, anemia o pancitopenia sin las alteraciones clásicas en el plumaje o pico<sup>40,42</sup>, como lo mostró un estudio con 14 crías de *Psittacus erithacus* de menos de 6 meses de edad diagnosticadas con VEPPP, en donde el principal hallazgo fue una extensiva necrosis hepatocelular<sup>26,40</sup>. Estudios por medio de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI) demuestran que en este cuadro hay poca respuesta humoral al momento de la muerte, mientras que en algunos individuos ni siquiera es detectable<sup>26</sup>.

Las alteraciones en las plumas suelen no ocurrir, o pueden estar simplemente limitados a un edema en el epitelio folicular si es que existen alteraciones<sup>14,22,23,26,43,40,37</sup>.

El diagnóstico de EPPP en cuadros hiperagudos puede pasarse por alto si no se lleva a cabo una necropsia completa, pruebas PCR y un examen histológico exhaustivo en aves que mueren, y que, ya sea provengan de un lugar sospechoso, o con signos clínicos que nos puedan hacer pensar en la enfermedad<sup>11,16,26,40,37</sup>. En caso de *Psittacus erithacus* la muerte puede ocurrir en 2 semanas de iniciar la presentación clínica, y en ésta misma especie el timo puede incluso no ser identificado debido probablemente a una severa atrofia<sup>40</sup>.

## CUADRO AGUDO

Es más frecuentemente reportada en aves jóvenes o crías durante la primer formación de plumas después del reemplazo de plumón, pollos jóvenes de 28 a 32 días de edad se han reportado con lesiones clásicas, en Australia a esta presentación se le conoce comúnmente como muda francesa<sup>17,34,37</sup>.

Este tipo de presentaciones se caracteriza por varios días de depresión, seguidos de cambios en las plumas en desarrollo que incluyen; necrosis, fracturas, arqueamiento, hemorragia y desprendimiento de las plumas enfermas. En algunos casos las aves con alteraciones mínimas en las plumas pueden estar deprimidas, presentar éstasis del buche, diarrea y morir en el transcurso de una o dos semanas<sup>11,16,17,32</sup>, aunque de manera excepcional algunos podrán recuperarse<sup>30,56</sup>.

Las lesiones a simple vista de las plumas en la forma aguda de la enfermedad pueden ser muy sutiles, con sólo algunas plumas que muestran alteraciones distróficas, ésta presentación es en particular común en crías de *Cacatua galerita* y *Agapornis* sp.<sup>11,16,34,26</sup>.

Un neonato de *Cacatua riseicapilla* infectado experimentalmente desarrolló depresión y anorexia aproximadamente 4 semanas post infección, un día antes de iniciar los signos las plumas se mostraban con pérdida de brillo, pálidas y quebradizas<sup>51</sup>, casos similares se han reportado en crías de *Psittacus erithacus* y *Cacatua alba* (Cacatúa de moño blanco), observando que hay una variación en la aparición de signos clínicos<sup>34</sup>.

Los polluelos que inician el desarrollo de las lesiones clínicas cuando la mayor parte del plumaje se encuentra aún en desarrollo, presentan la

alteración de las plumas de forma más severa, pudiendo estas parecer completamente normales un día y presentar en el transcurso de una semana una distrofia del 80 a 100 % y morir en el transcurso de 1 o 2 semanas más<sup>23,34,17</sup>.

La progresión clínica de la enfermedad es más evidente en las plumas de jóvenes que en recién nacidos. En aves que desarrollan signos clínicos después que han madurado las plumas del contorno corporal, se presentan alteraciones que pueden limitarse a las remeras y timoneras, siendo probablemente debido a que son éstas las últimas en desarrollar<sup>11,18</sup>.

Una característica muy constante en este cuadro a sido el daño hepático<sup>15,26</sup> el cual se presenta de forma lenta, además de ser evidentes las heces color verde brillante<sup>26,40,30,56</sup> con coloración verdosa en región peri oftálmica asociado al cuadro hepático<sup>26,40</sup>, ocasionalmente se han observado cuadros nerviosos secundarios a hepatitis aguda<sup>30</sup>.

## **CUADRO CRÓNICO**

Este cuadro se caracteriza por la aparición progresiva de plumas anormales durante las mudas del plumaje, las alteraciones a simple vista incluyen retención de la vaina de la pluma, hemorragia dentro de la cavidad de la pulpa, fracturas del cañón proximal del raquis y falla de las plumas para desenvainarse, también puede haber plumas cortas con extremos anchos, plumas deformadas en rizos, líneas de estrés entre las barbas y constricciones circunferenciales<sup>11,14,16,51,37</sup>.

Las plumas de reemplazo en cada muda son cada vez más anormales. Si las aves viven lo bastante, paulatinamente presentan calvicie a medida que los folículos de las plumas se tornen inactivos<sup>11,16,34,37</sup>.

A excepción de los casos reportados en *Melopsittacus undulatus*, *Agapornis sp.*, *Trichoglossus sp.*<sup>15,16,17,36,56</sup>, *Pionus sp.* y *Ara sp.*<sup>11</sup>, en los cuales se a reportado la recuperación, se considera que la enfermedad es mortal para los psitácidos<sup>11,15,16,17,36</sup>.

En infecciones secundarias de picos lesionados se han aislado frecuentemente bacterias y hongos, los cuales se cree que estas pueden estar asociadas con reacciones inflamatorias de tipo crónico o agudo<sup>14,23</sup>.

Algunos de los ejemplares que han mostrado la enfermedad han sobrevivido durante años mostrando alteraciones en el plumaje<sup>9,14,38</sup>, mientras que se ha observado que aves que presentan solamente cuerpos de inclusión intranucleares en células epiteliales ocasionalmente tienen recuperaciones espontáneas<sup>36</sup>.

## LESIONES MACROSCÓPICAS

### Órganos

Las lesiones internas son variables y difieren con factores como; especie, edad, tiempo de presentación y tipo de infección secundaria<sup>14,15,17,22</sup>. En aves jóvenes la bolsa de Fabricio puede estar atrófica, con los pliegues poco desarrollados, el timo puede revelar pequeños lóbulos con tejido necrótico<sup>14</sup>. En crías de *Psittacus erithacus* con muerte aguda el timo puede incluso no ser identificado debido probablemente a una severa atrofia<sup>40</sup>.

mientras que en aves adultas el bazo esta frecuentemente reducido<sup>11</sup> con disminución de linfocitos, y ocasionalmente necrosis de células reticulares<sup>11</sup>, y en algunas otras crías se ha reportado esplenomegalia<sup>26,40</sup>.

En la necropsia practicada a una *Cacatua moluccensis* (Cacatúa de las molucas) de 8 meses de edad que manifestaba alteración del pico y plumaje, y que a petición del dueño se le sacrificó, no se encontró ninguna lesión específica en órganos, solamente una ligera inflamación de pulmones, hígado, riñones y bazo<sup>5</sup>, semejantes resultados se han reportaron en diversas cacatúas con cuadro crónico<sup>14,15</sup>, en una *Cacatua galerita* de año y medio con cuadro crónico y lesiones clásicas, se encontró además ligera regurgitación biliar hacia la molleja, así como aspecto moteado del hígado, sin que alguna lesión tenga significado clínico<sup>14,15,19,22,51</sup>.

Se documentó también necrosis hepática en once de catorce ejemplares crías de *Psittacus erithacus* infectados experimentalmente, e infecciones secundarias en 9 de ellos, todos los hígados presentaron un color naranja pálido, ocasionalmente con focos necróticos visibles, 7 de los 14 presentaron esplenomegalia, los cambios en la bolsa fueron caracterizados por atrofia de folículos linfoides con ocasional necrosis focal e inclusiones basofílicas<sup>40</sup>, mientras que en un trabajo con crías de *Cacatua galerita* se observó el mismo patrón de lesiones<sup>20</sup>. En cuatro cacatúas con EPPP se diagnosticó criptosporidiosis observándose el tracto intestinal inflamado y con fluido verdoso, y necrosis de multifocal a difusa en hígado y bazo<sup>19</sup>.

Se sabe que el timo sufre de una regresión o involución conforme se presenta una madurez sexual, posteriormente en algunas aves se observa hipertrofia periódica posterior a la época de crianza, del mismo modo la bolsa de Fabricio puede experimentar una regresión en la madurez sexual, esta

involución normal puede estar asociada con decremento en el número de linfocitos, incremento visual en la prominencia de tejido conectivo del estroma y cambios quísticos normales observados en algunas aves; no obstante, la necrosis linfoide, la inflamación heterofílica y los cuerpos de inclusión observado en estos casos no son típicos y están mas bien asociados a infecciones tipo virales<sup>19</sup>.

## Plumas

En el caso del plumaje, la alteración suele ser simétrica, reemplazado progresivamente el plumaje normal con una o más alteraciones como son; retención de la funda de la pluma, sangre en la cavidad pulpar, cañón corto de la pluma, plumas rizadas y deformadas<sup>5,51</sup>, arqueamiento y constricciones circulares del raquis<sup>5,12,14,15,17,22,38,39,57</sup>, bandas o líneas de estrés en la plumas<sup>5,17,51</sup> y fragmentación de las barbas<sup>11,16,23</sup>, así como la pérdida total de la pluma<sup>14,15</sup>.

