



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y DE LA
PRODUCCIÓN ANIMAL**

**SUSCEPTIBILIDAD DEL PATO DOMÉSTICO (PEKÍN) A LA INFECCIÓN
POR EL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR H5N2 DE BAJA PATOGENICIDAD**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

**PRESENTA:
ERNESTO GODINEZ GARCÍA**

TUTOR: GARY GARCIA ESPINOSA

**COMITÉ TUTORAL: MARIE THERESE CASAUBON HUGUENIN
ELIZABETH LOZA RUBIO**

MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento al tutor de esta tesis de maestría, Dr. Gary Garcia Espinosa, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué al departamento de producción animal aves (DPAA) de la FMVZ UNAM y sobretodo gracias por su amabilidad para facilitarme su tesis, su tiempo y sus ideas.

Un financiamiento de proyecto es siempre fruto de ideas y esfuerzos previos que corresponden a otras personas. En este caso mi más sincero agradecimiento a al **PAPIIT IN210608** "Patogenia de la infección del virus de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad en pato domestico blanco (Pekín), y a la beca **CONACYT** con cuyo apoyo estaré siempre en deuda.

Por su orientación y atención a mis consultas sobre patología, mi agradecimiento a la Dra. Marie Therese Casaubon Huguenin sin la cual este trabajo no habría sido posible. Mi agradecimiento al INIFAP y a la Dra. Elizabeth Loza Rubio, por las instalaciones, equipo, material y por las sugerencias recibidas. Finalmente, gracias a los miembros del jurado (Dra Norma Calderón, Dra Susana Mendoza, Dr Luis Padilla y Dr Nestor Ledesma), por la revisión cuidadosa que han realizado de este texto y sus valiosas sugerencias en momentos de duda.

Pero un trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que nos ofrecen las personas que nos estiman, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales. Agradezco a mis compañeros y amigos del DPAA su apoyo personal y humano; gracias a mi familia, a mis padres y a mis hermanos, porque con ellos compartí una infancia feliz, que guardo en el recuerdo; gracias a mi amiga de toda la vida Cristina por estar siempre a mi lado. Gracias a todos ellos, que siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles de este trabajo y esta profesión. Sin su apoyo este trabajo nunca se habría escrito, por eso, este trabajo es también el suyo.

A todos, muchas gracias.