Los polluelos con cuadro agudo de la enfermedad pueden presentar alteraciones de las plumas en tan solo una semana y morir en el transcurso de dos a tres semanas<sup>23,34,17</sup>.

El patrón de distribución de plumas distróficas entre pterilos es variable y depende de la especie de ave y etapa de la muda cuando el ave comienza con la presentación de signos clínicos. En aves con la presentación clásica de la enfermedad el primer signo es la sustitución de algunas plumas coberteras (del contorno o plumas generales del cuerpo) y el plumón (plumas productoras de polvo localizadas por debajo de las plumas coberteras) por plumas distróficas, que dejan de crecer poco después de surgir del folículo y desarrollan malformaciones. La enfermedad progresa hasta incluir la mayoría

de las plumas coberteras, ocasionalmente seguido de cambios distróficas en plumas remeras (rémiges, plumas del vuelo o de las alas) primarias, secundarias, timoneras (de la cola o rectrices) y excepcionalmente las tectrices (plumas de la cresta)<sup>15,22,23</sup>. Las plumas primarias (de la región carpal al extremo distal del ala) y secundarias (numeradas del extremo distal al proximal del antebrazo) en el caso de aves adultas, suelen ser las últimas en presentar las alteraciones<sup>34,17,22,23,14,51,16</sup>, esto hace suponer que la susceptibilidad de las plumas coberteras se basa en el patrón de muda de las mismas, que es más frecuente en comparación con los otros tractos de pterilos<sup>14,11,16</sup>. En ocasiones las lesiones ocurren principalmente en la mayoría de las timoneras<sup>5,23</sup>.

El patrón de alteraciones en un ejemplar *Ara macao* no correspondieron al cuadro clásico<sup>12</sup>, sino que en contraste a la presentación clínica que se a descrito, la distrofia fue más evidentes en las plumas remeras y timoneras, como ocasionalmente ocurre en *Melopsittacus undulatus*<sup>21</sup>, en vez de las plumas del contorno y las productoras de polvo que son las comúnmente afectadas en las especies del Pacífico sur<sup>12</sup>, semejante patrón de alteraciones se ha visto en otras aves que presentan una mayor alteración en las plumas de las alas, cola y la cresta con solo algunos cambios en las plumas del contorno<sup>11,16,14,22</sup>, mientras que un *Eclactus sp.* no presentó ningún tipo de alteración en las plumas<sup>43</sup>. En el caso de crías inoculadas experimentalmente en los primeros días de vida éstas no desarrollan alteraciones en las plumas<sup>21</sup>, mientras que en algunas aves jóvenes de menos de dos meses de edad, todas las plumas pueden ser afectadas en el transcurso de una semana<sup>37</sup>. En pollos de días de edad infectados experimentalmente se puede observar los primeros signos de enfermedad durante el reemplazo del plumón<sup>34</sup>.

En algunos psitaciformes con plumas coloridas, pigmentaciones anormales han sido asociadas con las lesiones producidas por el VEPPP<sup>41</sup>, en



*Psittacus erithacus* las plumas afectadas pueden tomar un color rojo en vez de gris<sup>1,11</sup>, mientras que en otros pericos se observa un cambio de color en el plumaje de verde a amarillo<sup>8,56</sup>.

## Piel

En aves como la *Cacatua galerita* la piel desnuda toma un color oscuro<sup>5,23,8</sup>, cambio asociado a una melanosis debido a la exposición directa de la piel con los rayos solares<sup>22</sup>. Otro autor reporta el caso de tres ejemplares de *Cacatua galerita* con un ligero tono verde claro en la piel de la región perioftálmica<sup>26</sup>.

En aves de vida libre con severa alteración en las plumas la piel puede tener un color marrón, que como se comentó anteriormente puede haber sido desarrollada por la exposición de la piel que normalmente estaría protegida por el plumaje contra la exposición directa de los rayos solares<sup>11,22</sup>. A pesar de estos argumentos la razón de los cambios de color no es del todo clara<sup>23</sup>.

La necrosis del epitelio folicular no es un hallazgo comúnmente reportado<sup>11,41</sup>, una dermatitis granulomatosa con formación de vesículas fue descrito en un grupo de *Agaporni sp.* infectados<sup>11</sup> y en una *Cacatua galerita* se observó también la formación de abscesos foliculares<sup>15</sup>, una dermatitis perifolicular crónica de células mononucleares se reportó en una *Cacatua sulphurea*, y una inflamación crónica focal en la dermis interfolicular en *Agapornis sp.*, en algunos casos la inflamación tipo granulomatosa produjo nódulos notablemente visibles<sup>23</sup>.

## Pico

En la presentación clásica de la enfermedad que ha seguido un curso crónico pueden darse casos donde la alteración del pico sea mucho mayor que en el plumaje<sup>11,14,16</sup>, no obstante, dependiendo de la especie involucrada y otros factores no aclarados los cambios del pico pueden no presentarse<sup>11,16,22,14</sup>.

Los cambios clínicos en el pico y la mucosa oral se caracterizan por una elongación progresiva, fracturas en hendidura transversales o longitudinales con o sin infecciones bacterianas o micóticas, necrosis palatina y ulceración oral. En caso de distrofia del plumón, sobre el pico se notará un cambio de color opaco a un aspecto brillante por la pérdida del polvo del plumón al momento del acicalamiento corporal<sup>15,23,11,15,16,14,5,17,22,56,41</sup>.

La necrosis del maxilar superior puede progresar al área proximal palatina y en casos severos se afecta el premaxilar, mientras que el maxilar inferior se presenta menos lesionado<sup>11,16,14,15</sup>.

La lesión del pico no fue observada en el caso de *Agapornis sp.*<sup>5</sup>, siendo más frecuentes en aves grandes como la *Cacatua galenta*, *Eolophus roseicapillus* y *Cacatua sanguinea*<sup>21,17,51</sup>, estas lesiones se desarrollan con o sin periodos de muda<sup>11</sup>.

## Uñas

Las alteraciones de las uñas pueden incluir desde deformaciones, fracturas, infecciones y necrosis hasta pérdida de las mismas, no obstante, estas no siempre se observan<sup>11,15,17,51,23</sup>.

## LESIONES MICROSCOPICAS

### Órganos

Las lesiones más severas se ven en los casos del cuadro hiperagudo y particularmente en hígado<sup>32,40,26</sup>, como lo muestra un estudio con 14 crías de *Psittacus erithacus* en donde el hígado de 11 de ellos presento una necrosis de moderada a severa<sup>40</sup>, mientras que en una *Cacatua galerita* se observaron lipogranulomas entre los lóbulos hepáticos y una nefritis intersticial multifocal<sup>15</sup>, las lesiones pueden estar limitadas en la bolsa de Fabricio y timo con severa necrosis y con presencia de cuerpos de inclusión en los mismos<sup>14,22,23,17,26,40</sup>, en los folículos linfoides de bolsas afectadas se observó necrosis y atrofia, algunos linfocitos necróticos mostraban núcleos fuertemente basófilos o fragmentos nucleares, macrófagos con cuerpos de inclusión intracitoplasmático también fueron observados y algunos linfocitos que presentaron cuerpos de inclusión intranuclear, en timo se observó atrofia pero no se detectó presencia viral por inmunohistoquímica<sup>26</sup>, este cuadro parece ser común en neonatos de *Cacatua sp.* y *Psittacus erithacus*<sup>11,19,26,42,43,37</sup>.

La atrofia del timo y bazo se observa en función de la edad de las aves y las lesiones en otros órganos están muy relacionadas con el tipo de infección secundaria que se desarrolla<sup>23</sup>. En los casos crónicos son pocas las lesiones internas reportadas en la literatura, las pocas son inconsistentes concentrándose básicamente en plumaje, pico y en algunos casos garras<sup>12,23,14</sup>.

Tinciones por inmunohistoquímica con anticuerpo virus específico fueron usadas para confirmar que cuerpos de inclusión basófilos intracitoplasmáticos y algunos cuerpos de inclusión intranucleares de muestras coloreadas con la tinción de hematoxilina-eosina (HE) de; epitelio y folículo de

la pluma, tejido linfoide, pico, paladar, bolsa de Fabricio, timo, lengua, glándula paratiroides, buche, esófago, bazo, intestinos, hígado, tiroides, testículo, túbulo colector de riñón, ovario, células endoteliales de dermis, lámina propia de esófago, buche, molleja, esófago, traquea y endotelio de capilares pulmonares<sup>11,16,17,26,38,32</sup> contenían partículas virales del VEPPP. Otros lugares en donde se a detectado material genético viral han sido los enterocitos, las células de la lámina propia del intestino, epitelio traqueal, endotelio de los vasos de la lámina propia, serosa del tracto respiratorio, células del miocardio, citoplasma de células tubulares en riñón, células mesangiales<sup>33</sup>, médula ósea<sup>36</sup> y glándulas suprarrenales<sup>33,60</sup>.

Un proceso inflamatorio fue detectada en la pulpa de la pluma y dermis perifolicular en 21 de 23 aves positivas, pero éstas áreas de inflamación solo estuvieron relacionadas ocasionalmente con las células epiteliales que contenían un significativo número de cuerpos de inclusión<sup>47,23</sup>.