RESUMEN

El virus de influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, que está dividida en los tipos A, B y C, el virus de influenza aviar (VIA) corresponde al tipo A. Este se ha aislado a partir de diferentes especies de aves domésticas y silvestres, estas últimas son consideradas reservorios del virus. Las aves susceptibles cursan con un cuadro clínico respiratorio leve hasta una enfermedad sistémica aguda y mortal, que obedece a la virulencia del virus ya sea de baja y alta patogenicidad. Los subtipos del virus de influenza aviar asociados a la enfermedad son el H5, H7 y H9. El subtipo H5N1 de alta patogenicidad ha causado enfermedad grave en varias especies: pollos, gallinas, gallos, patos, gansos, cisnes, entre otras aves. En México, prevalece el subtipo H5N2 de baja patogenicidad (BP) en pollos, gallinas y gallos desde hace dieciséis años. Sin embargo, se desconoce si este subtipo causa algún daño en patos debido a que no hay un aislamiento oficial del H5N2 de BP en patos en México. Comprender la patogenia de este virus en el pato, contribuiría a conocer la participación de esta especie en la epidemiología de la enfermedad en México. Es por ello que este trabajo describe si el VIA H5N2 de BP de origen mexicano y aislado de pollo causa algún daño en el pato doméstico de la raza Pekín. El estudio consistió en inocular patos con 1×10^7 DIEP50% del virus repartido por la vía intranasal, intraocular e intratraqueal para evaluar si la cepa causa signos clínicos, lesiones macroscópicas y microscópicas por histopatología, así como saber si los tejidos afectados tienen el virus utilizando inmunohistoquímica y aislamiento viral durante las primeras 72 horas posinoculación. También se evaluó un grupo de pollos Leghorn libres de patógenos específicos inoculados con el virus como testigo de virulencia de la cepa usada y un grupo de pollos y patos sin inocular. Los resultados mostraron que el pato Pekín es menos susceptible a la infección por el VIA H5N2 de BP, en comparación con los pollos Leghorn, dado que en los patos no manifestaron signos de enfermedad posterior a la inoculación y que la media histológica de la lesión tuvo un grado menor de severidad y frecuencia que los pollos. No fue posible determinar la presencia del virus en la lesión histológica por medio de la inmunohistoquímica debido a que el antisuero producido en pollo y conejo tiene inmunoreacción en tejidos sanos, lo cual supone el uso de un anticuerpo monoclonal. Por otro lado, se logró el aislamiento viral a partir de órganos respiratorios de pato, indicando que la cepa viral utilizada tiene tropismo por las vías respiratorias. Como se esperaba, hubo lesiones histopatológicas en órganos respiratorios, como rinitis linfocitaria, sinusitis linfocitaria y laringotraqueítis linfocitaria, además de depresión linfoide por apoptosis en bolsa de Fabricio y atrofia cortical en timo, en patos y pollos, siendo más severas en pollos. Los pollos también presentaron blefaritis linfocitaria, desarrollo de tejido linfoide en glándula de Harder e infiltración perivascular linfocitaria en la piel que recubre el seno infraorbitario. El estudio concluye que el pato Pekín puede ser considerado un potencial reservorio para el VIA H5N2 de BP que aún persiste en la avicultura mexicana.

Palabras clave: pato, pollo, virus, H5N2, baja patogenicidad, Influenza.

ÍNDICE

1. Introducción	1
Generalidades	1
Etiología y estructura del virus de influenza tipo A.....	1
Ciclo de replicación viral.....	2
Patogenicidad.....	3
Patogenia.....	5
Patogenia del virus de baja patogenicidad.....	5
Patogenia del virus de alta patogenicidad.....	5
Identificación de viriones en tejidos.....	5
Justificación.....	6
2 Hipótesis	6
3 Objetivos	6
4 Material y métodos	7
Lugar de trabajo.....	7
Diseño experimental.....	7
Producción del anticuerpo primario para inmunohistoquímica.....	7
Validación del antisuero por precipitación en gel de agar.....	8
Tejidos positivos para inmunohistoquímica.....	8
Preparación de laminillas para inmunohistoquímica.....	8
Procesamiento de tejidos en laminillas.....	8
Histopatología.....	8
Procesamiento de laminillas para inmunohistoquímica.....	8
Estandarización de la técnica de inmunohistoquímica.....	9
Titulación viral para el desafío.....	10
Animales para experimentación.....	10
Colecta de tejidos.....	11
Aislamiento viral.....	11

Hemoaglutinación.....	11
Inhibición de la hemoaglutinación.....	11
4 Resultados.....	12
Aves libres de Influenza aviar, enfermedad de Newcastle, <i>Salmonella spp</i> y <i>Pasteurella spp</i>	12
Signos y lesiones a la necropsia.....	12
Aislamiento viral.....	13
Histopatología.....	15
Validación del suero hiperinmune para inmunohistoquímica.....	24
Inmunohistoquímica.....	24
5 Discusión.....	25
6 Conclusiones.....	30
7 Anexos.....	31
8 Referencias bibliográficas.....	40

1. INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

El virus de influenza tipo A ha sido aislado de varias especies animales, entre las que se encuentran cerdos, caballos, felinos, mamíferos marinos, perros, humanos y un amplio número de aves domésticas y silvestres. Las aves son el principal huésped y reservorio debido a que se han aislado distintos subtipos del virus a partir de 90 de las 9600 especies de aves reportadas en el mundo. Lo anterior representa la presencia del virus en 17 de los 29 órdenes reconocidos como son: *Anseriformes*, *Charadriiformes*, *Ciconiiformes*, *Columbiformes*, *Falconiformes*, *Galliformes*, *Gaviiformes*, *Gruiformes*, *Passeriformes*, *Pelecaniformes*, *Piciformes*, *Podicipediformes*, *Procellariiformes*, *Psittaciformes*, *Casuariiformes*, *Struthioniformes* y *Rheiformes*. Siendo los *Anseriformes* y *Charadriiformes* en los que mayor frecuencia de aislamiento viral se ha reportado (1,2,3). La mayoría de los virus aislados en aves de estos órdenes, son de baja patogenicidad, y generalmente causan enfermedad subclínica o un cuadro respiratorio leve. Por el contrario, los virus de alta patogenicidad son principalmente aislados de *Galliformes* domésticas utilizadas en producción de carne y huevo como son los pollos, gallinas y guajolotes. En estas especies la enfermedad puede ser sistémica y fatal con alto impacto económico debido a la pérdida del comercio local e internacional y los gastos que implican las medidas de control y erradicación, como son el diagnóstico, cuarentena, eliminación de parvadas, limpieza, desinfección e indemnización (1,3).

ETIOLOGÍA Y ESTRUCTURA DEL VIRUS DE INFLUENZA TIPO A

El virus de influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, que está dividida en los tipos A, B y C, el virus de influenza aviar corresponde al tipo A. Es un virus envuelto de esférico a pleomórfico, de 80-120 nm con nucleocápside helicoidal, ocho segmentos de RNA de cadena sencilla (RNAs) en sentido negativo que codifican para nueve proteínas estructurales (PB1, PB1-F2, PB2, PA, HA, NP, NA, M1 y M2) y dos no estructurales (NS1 y NS2) que participan en la infección, replicación, inhibición del sistema inmune y liberación (4,5,6).

Las proteínas PB2, PB1 y PA que se traducen a partir de los genes virales uno, dos y tres respectivamente que forman el complejo de polimerasas virales, y se encargan de producir los intermediarios replicativos de RNA en sentido positivo que servirán de molde para generar RNAs virales y RNAs mensajeros virales (5,6).

La hemaglutinina (HA) se traduce a partir del segmento cuatro del genoma viral, es una glicoproteína presente en la envoltura de los viriones. Esta se une al ácido siálico presente en las glucoproteínas o glicolípidos presentes en la superficie celular para llevar a cabo la endocitosis mediada por receptor y fusiona la membrana del virión con la del endosoma, liberando así la ribonucleoproteína viral al citoplasma. La HA es un antígeno inmunogénico que induce la producción de anticuerpos neutralizantes y detectables en suero (5,6).

La nucleoproteína (NP) se traduce a partir del segmento cinco del genoma viral. Contiene secuencias señales de importación nuclear, que ayudan a la

ribonucleoproteína viral a ser transportada al núcleo celular. Regulan la transcripción de RNAs virales y estimulan la inmunidad celular y humoral (9,10).

La neuraminidasa (NA) se traduce a partir del segmento seis del genoma viral. Rompe la unión de la HA con el ácido siálico permitiendo la liberación de los viriones de la membrana plasmática celular durante el proceso de gemación viral. También es un antígeno inmunogénico (5,6).

Las proteínas M1 y M2 se traducen a partir del segmento siete del genoma viral. La proteína M1 es la más abundante en el virión y regula el ensamble de éstos mientras que la proteína M2 es un canal iónico que permite el paso de H⁺ desde el endosoma al interior del virión, lo que genera un cambio de pH permitiendo que la HA realice un cambio conformacional que origina que la ribonucleoproteína pueda disociarse de la proteína M1 (5,6).