A través de microscopia electrónica se observa que los cuerpos de inclusión del VEPPP en células de la piel están compuestos por pequeños gránulos, los cuales tienen figuras de forma cristalina, circular y semicircular<sup>9,47,17,14,,22,23,32,58</sup>. En algunas células las partículas virales se observan cercanas al retículo endoplásmico y lisosomas, los cuales presentan morfología intacta, no se observa que el virus afecte a mitocondrias o aparato de Golgi<sup>47</sup>. En células que contenían cuerpos de inclusión, estos fueron un cúmulo de material granular oscuro a lo largo de la capa interna de la membrana nuclear, incrementando la densidad de éste y del citoplasma, un cambio que coincide con el desarrollo de vacuolas traslúcidas. La formación de pequeñas estructuras vesículas de la superficie de la membrana celular puede ser observada no muy frecuentemente<sup>47</sup>. Evaginaciones intracitoplasmáticas llamadas cuerpos apoptóticos y cuerpos de inclusión de diferentes tamaños,

son comúnmente observados en células afectadas<sup>9,47</sup>, estos cuerpos apoptóticos contienen fragmentos de núcleo u organelos citoplasmáticos, en algunos de los cuales pueden ser identificados el retículo endoplásmico, mientras algunos otros están rodeados de halos claros<sup>47</sup>. Fueron morfológicamente demostrados desmosomas entre células epiteliales afectadas adyacentes en un estado de degeneración inicial e intermedio<sup>47</sup>.

## Piel y plumas

La formación y maduración de la pluma tiene un complejo proceso de desarrollo en donde la papila dérmica y el collar epidermal se diferencian en raquis, barbas y otros componentes de las plumas, el daño al tejido epidemal en desarrollo de la pluma puede ser la causa de deformidades en la misma<sup>22,47</sup>. La hiperqueratosis de la vaina impide que ésta se desenvaine y da como resultado la retención de la misma con formación de constricciones circunferenciales en el raquis de la pluma en desarrollo, las cuales son observadas macroscópicamente<sup>14,15,16</sup>.

El folículo normal de la pluma en desarrollo consiste de un núcleo dérmico (papila dérmica) localizado en el estrato germinativo de un componente epitelial y de la pulpa. El componente epitelial crece a partir del collar de células en la base del folículo (estrato germinativo), éstas células se diferencian hacia una lámina basal (epidermis basal), una lámina de células columnares o lámina intermedia (epidermis intermedia) y una lámina externa queratinizada que se divide y crece ascendentemente para formar el raquis, barbas, bárbulas y el cálamo de la pluma madura<sup>23,47</sup>.

Se han descrito alteraciones en el raquis de la pluma, en donde se observa necrosis y degeneración vacuolar del componente epitelial y estrato

germinativo del raquis en desarrollo<sup>1,11,14,17,22,58</sup>, estos cambios microscópicos no se han observado en ausencia de lesiones en las plumas<sup>17</sup>.

La mayor lesión encontrada ocurre en la vaina de la pluma en desarrollo, una necrosis de células epiteliales tanto individual como en grupo se observa a través de todo el collar epidermal, la epidermis basal y zonas intermedias del raquis en desarrollo<sup>15,23</sup>. La lámina basal (epidermis basal) aparece desordenada debido a la presencia de células necróticas, células con núcleo agrandado y algunas con nucleolo irregular<sup>23</sup>. La vaina de la pluma así como el pico presentan un engrosamiento debido a una hiperqueratosis<sup>15,23</sup>.

La lesión en la pulpa de la pluma esta caracterizada por inflamación supurativa, incluyendo acumulación de heterófilos, células plasmáticas, macrófagos<sup>57</sup>, ocasionalmente linfocitos y células gigantes<sup>1,11,15,17,22,39,51</sup>, lo cual sea probablemente debido a infección bacteriana<sup>23,47</sup>.

En un estudio realizado en crías de cacaúas importadas de Asia se reportaron cuerpos de inclusión intranuclear e intracitoplasmáticos, que fueron identificados en 23 aves examinadas, en este grupo, cuerpos de inclusión intranuclear estuvieron restringidos a las células epiteliales, semejantes a lo observado por otros autores<sup>20,33</sup>, los cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos solo se observaron en los macrófagos<sup>22,14,23,11,18,17,33</sup>, ocasionalmente cuerpos de inclusión intranuclear se observaron en hepatocitos en donde mediante microscopia electrónica se descartó que fueran virales, la naturaleza exacta de dicho material no fue determinado<sup>14</sup>.

La evaluación histológica de las plumas de aves infectadas revela cuerpos de inclusión basofílicos intranucleares en células epiteliales e intracitoplasmáticos en macrófagos localizados dentro de la pulpa de las

plumas<sup>1,3,14,15,17,19,22,26,5,16,32,33</sup>, ocasionalmente se han observado células epiteliales de los folículos de la pluma con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos<sup>15</sup>.

En áreas apteriales se han observado la presencia de ácido nucleico viral, particularmente en la lámina basal y con progresivo decremento hacia la lámina corneal, también se han detectado partículas virales en el endotelio vascular y en algunas células sanguíneas de la dermis<sup>33</sup>, mientras que en otros estudios se han observado células epiteliales con núcleo basofílico que se tiñe positivamente con inmunoperoxidasa<sup>26</sup>, en ambos casos sin presentar signos de inflamación<sup>26,33</sup>, lo cual corrobora lo observado en el patrón de apoptosis<sup>47</sup>. Al parecer el virus se dirige con mayor frecuencia a las células epiteliales de la pluma que a las células epiteliales del folículo<sup>17,16</sup>.

En otros reportes se observaron cuerpos de inclusión citoplasmáticos en células epiteliales diseminadas entre las láminas intermedia, externa y en la pulpa de la pluma en desarrollo<sup>47</sup>.

## Pico

Las lesiones histológicas del pico son similares a las descritas en las plumas incluyendo necrosis e hiperplasia de células epiteliales en las láminas epiteliales basal e intermedia. La hiperqueratosis y separación de la lámina cornificada externa del tejido profundo y hueso son evidentes microscópicamente, y también se ven acompañadas de necrosis secundaria y osteítis del tejido asociado<sup>15,16,22,14,23</sup>.

La capa córnea dura (ranfoteca) y la porción distal del pico se separan de los tejidos subyacentes, ésta patología esta asociada con la necrosis de la

lamina basal de la epidermis del pico<sup>22</sup>, conforme la enfermedad progresa el pico puede alargarse o tener fracturas longitudinales o transversas, también puede llegar observarse una necrosis palatina<sup>17</sup>.

## PATOGENIA

El sitio primario exacto de replicación es desconocido<sup>11</sup>, se ha postulado a la bolsa de Fabricio como un sitio primario de replicación<sup>26,51</sup>, y en el caso al menos de aves con el cuadro crónico el virus se replica tanto en piel como en órganos internos<sup>26</sup>. Evidencia reciente señala también como un importante sitio de replicación viral al hígado tanto para la presentación aguda como la crónica<sup>26,30,38</sup>. En algunos reportes se considera al VAP y el CP que se replican en el núcleo de las células del hospedador<sup>11,9</sup>. La excreción ocurre principalmente a través del plumón<sup>11,16,38</sup> y las heces del paciente<sup>26,30,38</sup>.

Se piensa que los cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos de macrófagos se originan en el núcleo de células epidérmicas y alcanzan su mayor tamaño dentro de los macrófagos que fagocitan a estas células<sup>14,23,17</sup>. Tomando como base estas observaciones, y la replicación del VAP, se a postulados que el virus se replica en el núcleo de células epidérmicas infectadas<sup>9,11</sup>, liberándose posteriormente al ser fagocitadas por macrófagos en la pulpa y epidermis<sup>14,17</sup>; no obstante, la presencia del antígeno viral dentro del macrófagos en la médula ósea y en monocitos circulantes sugiere que éstas células se infectan directamente<sup>11,16,36</sup>.

El hecho de que las aves mueran por patógenos oportunistas o secundarios pueden ser interpretados como un estado de inmunosupresión que se apoya por un daño observado en el timo y bolsa de Fabricio<sup>11,14,15,17,36,20,50</sup>.



Estos tipos de complicaciones terminales a menudo requieren eutanasia<sup>11,14,15,16,51,9</sup>.

Se han diagnosticado en *Cacatua sulphurea* (Cacatúa menor) y *Cacatua alba* infectadas con VEPPP casos de criptosporidiosis grave que se considera ocurre sólo en pacientes con inmunodeficiencia<sup>11,17,19</sup>, además de que se especula que fue probablemente la infección viral el factor determinante para la presentación de una trematodiasis en una cacatúa<sup>60</sup>.

Se a reportado que aves positivas a VEPPP con cuerpos de inclusión localizados sólo en el núcleo de células epiteliales tuvieron recuperaciones espontáneas; por otro lado, grandes psitácidos con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos localizados en macrófagos sucumben generalmente a la enfermedad, esto puede ser debido al papel clave que tienen los macrófagos como células procesadoras y presentadoras de antígenos<sup>11,16,36</sup>.