Las proteínas NS1 y NS2 se traducen a partir del segmento ocho del genoma viral. NS1 inhibe el procesamiento de los RNAs mensajeros celulares favoreciendo la traducción de los RNAs mensajeros virales, además de inhibir la producción de interferón tipo uno. La NS2 regula la exportación nuclear de ribonucleoproteínas virales (5,6).

La tipificación de los virus de influenza A se basa en la combinación de una de las dieciséis HA y nueve NA en la superficie de la membrana viral que podrían dar origen a 144 subtipos diferentes. Sin embargo, son los virus con H5 y H7 los que han presentado la característica de cambiar de baja patogenicidad hacia alta patogenicidad en las aves domésticas y potencial zoonosis (1,3,7,8,9).

CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL

La replicación del virus de la influenza aviar comienza con la unión de la proteína HA a los receptores celulares que contienen ácido siálico con uniones 2-3 o 2-6 en sus glicoproteínas con la consecuente endocitosis mediada por receptor. La HA al encontrarse en el ambiente que se acidifica, realiza un cambio conformacional que genera la fusión de la membrana del virión con la membrana del endosoma logrando así la liberación de la nucleocápside. Previo a este paso, es necesario el desdoblamiento de la HA en HA1 y HA2 por enzimas tipo tripsina (virus de baja patogenicidad) o furina (virus de alta patogenicidad) para liberar la nucleocápside que llegará al núcleo. El complejo de transcriptasas virales a partir de RNA de sentido negativo, sintetiza seis RNAm monocistrónicos que serán traducidos en el citoplasma en las proteínas HA, NA, NP, PB1, PB2 y PA, así mismo, se sintetizan dos RNAm policistrónicos que mediante edición (splicing) generan dos RNAm cada uno (1,3,5,6).

Las proteínas transmembranales (HA, NA y M2) son translocadas y glicosiladas en el retículo endoplásmico rugoso; es importante resaltar que la presencia de glicosilación en el sitio de corte de la HA evita el corte por enzimas tipo tripsina, impidiendo el desdoblamiento de esta en HA1 y HA2. Posteriormente estas proteínas virales son enviadas al aparato de Golgi y a la membrana plasmática celular mediante tránsito vesicular. Los ocho genes y las proteínas virales NP, PB1, PB2, PA y M1, se ensamblan y migran hacia la membrana plasmática donde se localizan las proteínas transmembranales HA, NA y M2, ahí la proteína M1

promueve la asociación de los viriones con la membrana plasmática para ser liberados mediante gemación y por la enzima neuraminidasa (1,3,5,6).

PATOGENICIDAD

El grado de virulencia del virus (incorrectamente llamado internacionalmente patogenicidad) se ha asociado a la secuencia de aminoácidos presentes en el sitio de corte de la HA y la disponibilidad de las enzimas extracelulares o intracelulares en el huésped. Los virus que tienen baja patogenicidad presentan generalmente una sola arginina en el sitio de corte y una glicosilación en el residuo trece de la H1 que puede ser desdoblada por tripsina, mientras que aquellas enzimas como la furina cortan la secuencia con varios aminoácidos básicos. Se ha establecido que aquellos virus H5 o H7 con dos a siete aminoácidos en el sitio de corte pueden ser considerados de alta patogenicidad, pero puede haber excepciones (1,3,10,11,12).

Por otro lado, diferentes virus de influenza tienen diferente especificidad para ácido siálico (AS) unido a galactosa, mediante uniones alfa 2,3 o alfa 2,6, y esta es dependiente de los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión de la HA al ácido siálico. El intestino de las aves contiene predominantemente AS unido a galactosa mediante uniones alfa 2-3; en los cerdos el epitelio de la tráquea contiene AS unido a galactosa mediante uniones alfa 2-3 y alfa 2-6, mientras que en el epitelio de la tráquea del humano se expresa predominantemente AS unido a galactosa mediante uniones alfa 2-6. Lo anterior evidencia que la unión HA con AS determina la capacidad del virus para infectar a diferentes especies. Sin embargo, este proceso no se puede restringir a los aminoácidos básicos del sitio de corte de la HA y a la afinidad entre la HA y el AS, ya que hay evidencia sobre el papel de las polimerasas del virus y la NS1 en la patogenicidad, así mismo, la falta de conocimiento sobre la expresión de las enzimas en todos los epitelios del aparato respiratorio y digestivo de huéspedes susceptibles (1,3,13,14).

Anteriormente el grado de virulencia del virus también fue clasificado en cuatro grupos clínicos con base a la mortalidad, signos clínicos y lesiones, como se describe a continuación (1,3):

- Alta virulencia: corresponde a infecciones por virus de alta patogenicidad con hemaglutinina H5 o H7, en las que se desarrolla una enfermedad sistémica grave con afecciones cardiovasculares y nerviosas, y cuya morbilidad y mortalidad alcanza hasta del 100%.
- Moderada virulencia: corresponde a una infección por virus de baja patogenicidad acompañada con infecciones bacterianas que pueden secretar proteasas que rompan la HA en HA1 y HA2. El rango de mortalidad oscila entre 5-97%, donde las aves jóvenes o estresadas se ven más afectadas. Las lesiones generalmente se observan en aparato respiratorio, reproductor, urinario y en el páncreas.
- Baja virulencia: corresponde a infecciones con virus de baja patogenicidad. La mortalidad acumulada es menor al 5%. Lo signos clínicos se limitan a una enfermedad respiratoria leve y baja en la producción.

- Avirulentos: corresponde a infecciones con virus de baja patogenicidad sin mortalidad ni signos clínicos. Este tipo de manifestación es frecuente en aves silvestres acuáticas.

Los aislamientos del virus que reúnan los requisitos de alta virulencia también deben reunir otros criterios (15) como son:

1. Virus que tengan un índice de patogenicidad intravenoso (IPIV) mayor a 1.2 en pollos de seis semanas de edad.
2. Virus que mate al 75% de los pollos de cuatro a ocho semanas de edad que hayan sido inoculados por vía intravenosa.
3. Cualquier H5 o H7 con una secuencia de aminoácidos compatible con alta virulencia (alta patogenicidad) que mate menos del 75% de los pollos de cuatro a ocho semanas de edad que hayan sido inoculados por vía intravenosa.

Manifestación clínica y lesiones de virus de baja patogenicidad

Clínicamente en pollos estos virus se limitan principalmente al aparato respiratorio, manifestándose con epífora, rinorrea y estornudos. Las lesiones causadas por el virus son difíciles de observar porque son acompañadas por infecciones bacterianas como *Escherichia coli* y *Pasteurella multocida*. En la tráquea se observa congestión, edema y hemorragias con presencia de exudados seroso, mientras que en ocasiones se ha reportado bronconeumonía. Los cambios histológicos reportados son traqueítis linfocitaria y neumonía peribronquiolar linfocítica y en ocasiones neumonía difusa con edema de los capilares aéreos. También se ha reportado nefrosis, nefritis, pancreatitis con necrosis acinar y depleción linfoide en bolsa de Fabricio y timos (1,3,16,17,18,19,20,21,22,23,24). La mortalidad en aves de granja como los pollos oscila entre el 5 - 97% por complicaciones bacterianas. Al contrario, en las aves silvestres no se manifiestan signos clínicos (1,3).

Manifestación clínica y lesiones de virus de alta patogenicidad

En el caso de virus de alta patogenicidad los signos clínicos pueden estar ausentes y solo se presenta la muerte repentina de las aves. Pero normalmente se observa una evolución de la enfermedad entre los tres y siete días posteriores a la infección. Los signos clínicos que se observan consisten en temores, incapacidad para sostener la cabeza, tortícolis, bradistótonos, paresis, parálisis, edema, hemorragias y necrosis en múltiples órganos parenquimatosos, viscerales, mucosas, serosas y piel. También se observa hinchazón de la cabeza, cara y cuello como resultado de edema subcutáneo. En la cresta se puede observar hemorragias y cianosis. Los órganos linfoides como la bolsa de Fabricio y timo se atrofian. Lo anterior da como resultado una mortalidad del 50 – 100%. En aves silvestres, los virus de alta patogenicidad suelen manifestarse como virus de baja patogenicidad con excepción de los virus H5N1 de linaje asiático. Los cambios histológicos consisten en inflamación, hemorragias, edema y necrosis en cerebro,