En la observación por medio de microscopía electrónica de células infectadas con VEPPP pueden ser identificados cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos y revelar alteraciones morfológicas típicas de apoptosis<sup>47</sup>, este proceso a sido descrito en el caso del VAP<sup>9</sup>. Una forma característica de células infectadas con VEPPP es la condensación de citoplasma, formación vacuolar en el citoplasma y condensación de cromatina nuclear, los cuales son cambios morfológicos de apoptosis<sup>47</sup>. Tales observaciones han llevado a considerar que la necrosis descrita en la literatura es consecuencia de infecciones secundarias debido al proceso de inmunosupresión y no esta asociado con el mecanismo primario de patogenicidad de virus<sup>47</sup>.

Una inflamación linfocítica asociada con áreas de necrosis difusa a sido descritas en la piel de aves afectadas, la presencia o ausencia de inflamación

es de importancia para entender la patogénesis de la enfermedad, para esto hay que recordar que el proceso llamado apoptosis no esta acompañado de signos de inflamación y puede ser distinguible morfológicamente de la necrosis, la cual puede estar acompañada de inflamación<sup>47,9</sup>.

Aún no es claro si la apoptosis es resultado directo de la infección por VEPPP o es parte de algún otro proceso no relacionado a la replicación viral<sup>47</sup>.

## INMUNIDAD

Debido a que el macrófago juega un papel importante en el proceso inicial de defensa y presentación del antígeno viral al sistema inmune<sup>34,45</sup>, el hecho de que éste se vea afectado se a postulado como factor determinante por el cual un ave infectada desarrollará una infección fatal o una respuesta inmune efectiva; es decir, será en relación directa a como el cuerpo procese el virus antes de que éste comience a persistir dentro del citoplasma de macrófagos<sup>11,17,34</sup>.

Algunas aves que han sido expuestas al VEPPP permanecen clínicamente normales, posteriormente se observo que estas desarrollaron altos títulos de HI en comparación a aquellas que si mostraron signos clínicos de enfermedad<sup>34,36</sup>, la detección de altos títulos de anticuerpos anti VEPPP en estas aves en donde no se manifestó sintomatología clínica indicaría que se desarrollaron infecciones subclínicas con el desarrollo de una respuesta inmune efectiva<sup>11,16,17</sup>.

Un ave infectada estará montando o no una respuesta inmune contra el virus dependiendo de la edad del ave al momento de la infección, la presencia

y concentración de anticuerpos maternos, ruta de exposición y títulos de virus infectante<sup>30,34,11,16,17,51</sup>.

Una susceptibilidad relacionada con la edad a sido sugerida, en caso de *Melopsittacus undulatus* se sugiere que esta susceptibilidad puede ser debido a la habilidad de la bolsa de Fabricio neonatal de absorber partículas maternas de la cloaca<sup>11</sup>, mientras que también es posible que esta observación se deba quizá a que el monitoreo no se sigue durante un periodo de incubación apropiado, sin que influya la edad de las aves al momento de la infección<sup>11,51,34</sup>. Un estudio reciente sugiere que en esta especie en particular la madurez y efectividad en la respuesta inmune puede ser la vía más importante (si no es que la única) que proporcione protección en etapas tempranas de vida<sup>24</sup>.

En pacientes con EPPP se reporta que tenían bajas concentraciones de pre albúmina y globulinas en suero, que probablemente indicarían un compromiso del sistema inmune humoral y que sería la responsable de infecciones por bacterias Gram negativas y levaduras<sup>11,14,17</sup>.

Se ha reportado la recuperación de un *Psittacus erithacus* infectado con VEPPP letárgico y con severa leucopenia a base un fármaco granulopoyético, estos hallazgos sugieren que la médula ósea que en aves infectadas a mostrado cuerpos de inclusión<sup>17,36,11,43</sup> es capaz de realizar la granulopoyesis, pero no confirma si la leucopenia es el resultado de la infección viral o es debido a una abrumadora infección en un paciente inmunosuprimido<sup>40</sup>.

Apenas comienzan a surgir estudios sobre los aspectos inmunológicos básicos de los psitácidos, como es el caso de las inmunoglobulinas, específicamente IgY<sup>3,21</sup>, (se considera homólogo de IgG de los mamíferos<sup>48,11</sup>)

ampliando las herramientas para el campo de investigación en psitácidos, se sabe que existen diferencias muy marcadas entre los distintos ordenes de aves<sup>3</sup>, esto hace necesario un mayor estudio en estas especies<sup>17</sup>.

A la fecha se conocen apenas datos básicos sobre la inmunidad en aves no domésticas<sup>21,24</sup>, se describen en la literatura datos empíricos sobre la inmunidad en psitácidos como la observación en *Nymphicus hollandicus* en donde las mutaciones en el color del plumaje producto de la consaguinidad entre los individuos han sido asociadas con una inmunodeficiencia que les hace más susceptibles a enfermedades y les acorta el promedio de vida<sup>11</sup>. Sobre el timo se describe que sufre de una regresión o involución conforme se presenta una madurez sexual, posteriormente en algunas aves se observa hipertrofia periódica posterior a la época de crianza<sup>19</sup>. En *Ara ararauna* (Guacamaya azul y amarillo) la transferencia de IgY maternos al neonato ocurre a través de la vitelogénesis del huevo<sup>16,21</sup>, similar transferencia de anticuerpos a sido documentada en especies domesticas como las gallináceas y anseriformes, donde dicha transferencia estaría ocurriendo a través de una selección mediante un receptor transportador de IgY a través del epitelio de la membrana vitelina<sup>21,24</sup>. Los anticuerpos de *Ara ararauna* neonatos tienen una vida media promedio de 3.85 días en el suero del producto, por otro lado crías de 6 semanas de vida desarrollan una mejor respuesta que la que se da a las 2 semanas con títulos semejantes que los observados en respuestas de aves adultas y sin gran diferencia en la respuesta secundaria en las aves infantiles, estos anticuerpos maternos tienen una declinación del 95% al día 42 de edad<sup>21</sup>. Para el caso de *Melopsittacus undulatus*, se a reportado recientemente que también presenta inmunoglobulinas maternas en el saco vitelino embrionario de tipo IgY; sin embargo, estos no son detectables en crías de alrededor de 5 días de nacido en las cuales se a absorbido prácticamente el total del saco vitelino, desconociéndose como es que ésta especie compensa esta falta de protección

materna durante los primeros días de edad, teniendo esto que considerarse como un importante dato para un protocolo de inmunización en esta especie en particular, además de reforzar lo importante de la investigación en otras especies antes de siquiera plantear un protocolo de vacunación para psitácidos en general<sup>24</sup>. Ritche et al. reportan que neonatos de *Psittacus erithacus* y *Cacatua alba* de padres vacunados contra EPPP estuvieron protegidos contra exposiciones a cargas virales entre los días 3 a 8 de edad, mientras que pollos de hembras no vacunadas sucumbieron a la infección<sup>34</sup>.

A pesar de que la función inmune a sido estudiada extensamente en aves domesticas, solo es una pequeña parte la que se conoce sobre otras especies. Un mayor entendimiento del sistema inmune de aves no domésticas es esencial para adelantos en diagnóstico y capacidad terapéutica en medicina aviar. La protección de pollos recién eclosionados contra diversos organismos patógenos depende en gran parte de su inmunidad adquirida pasivamente de la madre, así como el desarrollo de defensas como el sistema de la inmunidad celular y humoral de los neonatos<sup>21</sup>.

La edad a la cual ocurre la madurez inmunológica en aves a sido difícilmente definida, incluso en aves domésticas en donde muchos de los reportes indican una maduración de respuesta a las cinco semanas; sin embargo, para el caso de *Ara ararauna* esta madurez puede que se extienda a mas de 6 semanas de edad, pero este dato no puede ser precisado sin mas investigación<sup>21</sup>. Ritche et al. reportan que en el caso de crías de entre 30 y 45 días de edad de *Psittacus erithacus*, *Cacatua alba* y *Cacatua galerita* inmunizados con vacuna atenuada, tuvieron incrementos en las concentraciones de anticuerpos por HI, comparándolo con crías no inoculados; no obstante, estos títulos fueron más bajos que los títulos alcanzados por los adultos<sup>34</sup>. Observando que estas especies a las seis semanas de edad, son

capaces de generar una respuesta con anticuerpos, pero de mucho menor magnitud que las aves adultas<sup>21</sup>.

En el caso de especies domésticas, la inmunidad materna es transferida en forma de anticuerpos al pollo a través del huevo, la IgY sérica de la madre es transferida dentro del la yema del huevo durante la foliologénesis, ésta IgY, es absorbida dentro de la circulación del pollo durante el desarrollo, alcanzando un pico justo antes de la eclosión. Las inmunoglobulinas IgM e IgA son acumuladas en las secreciones del oviducto de la madre, para ser incorporadas dentro de la porción albúmina del huevo, posteriormente en el desarrollo, el pollo ingiere esta albúmina, de ésta manera adquiere inmunidad local en el tracto gastrointestinal, faringe y tracto alimentario por medio de IgM e IgA. Posterior a la eclosión, los pollos de gallináceos ya no reciben más protección de la madre<sup>21,24</sup>.