corazón, páncreas, pulmón y órganos linfoides secundarios. Se puede observar meningoencefalitis linfocítica con gliosis focal, necrosis neuronal y neuronofagia. El corazón muestra necrosis multifocal de los miocitos cardiacos usualmente acompañada de inflamación linfomonocitaria. Hay microtrombos dentro de los capilares y vasos sanguíneos, acompañada por vasculitis y edema subcutáneo y necrosis del endotelio capilar. También se puede observar necrosis de miofibrillas musculares, túbulos renales, endotelio vascular, corteza adrenal, acinis pancreáticos y depleción linfoide en bolsa de Fabricio y Timo (1,3,7,16,18,21,25,26,27,28,29).

PATOGENIA

El virus está presente en los aerosoles por estornudo o expectoración de un ave enferma y todo el material, agua y alimento que haya sido expuesto a los aerosoles y heces del ave enferma. El virus infecta al ave sana a través de las mucosas de la rinoteca, conjuntiva, laringe-tráquea, coana y aparato digestivo con base a sus mecanismos de patogenicidad y la susceptibilidad del huésped. Una vez infectada la mucosa, la diseminación del virus en el organismo dependerá de los mecanismos de virulencia (1,3).

PATOGENIA DEL VIRUS DE BAJA PATOGENICIDAD

Estos virus se replican en la mucosa respiratoria e intestinal. Sin embargo, se ha reportado esporádicamente que algunas cepas como la A/Chicken/Hidalgo/26654-1368/94, la A/Chicken/Jalisco/14589-660/94 y la A/Chicken/Ibaraki/1/05 del VIA H5N2 de BP pueden llegar a los túbulos renales, epitelio de los acinis pancreáticos. Sin embargo, el tropismo renal de estas cepas, está relacionado con inoculaciones en pollo por vía intravenosa. Si no hay complicaciones bacterianas o por causas ambientales, las aves se recuperan y sobreviven, de lo contrario la muerte del ave sobreviene como consecuencia de las lesiones respiratorias (1,3,16,17,18,19,20,21,22,23,24).

PATOGENIA DEL VIRUS DE ALTA PATOGENICIDAD

Después de llegar a la mucosa, el virus invade la submucosa y entra en los capilares sanguíneos. El virus se replica en el endotelio vascular y se esparce sistémicamente en una gran variedad de órganos y tejidos. La replicación del virus en estos órganos origina una segunda viremia la cual provoca microtrombos, trombos y falla orgánica múltiple como consecuencia del daño causado por el virus de influenza por los siguientes cuatro procesos: 1) Replicación del virus dentro de las células (necrosis), 2) Efecto indirecto de citocinas (apoptosis e inflamación), 3) Isquemia por el daño vascular y 4) Choque vascular (3,29).

IDENTIFICACIÓN DE VIRONES EN TEJIDOS

La presencia del VIA puede ser evidenciada mediante microscopía electrónica, inmunofluorescencia, microscopía confocal e inmunohistoquímica. Entre estas técnicas, la inmunohistoquímica tiene la ventaja de ser la más accesible en cuanto a precio y equipo de laboratorio. Uno de los protocolos mas utilizados es a través del sistema ABC que consiste en utilizar un anticuerpo biotinilado llamado secundario, que se une a otro anticuerpo que tiene alta afinidad para el antígeno

que se desea evidenciar llamado primario, y finalmente una enzima biotilada que al unirse a uno de los cuatro sitios de unión con los que cuenta la avidina para la biotina, forma complejos macromoleculares conformados por anticuerpos, biotina, avidina y enzima, lo que le confiere gran sensibilidad a este método. Posteriormente se genera una tinción al agregar un cromógeno específico para la enzima. En estos estudios se han empleado anticuerpos primarios policlonales producidos en pollo mediante inmunizaciones consecutivas con el VIA H5N2 o anticuerpos monoclonales contra la proteína matriz o la nucleoproteína del VIA (17,18,21,30).