En aves en donde la crianza de los jóvenes involucra la regurgitación de alimento predigerido por los padres, la transferencia materna de anticuerpos puede continuar a través de secreciones del buche, tal como a sido documentado para el caso de pichones, por medio de la llamada "leche de buche" observada sólo en pichones, hay que aclarar que este proceso de crianza no ocurre en todas especies ni tampoco en las que ocurre se a investigado el tipo o contenido de secreciones, por lo que esto es un aspecto prácticamente desconocido<sup>21,24</sup>.

La ontogenia de la respuesta inmune es pobremente entendida en muchas especies aviares, incluso en aves domesticas en donde la respuesta inmune humoral y celular a sido profusamente analizada, los datos que describen el desarrollo de la competencia inmunológica tienen algunas inconsistencias, muchos de estos datos sugieren que el sistema inmune

humoral de pollos madura entre las 5 y 12 semanas de edad. Debido a su precoz naturaleza, los pollos domésticos estarían alcanzando una madurez fisiológica comparativamente más rápida en comparación a una especie altricial como *Ara ararauna* y los demás psitácidos en donde el saco vitelino al nacer tiene un peso aproximado del 5 al 10 % de su peso corporal y su absorción es rápida pues son alimentados por los padres, mientras que especies precociales como las gallinaseas con mayor desarrollo a la eclosión, nacen con un saco vitelino con un peso proporcional del 10 al 25 % al peso corporal y con una absorción lenta, ya que debe durar mientras comienzan a comer por sí mismos<sup>11</sup>, a pesar de esto, el qué tan rápido es el desarrollo del sistema inmune en psitácidos es hasta la fecha algo incierto<sup>21</sup>.

En crías vacunados se observó un incremento en la concentración de anticuerpos HI, pero anticuerpos precipitantes no pudieron ser detectados<sup>3</sup>, en pollos domésticos IgY es la clase de inmunoglobulina en el suero al momento de la eclosión, y es además, la que se detectaría mediante HI, estos elementos hacen pensar que es una inmunidad mediada por IgY lo que estaría confiriendo protección temporal al recién eclosionado<sup>34</sup>.

## DIAGNÓSTICO

La enfermedad debe ser sospechada en cualquier psitácida con desarrollo progresivo de plumas distróficas, desarrollo de enfermedades oportunistas que no respondan al tratamiento y aves que tengan un historial sospechoso. Un diagnóstico tentativo por histopatología involucra la identificación de cuerpos de inclusión basofílicos intracitoplasmáticos en el epitelio folicular y cuerpos de inclusión intranuclear en macrófagos de la pulpa de las plumas<sup>36,58</sup>; sin embargo, otros autores consideran que la característica diagnóstica más convincente es la presencia de cuerpos de inclusión

basofílicos intracitoplasmáticos en células epiteliales y macrófagos en tejidos afectados<sup>47</sup>, esto debido a que también otros virus pueden producir cuerpos de inclusión intranucleares<sup>33,58</sup>. El diagnóstico solo por histopatología presenta varios inconvenientes, debiendo realizarse pruebas más efectivas y específicas para lograr el diagnóstico preciso de la enfermedad<sup>12,14,22,23,33,37,38,54,55</sup>.

Debido a que se han diagnosticado en *Cacatua sulphurea* y *Cacatua alba* infectadas con VEPPP casos de diarrea intermitente, asociadas a criptosporidiosis grave, el diagnóstico del mismo puede brindar indicios de la enfermedad<sup>17,19,11,50</sup>.

## Hematología

En crías de *Psittacus erithacus* con cuadro hiperagudo se ha observado una severa leucopenia (también observada en cacatúas<sup>14</sup>) con linfopenia<sup>48,54</sup>, anemia no regenerativa<sup>60</sup> o pancitopenia, en donde la leucopenia reportada es mucho más severa que la anemia<sup>40</sup>. Cabe considerar que la vida media de los eritrocitos se ha estimado entre 20 y 35 días, por lo tanto, la presencia o ausencia de anemia sólo puede reflejar el periodo posinfección al momento de tomar la muestra de sangre<sup>11,40,48</sup>.

Los valores encontrados tanto en *Cacatuas sp.* como en *Psittacus erithacus* no mostraron diferencias consistentes, salvo bajas concentraciones de proteína sérica total<sup>15,14</sup>, y globulina<sup>17,36,14</sup> y baja concentración de prealbumina<sup>20,14</sup>, además de anemia no responsiva<sup>43,40,60</sup>.

La función de la fracción pre albúmina en la proteína sérica de las aves no es del todo conocida, ésta puede estar funcionando como transporte de



proteínas de forma similar a la albúmina, ésta fracción parece no tener un componente comparable en caso de mamíferos<sup>48</sup>.

En mamíferos, las  $\gamma$  globulinas aparecen como dos fracciones primarias;  $\gamma$  1 y  $\gamma$  2, en especies aviares solo una fracción esta demostrada, el componente primario de las  $\gamma$  globulinas son los anticuerpos, complemento y sus productos de degradación<sup>48</sup>.

En un estudio experimental con 14 crías de *Psittacus erithacus* con cuadro clínico, dos mostraron leucopenia, dos anemia, seis pancitopenia y en el resto con leucopenia en donde no se determinó el paquete celular, la leucopenia puede ser el resultado de una abrumadora infección en un paciente inmunosuprimido<sup>5,54</sup>. Para *Psittacus erithacus* se considera a la linfopenia como resultado de severas infecciones probablemente por VEPPP<sup>40,48</sup>.

También puede ser prudente el examen de médula ósea en casos sospechosos de pacientes con una anemia no responsiva<sup>43</sup>.

### **Bioquímica Sérica**

Las alteraciones en el funcionamiento hepático reportadas han sido casos aislados, poco frecuentes y sin mucha utilidad diagnóstica<sup>5,14</sup>. En tres casos con *Psittacus erithacus* se reportan elevaciones en AST, con resultados de 771,779 y 843 UI/L (54-155 UI/L referencia), que al compararlos con los resultados de CK que en uno fue de 1433 UI/L (123-875 UI/L referencia) y normal en otros dos casos<sup>40</sup>, se observan resultados altamente sugestivos de daño hepático (una elevación en AST acompañado de un valor normal en CK es altamente sugestivos de daño hepático<sup>48</sup>), que son apoyados por las

elevaciones en ácidos biliares de 354  $\mu\text{mol/L}$  (18-71  $\mu\text{mol/L}$  referencia)<sup>40</sup> y que refuerza más el diagnóstico de disfunción hepática<sup>48</sup>.

### Histopatológico

Los cuerpos de inclusión basofílicos intracitoplasmáticos en macrófagos, principalmente en la pulpa dentro del cañón de plumas en desarrollo e intranucleares en células epiteliales del folículo, son considerados por algunos autores como diagnósticos<sup>14,15,17,37,20,35</sup>, resultando en un método económico, rápido y relativamente poco invasivo<sup>17</sup>. Otro criterio, es la presencia de cuerpos de inclusión basofílicos intracitoplasmáticos en células epiteliales y macrófagos de tejidos afectados<sup>47</sup>.

Es necesario considerar que varios virus pueden resultar con apariencia similar al VEPP<sup>20,32,33,36,58</sup>, como es el caso de poliomavirus (enfermedad también conocido como muda francesa)<sup>11</sup> en donde se presentan inclusiones intranucleares en células endoteliales, hepatocitos, células epiteliales del túbulo renal y folículo plumoso, además de cariomegalia<sup>20,11,58,32,33</sup>, infecciones por herpes virus (enfermedad de Pacheco<sup>58</sup>) que presenta cuerpos eosinofílicos o basofílicos intranucleares<sup>33,41</sup> o infección por adenovirus que además de cuerpos basofílicos intranucleares semejantes<sup>33</sup> también puede presentar cariomegalia al igual que poliomavirus<sup>20,58,32,33</sup>; sin embargo, la falta de cariomegalia en infección por adenovirus o poliomavirus puede inducir a confusión con infección por herpesvirus<sup>33</sup>. Se sabe que pueden incluso presentarse dos o más agentes virales de forma simultánea<sup>17,26,20,50,32,33</sup>.

El hecho de que no se presenten alteraciones en un histopatológico no descarta la enfermedad<sup>15,30,6,33</sup>, por lo tanto, un diagnóstico confirmativo requiere el uso de anticuerpos específicos para demostrar el antígenos anti

VEPPP<sup>26,36,32,33</sup> o el uso de pruebas para detectar ácido nucleico del VEPPP<sup>11,17,35,36,32,33,57,58</sup>.

### **Microscopía electrónica**

Mediante la observación de las formaciones cristalinas no membranosas, características de las partículas virales<sup>9,47,17,33,39,59,22,23,14,32,58</sup>.

### **Citología**

Se reporta que mediante la impronta del contenido pulpar extraído de plumas recién emergentes fijadas con metanol absoluto por 30 segundos y coloreadas con Wright-Giemsa, pueden ser observadas células conteniendo los cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos característicos en macrófagos<sup>14</sup>.

### **Angioradiografía**

Esta se realizó en aves recién sacrificadas a fin de detectar el aporte sanguíneo al pico, estas fueron cateterizadas en la aorta con sulfato de bario, indicándose la integridad del lecho vascular al área lesionada, las cacatúas valoradas mostraban osteomielitis del premaxilar<sup>14</sup>.

### **PCR (reacción en cadena de la polimerasa)**

Las pruebas PCR son más sensibles y pueden ser usadas en una muestra de sangre para detectar viremia o la presencia del material genético viral<sup>11,16,5,34</sup>, incluso en células sin cuerpos de inclusión<sup>33</sup> y confirmar o excluir con rapidez y economía al VEPPP<sup>20,18,33,54,55</sup>.

Esta prueba a sido utilizada tanto en pacientes enfermos, como clínicamente sanos<sup>5</sup>, además de que puede utilizarse para revisión de materiales o instalaciones en los cuales se han conservado o se quieran albergar psitaciformes<sup>46,11,18</sup>.

El virus puede ser detectado en sangre 2 días después de la exposición natural y mucho antes de que el ave desarrolle signos de la enfermedad. Muchas aves adultas pueden desarrollar una viremia transitoria que puede ser detectada por esta misma prueba, ésta puede seroconvertir y permanecer clínicamente normal<sup>37</sup>. En general se considera que un resultado positivo de muestra de plumas es más grave que el mismo resultado en muestra de sangre<sup>48</sup>.

La leucopenia se ha reportado como una posible causa de falsos negativo en pruebas por PCR de algunos individuos, a pesar de esto en *Psittacus erithacus* demostró ser efectiva aun en pacientes con leucopenia severa<sup>40</sup>.

#### **Interpretación de diagnostico de examen PCR en sangre<sup>37,16,5,55</sup>**

Plumas de aspecto normal:

**Resultado positivo;** este resultado estaría indicando que el ave ha estado expuesta al virus y por lo tanto el ADN viral se encuentra presente en la sangre, esta ave por lo tanto, deberá ser revalorada en 90 días.

Si el resultado de una segunda prueba resulta negativo, esto indicaría que el ave tuvo una infección transitoria y que el sistema inmune ha sido capaz de eliminar el ácido nucleico viral de la sangre.

Si el resultado de la segunda prueba resulta positivo entonces estará indicando que el ave esta infectada de forma subclínica o que es portador<sup>4</sup>, o que está constantemente expuesta al virus. Aves infectadas de manera subclínica pueden desarrollar alteraciones en las plumas en un futuro.

Aves con plumas de aspecto normal y que han eliminado una infección pueden ser consideradas como resistentes a VEPPP.

Muchas aves que han sido expuestas al VEPPP pueden mantener presente el ADN viral en sangre por un breve periodo de tiempo.

Resultado negativo; esto estará indicando que no se detectó ADN viral en sangre.

#### Plumas de aspecto anormal (distróficas o necróticas)

Resultado positivo; esto sugiere un estado de infección activa y grave<sup>48</sup>, esta ave por lo tanto, deberá ser removida inmediatamente a una cuarentena. Aves en estas condiciones estarán eliminando grandes cantidades de partículas virales en cualquier tipo de sus plumas, los cuales pueden ser fácilmente transportados a otras aves a través del viento, ropa, piel o pelo. Todas las áreas, equipo y suplementos que puedan estar contaminados, deberán ser repetidamente limpiados y desinfectados. Las áreas o el material, podrán ser examinados

mediante la aplicación de la prueba de PCR en los mismos, además de conductos de aire, tapetes, encierros y cualquier otra área con sospecha de contaminación.

Resultado negativo: una biopsia de las plumas, que incluya el folículo de la misma, deberá ser sometido a un examen histopatológico. En algunos casos, aves infectadas con el VEPPP pueden dar un resultado falso negativo debido a la concentración del virus demasiado alta en la sangre, o conteo extremadamente bajo de leucocitos puede alterar el resultado. Estas aves normalmente tienen alteraciones en las plumas y puede ser diagnosticada por histopatología.

Es importante mencionar al dueño que en caso de resultar positiva un ave a la primera evaluación y antes de precipitarse a tomar la decisión de eutanasia es indispensable realizar un segundo examen para confirmar una infección latente, mientras tanto, el ave deberá ser mantenida en cuarentena<sup>4</sup>.

La muestra recomendada para la prueba de detección de subunidades de DNA de aves con infección activa o subclínica es sangre completa con anticoagulante (0.2 a 1.0 ml de sangre en heparina a una relación de 0.02 cc de heparina por ml de sangre) tomada directamente de la vena yugular<sup>20</sup>, por otro lado en el caso de aves con anomalías en las plumas, los laboratorios recomiendan se conserven biopsias de las plumas alteradas en formol al 10 %, esto para tener una mayor cantidad de información que pueda ser requerida posteriormente<sup>11</sup>. Esta prueba esta disponible actualmente en laboratorios comerciales en Australia, Reino Unido y EEUU<sup>54,55,56</sup>.

## Inmunoperoxidasa

Esta tinción inmunohistoquímica se ha realizado en centros de investigación sobre cortes de folículo plumoso afectados, fijados en formalina y procesados para histopatología<sup>11,17,33</sup>, usando un anticuerpo primario obtenido de conejo anti-VEPPP y como anticuerpo secundario inmunoglobulinas de cabra anti-conejo marcada con peroxidasa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)<sup>26,33</sup>, y por el complejo avidin-biotin usando un kit comercial<sup>17,18,32,33</sup>.

## Hemoaglutinación (HA) e Inhibición de la Hemoaglutinación (HI)

En los trabajos de investigación se ha observado que el VEPPP tiene actividad de HA para eritrocitos de *Cacatua goffini*, *Eolophus roseicapillus*, *Cacatua tenuirostris*, *Cacatua galerita*, *Callocephalon fimbriatum*, *Cacatua leadbeateri*<sup>28,29,36,56</sup>, cobayos, *Ara ararauna*, *Ara nobilis*, *Amazona aestiva*, *Amazona amazonica*<sup>56</sup> y *Anser anser*, no así para los de pollo y oveja<sup>11,16,31,34,35,36</sup>.

La prueba HA se puede utilizar para demostrar y cuantificar la cantidad del virus recuperado de aves positivas a EPPP<sup>36</sup>, la prueba en materia fecal y plumas puede utilizarse para diagnóstico de aves afectadas en forma activa<sup>27,29,30</sup>. Esta es la prueba más utilizada en Australia y se prefiere el análisis de la pulpa de plumas en crecimiento sobre el de las heces ya que la eliminación de carga viral durante esta última vía es generalmente baja y en algunas aves con cuadro crónico la eliminación es intermitente<sup>56</sup>.

La prueba HI es una prueba rápida para detectar anticuerpos contra el VEPPP y estimar la respuesta inmunológica en aves que han sido expuestas al virus, aves con EPPP activa y en aves en un estado subclínico<sup>11,16,34,36</sup>.

Hallazgos en aves con anticuerpos HI clínicamente sanos, sugieren que algunas aves son capaces de montar una respuesta inmune contra el virus<sup>11,29,34,36</sup>, estos resultados por si solos no proveen información que diferencie si un ave esta infectada en forma activa, subclínica o si a eliminado al virus<sup>11,16,28,30</sup>, ya que también se a observado que tanto aves afectadas clínicamente como las que no se ha expuesto recientemente al virus pueden tener títulos bajos de anticuerpos<sup>34,31</sup>, y aves clínicamente normales tienen títulos mucho mayores que aves clínicamente afectadas<sup>36</sup>.

Estas pruebas no son del todo confiables<sup>11,16,36</sup>, ya que los protocolos diagnósticos basados en HA son insuficientemente sensibles para detectar aves en periodo de incubación o periodos de latencia<sup>27,28,30,56</sup>, teniendo que emplearse HA, HI, e histopatología y combinarlas con una reexaminación clínica<sup>28,29,30</sup>.

Puede combinarse la prueba HI con PCR para valorar la respuesta inmunológica de un ave recientemente expuesta al virus. Si la sangre de un ave sin anomalías del plumaje es positiva para el virus mediante PCR y negativa 90 días más tarde, un incremento en el título de HI sugeriría que el ave ha montado una respuesta inmunológica satisfactoria y a eliminado al virus<sup>16</sup>.

## TRATAMIENTO

Los casos de recuperaciones que se han reportado son de aves en las que solo se han detectado cuerpos de inclusión intranuclear<sup>11,16</sup>.

A pesar de que las lesiones en las plumas puedan ser toleradas por el ave, las lesiones del pico y las garras estarán siendo muy dolorosas, en



particular cuando se presenten infecciones en los mismos. El tratamiento es solo de mantenimiento y esta dirigido contra las infecciones secundarias solamente, sin alterar el progreso de la enfermedad<sup>14,15,54</sup>. La eutanasia es sugerida para casos en donde se ha presentado ya un muy avanzado estado de caquexia y un cuadro severo de la enfermedad<sup>5,11,15,16</sup>. En aves que han perdido el plumaje se le debe mantener en un ambiente con una temperatura de entre 25 a 30<sup>0</sup> C, debido a la alteración en su mecanismo de termorregulación, y con una humedad de entre el 40 y 70%, deberán recibir además alimentos blandos en caso de lesiones o necrosis del pico<sup>1,14</sup>.

Se han intentado transfusiones de sangre en el caso de anemias no responsivas, las cuales no han dado buenos resultados<sup>43</sup>.

Se a reportado que el uso del interferón  $\alpha$  2-A a una dosis de 0.3 ml PO diario por 30 días puede llegar a suprimir momentáneamente la replicación viral; sin embargo, este tratamiento es aún incierto y requiere de más investigación<sup>27</sup>.

Se ha reportado un tratamiento exitoso de un *Psittacus erithacus* letárgico y con severa leucopenia a base de Filgrastim (Neupogen<sup>®</sup> ROCHE) 10 UI/kg, SID, IM, por 3 días, un agente estimulante de granulocitos, dos años después esta ave parece clínicamente normal<sup>40</sup>.

El único tratamiento que a la fecha a mostrado mayor efectividad es la vacunación<sup>11,16,17,26,46</sup>.

## CONTROL

Estudios epizootológicos realizados en EEUU indican que al menos el 5 % de las psitácidas importadas por el enorme mercado de mascotas, tienen lesiones sugestivas de EPPP<sup>11,32,14</sup>, considerándose esta actividad como la principal vía de entrada de la enfermedad a las poblaciones de aves susceptibles<sup>11,16,13</sup>, por lo anterior, se plantea como medida de prevención, mayor control sobre el tráfico de psitácidos, ya sea de compañía, o del mercado de mascotas entre las fronteras de países<sup>30,5</sup>.

Las medidas de bioseguridad como; el impedimento de contacto con aves silvestres, limpieza periódica de las instalaciones y eliminación de materia fecal pueden reducir tan solo las probabilidades de enfermedad sin eliminarlas del todo<sup>25,17,27,34</sup>.

## VACUNACIÓN

Se a empleado una vacuna atenuada con  $\beta$ -propiolactona en una emulsión de aceite como coadyuvante para el control de enfermedad aún por periodos prolongados para *Agapornis sp.* con ausencia de manifestaciones clínicas hasta por doce meses en la avicultura Australiana<sup>2,27,25,30,34</sup>, por otra parte, se reporta de forma experimental limitada mejoría clínica en la utilización de autovacunas<sup>15</sup>.

Estudios comparativos de VEPPP recuperado y aislado de varios géneros de psitácidos, indican una antigenicidad similar de varios virus infectantes en un amplio rango de especies susceptibles<sup>5,34,37,39</sup>.

En el caso de vacunar aves infectadas pueden ocurrir tres cosas;

- Se puede estimular la inmunidad<sup>17,27,32,30,37,54,56</sup>.
- Puede no haber estímulo de inmunidad<sup>27,30</sup>.
- Puede causar excreción del virus activado o agravar la presentación del cuadro clínico<sup>27,30,56</sup>.

Además, se ha observado que la vacunación de las hembras transmite protección a los polluelos<sup>3,17,27,29,30,34,36,37,56</sup>.

A pesar de que se ha empleado con éxito la vacuna atenuada para *Agapornis sp.* en la avicultura Australiana<sup>2,27,25,30,34</sup> y también en otras especies como *Cacatua sp.*<sup>30,12,3,21,24,27</sup>, *Eolophus roseicapillus*<sup>30</sup> y *Amazona ochrocephala oratrix*<sup>34</sup>, se considera que dada la resistencia del virus<sup>30</sup>, estas vacunas son demasiado peligrosas para ser aplicadas con seguridad en las aves de compañía en EEUU y Europa<sup>37</sup>.

Hasta que vacunas más seguras puedan estar disponibles, se deberán implementar medidas efectivas de control para detectar portadores del virus y restringir su acceso a las fronteras de los países libres de la enfermedad, así como revisar los materiales en los que las aves son trasladadas en el caso de la industria de mascotas<sup>37</sup>.

Se dispone recientemente de forma comercial en Australia de una vacuna elaborada a partir de virus muerto<sup>56</sup>, la cual se recomienda se aplique a las hembras un mes antes de la reproducción, y en etapas tempranas de vida, describiéndose que aves de 14 días de edad pueden ya ser vacunadas, y que toda ave vacunada deberá recibir un refuerzo al mes de su primer aplicación, posteriormente las aves deberán ser examinadas cada seis meses hasta los

tres años de edad<sup>56</sup>. No se reportan estudios de campo sobre la aplicación de éste biológico.

## CONCLUSIONES

Debido a que la industria de las aves como mascotas esta creciendo ampliamente tanto para especies nacionales como las exóticas, la importación de psitaciformes a resultado ser un negocio muy lucrativo que mantiene pocas restricciones para su introducción al país, facilitando esto que diversas enfermedades ingresen por nuestras fronteras.

Es importante recalcar que no existen reportes sobre el diagnóstico o sospecha de esta enfermedad en aves dentro del territorio nacional.

Ya sean enfermedades tanto conocidas como las aun no identificadas, la introducción de aves al país requiere se apliquen medidas con la intención de verdaderamente proteger a la población nacional, por otra parte, es evidente la necesaria difusión y actualización sobre las medidas terapéuticas de enfermedades que afectan a especies que están tomando un lugar importante dentro de medicina veterinaria.

El punto que sobresale en la enfermedad es que todavía muy poco o prácticamente nada es lo que se sabe sobre inmunología en psitácidos, poniendo en evidencia que es bastante lo que se necesita saber para implementar medidas efectivas de control, tratamiento, y sobretodo, para la prevención de la enfermedad.

El tratamiento con el fármaco estimulante de los granulocitos, así como el interferón descrito en la literatura carece de estudios de eficacia; sin

embargo, el fármaco estimulante de los granulocitos es el único del que se a reportado una posible recuperación del paciente, por otra parte es nula la información acerca de la aplicación en campo de la vacuna comercial elaborada a partir de virus muerto.

Foto Der. -Cuadro clásico en aves Australianas en donde se observa la alteración del plumaje y pico. Entre las lesiones se incluyen pérdida irreversible del plumón, desarrollo de plumas anormales en cada muda, deformación del pico y excepcionalmente de las uñas, entre otras<sup>51</sup>.

Foto Inf. Der. -Esta enfermedad a sido reportada solo en psitácidos, considerándose por lo mismo como susceptibles a todos los miembros de este Orden y no solo cacatías, guacamayas, agapornis etc.<sup>54,56</sup>.

Foto Inf. Izq. -El VEPPP mide de 10 a 17 nm<sup>57,58</sup> de diámetro y su genoma es una molécula circular de cadena simple, estas características lo convierten en el virus conocido más pequeño capaz de causar enfermedad en las aves<sup>59,16,9</sup>.

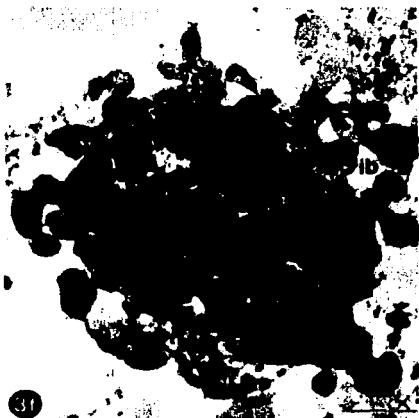


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Foto Der. -En el caso de *Ara macao* se a observado que las lesiones desarrolladas difieren del cuadro clásico desarrollado por las aves Australianas<sup>12</sup>, del mismo modo, cuadros diferentes han sido reportados en diversas especies<sup>11,18,14,22,43</sup>.

Foto Inf. Izq. -Célula degenerada fragmentándose en pequeñas vesículas, la cuales contienen partes del citoplasma. Los cuerpos de inclusión (ib) están localizados entre el citoplasma. La cromática condensada se acumula cerca de la membrana del núcleo (N)<sup>17</sup>.

Foto Inf. Der. -La vacuna comercial elaborada a partir de virus muerto es aplicada en etapas tempranas de vida, aves de 14 días de edad pueden ya ser vacunadas. Todas las aves vacunadas deber recibir un refuerzo al mes de su primer aplicación, posteriormente estas aves deberán ser examinadas cada seis meses hasta los tres años de edad<sup>10</sup>.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.-Allen SK: Psittacine beak and feather disease in an African grey parrot. J Assoc Avian Vet. 4: 18-19, 1990.
- 2.-Australian Commite: Development of PBFV vaccine for use in Australia. J Assoc Avian Vet. 7:3: 168, 1993.
- 3.-Baghian A. Reyes CV. Mendoza A: Production of a rabbit anti-cockatiel immunoglobulin G and characterization of its cross-reactivities with immunoglobilin G of other psittacine species. Avian Dis. 43:1: 48-54, 1999.
- 4.-Bond MW: Sample collection and interpretation of result of nucleic acid probes for psittacine beak and feather disease. J Assoc Avian Vet. 7:1: 10-11, 1993.
- 5.-Bougerol C, Matic N: Psittacine beak and feather's disease (PBFV): study of 12 clinical. Revue de Medecine Vet. 149:3: 211-216, 1998.
- 6.-Cornelissen H: PBFV in lorikeets and black parrots. J Assoc Avian Vet. 7:3: 161, 1993.
- 7.-Delay CJ: Feather Picking: diagnosis and treatment. J Assoc Avian Vet.. 6:2: 82-83, 1992.
- 8.-Fowler ME: Zoo and Wild Animal Medicine, 3 ed. Saunders Company, USA, 1993.



- 9.-Frederick AM: Veterinary Virology, 3ed. Academic Press, USA, 1999.
- 10.-Gaskin JM: Psittacine viral disease. J Zoo Wild Med. 20:3: 249-264, 1989.
- 11.-Gerlach H: Circoviridae – psittacine beak and feather disease virus. Harrison GT, Harrison LR: Avian Medicine, Winger Pulishing Incorporation, USA, 1994.
- 12.-Greenacre C: Psittacine beak and feather disease in a scarlet macaw (*Ara macao*). J Assoc Avian Vet. 6:2: 95-98, 1992.
- 13.-Hooimeijer J: PBFd in large parakeets. J Assoc Avian Vet. 7:4: 217, 1993.
- 14.-Jacobson ER, Clubb S: Feather and beak dystrophy and necrosis in cackatos. J Am Vet Med Assoc. 189:9: 999-1005, 1986.
- 15.-Jergens AE, Brown TP: Psittacine beak and feather disease syndrome in a cockatoo. J Am Vet Med Assoc. 193:10: 1292-1294, 1988.
- 16.-John DB, Kirk RW: Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales. McGraw-Hill Interamericana, México, 1995.
- 17.-Latimer KS, et al: An updated review of psittacine beak and feather disease. J Assoc Avian Vet. 5: 211-22, 1991.
- 18.-Latimer KS, Frank DN: Comparison of DNA dot-blot hybridization, immunoperoxidase staining and routine histopathology in the diagnosis of psittacine beak and feather disease in paraffin-embedded cutaneous tissues. J Assoc Avian Vet. 6: 165-168, 1991.

- 19.-Latimer KS, Steffens WL: Cryptosporidiosis in four cackatoos with psittacine beak and feather disease. *J Am Vet Med Assoc.* 200:5: 707-710, 1992.
- 20.-Latimer KS, Frank DN: Diagnosis of concurrent avian poliomyovirus and psittacine beak and feather disease virus infections using DNA probes. *J Assoc Avian Vet.* 7:3: 141-146, 1993.
- 21.-Lung NP, Thompson JP: Maternal immunoglobulin G antibody transfer and development of immunoglobulin G antibody response in blue and gold macaw (*Ara araurara*) chicks. *Am J Vet Res.* 57:8: 1162-1167, 1996.
- 22.-McOrist S, Douglas G: Beak and feather dystrophy in wild sulphur-crested cockatoos (*Cacatua galerita*). *J Wildl Dis.* 20:2: 120-124, 1984
- 23.-Pass DA: The pathology of psittacine beak and feather disease. *Aust Vet J.* 61:3: 69-74, 1984.
- 24.-Phalen DN, Wilson VG, Graham DL: Failure of maternal derived yolk IgG to reach detectable concentrations in the sera of nestling budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Avian Dis.* 39: 700-708, 1995.
- 25.-Proyecto para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de los Psitácidos en México. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAP. México, 2000.
- 26.-Raidal SR, Cross GM: Acute necrotizing hepatitis caused by experimental infección with psittacine beak and feather disease virus. *J of Avian Med and Surg.* 9: 36-40, 1995.

- 27.-Raidal SR, Cross GM: Control by vaccination of psittacine beak and feather disease in a mixed flock of *Agapornis spp.* Aust Vet Pract. 24:4: 178-180, 1994.
- 28.-Raidal SR, Cross GM: The haemagglutination spectrum of psittacine beak and feather disease virus. Avian Pathol. 23:4: 621-630, 1994.
- 29.-Raidal SR, Cross GM, Sabine M: Laboratory diagnosis of psittacine beak and feather disease by haemagglutination and haemagglutination inhibition. Austr Vet J. 70:4: 133-137, 1993.
- 30.-Raidal SR, Cross GM, Firth GA: Vaccination and challenge studies with psittacine beak and feather disease virus. Aust Vet J. 70:12: 437-441, 1993.
- 31.-Raidal SR, McElena CL, Cross GM: Seroprevalence of psittacine beak and feather disease in wild psittacine bird in New South Wales. Aust Vet J. 70:4: 137-139, 1993.
- 32.-Ramis A, Latimer KS : A concurrent outbreak of psittacine beak and feather disease virus and avian polyomavirus infection in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). Avian Pathol. 27: 43-50, 1998.
- 33.-Ramis A, Latimer KS: Diagnosis of psittacine beak and feather disease (Pbfd) viral infection, avian polyomavirus infection, adenovirus infection, and herpesvirus infection in psittacine tissues using DNA in situ hybridization. Avian Pathol. 23: 643-657, 1994.

- 34.-Ritchie BW, Niagro FD: Antibody response to and maternal immunity from an experimental psittacine beak and feather disease vaccine. *Am J Vet Res.* 53:9: 1512-1518, 1992.
- 35.-Ritchie BW, Niagro FD, Latimer KS: Production and characterization of monoclonal antibodies to psittacine beak and feather disease virus. *J Vet Diag Inv.* 4:1: 13-18, 1992.
- 36.-Ritchie BW, Niagro FD, Latimer KS: Hemagglutination by psittacine beak and feather disease virus and use of hemagglutination inhibition for detection of antibodies against the virus. *Am J Vet Res.* 52:11: 1810-1815, 1991.
- 37.-Ritchie BW, Gregory CR, Latimer KS: A review of the most common viruses affecting psittaciformes. *Int Zoo Yb.* 37: 257-273, 2000.
- 38.-Ritchie BW, Niagro FD: Routes and prevalence of shedding of psittacine beak and feather disease virus. *Am J Vet Res.* 52:11: 1804-1809, 1991.
- 39.-Ritchie BW, Niagro FD, Latimer KS: Ultrastructural, protein composition and antigenic comparison of psittacine beak and feather disease virus purified from four genera of psittacine birds. *J Wildl Dis.* 26:2: 196-203, 1990.
- 40.-Schoemaker NJ, Dorrestein GM, Latimer KS: Severe leukopenia and necrosis in young african grey parrots (*Psittacus erithacus erithacus*) infected with psittacine circovirus. *Avian Dis.* 44:2: 470-478, 2000.
- 41.-Samour J: *Avian Medicine.* Mosby, Harcourt Publishers Limited, China, 2000.

- 42.-Schmidt R: Pathologist view of PBF in african grey. *J Assoc Avian Vet.* 4: 19, 1990.
- 43.-Speer B: Unusual expression of PBF. *J Assoc Avian Vet.* 4: 19, 1990.
- 44.-Steve NG, Howell WA: *Guide to the Birds of México and Northern Central America*, Oxford University Press, New York, 1995.
- 45.-Stukey GC: *Avian Physiology*, fifth edition. Academiv Press, 2000.
- 46.-Todd D: Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species. *Avian Pathol.* 29:5: 373-394, 2000.
- 47.-Trinkaus K, Wenisch S: Psittacine beak and feather disease infected cells show a patter of apoptosis in psittacine skin. *Avian Pathol.* 27: 555-561, 1998.
- 48.-Tully TN, Lawton MP: *Avian Medicine*, Butterworth-Heinemann, England, 2000.
- 49.-Waugh DR: Parrot conservation and Loro Parque Fundacion, Puerto de la Cruz. *Int Zoo Yb.* 37: 288-298. 2000.
- 50.-Wylie SL, Pass DA: Investigations of an enteric infection of cockatoos caused by an entero-like agent. *Aust Vet J.* 66: 321-324, 1989.
- 51.-Wylie SL, Pass DA: Experimental reproduction of psittacine beak and feather disease-french molt. *Avian Pathol.* 16: 269 -281, 1987.

52.-Yasua N: Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chickens. Avian Dis. 23: 366-385, 1979.

53.-Ypelaar I. Bassami MR. Wilcox GE: A universal polimerase chain reaction for the detection of psittacine beack and feather disease virus. Vet Mic. 68: 141-148, 1999.

54.-[www.avianbiotech.com/Diseases/PBFD.htm](http://www.avianbiotech.com/Diseases/PBFD.htm)

55.-[www.funnyfarmexotics.com/IAS/pbfdflow.htm](http://www.funnyfarmexotics.com/IAS/pbfdflow.htm)

56.-[wwwvet.murdoch.edu.au/cafi/pbfd.htm](http://wwwvet.murdoch.edu.au/cafi/pbfd.htm)

57.-[www.vet.uga.edu/IVCVM/1999/Campagnoli/Campagnoli.htm](http://www.vet.uga.edu/IVCVM/1999/Campagnoli/Campagnoli.htm)

58.-[www.vet.uga.edu/IVCVM/1999/Gregory/gregory.htm](http://www.vet.uga.edu/IVCVM/1999/Gregory/gregory.htm)

59.-[www.vet.uga.edu/IVCVM/1998/soares/soares.htm](http://www.vet.uga.edu/IVCVM/1998/soares/soares.htm)

60.-[www.vet.uga.edu/IVCVM/1998/werther/werther.htm](http://www.vet.uga.edu/IVCVM/1998/werther/werther.htm)

\*\*.- Pruebas PCR para VEPPP y Poliomasvirus aviar: University Diagnostic Ltd., Teddington, Middlesex, United Kingdom<sup>31</sup>.

\*\*.- Pruebas PCR para VEPPP: Vetgen Europe<sup>31,3</sup>.