JUSTIFICACIÓN

Los subtipos del virus de influenza aviar causantes de enfermedad son el H5, H7 y H9. El subtipo H5N1 de alta patogenicidad ha causado enfermedad grave en varias especies: pollos, gallinas, gallos, patos, gansos, cisnes, entre otras aves. En México, prevalece el subtipo H5N2 de baja patogenicidad en pollos, gallinas y gallos desde hace dieciséis años. Sin embargo, se desconoce si el subtipo mexicano causa daño en patos domésticos y por lo tanto existe incertidumbre en el diagnóstico de enfermedades respiratorias de patos y la participación de esta especie en la epidemiología de la enfermedad en México (1,3).

2. HIPÓTESIS

El pato Pekín es menos susceptible a la infección por el VIA BP A/pollo/México/2007 (H5N2) al encontrarse en menos órganos y causar lesiones menos severas que los pollos.

3. OBJETIVOS

GENERAL

Describir la susceptibilidad del pato Pekín a la infección experimental por el VIA BP A/pollo/México/2007 (H5N2) mediante la observación de signos, lesiones macroscópicas y microscópicas, aislamiento viral y detección del virus por inmunohistoquímica.

PARTICULARES

1. Producir antisuero policlonal en conejos Nueva Zelanda y en aves Leghorn contra el VIA BP A/pollo/Mexico/2007 (H5N2) para utilizarlo en la prueba de inmunohistoquímica.
2. Validar el antisuero policlonal por inhibición de la hemoaglutinación y precipitación en gel de agar.
3. Estandarizar la técnica de inmunohistoquímica para el virus de influenza aviar H5N2, utilizando pollos Leghorn de cuatro semanas SPF infectados con el virus H5N2 de AP como testigo positivo.
4. Describir los signos y lesiones (macroscópicas y microscópicas) que se presentan en el pato Pekín de 26 días de edad, después de la inoculación con el virus H5N2 de BP, mediante necropsia y observación de cortes de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina.

5. Demostrar la presencia o ausencia del virus H5N2 de BP en órganos del sistema respiratorio, digestivo y linfático en el pato Pekín de 26 días de edad por inmunohistoquímica y aislamiento viral.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

LUGAR DE TRABAJO

Los estudios que implicaron la manipulación del virus activo en aves vivas y su aislamiento a partir de muestras de tejidos, fueron realizados en el laboratorio y unidades de aislamiento de alta seguridad CENID-Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), mientras que los estudios que implicaron el uso de muestras para histopatología e inmunohistoquímica fueron realizados en el laboratorio de histopatología del Departamento de Medicina y Zootecnia de las Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

DISEÑO EXPERIMENTAL

En una unidad de aislamiento con presión negativa del CENID-Microbiología INIFAP, se alojaron en forma separada 12 patos Pekín y 12 pollos Leghorn de 26 días de edad. Las aves fueron inoculadas con el VIA BP A/pollo/Mexico/2007 (H5N2) a una dosis de 1×10^7 DIEP_{50%}/ml; el mililitro del inóculo fue repartido en narinas, ojos y tráquea. En otra unidad de aislamiento, se mantuvieron tres pollos y tres patos sin inocular. Posterior al desafío, se recolectaron 3 ml de sangre sin anticoagulante a partir de la vena del metatarso y vena radial, de tres patos y tres pollos, respectivamente para obtener suero y realizar la prueba de inhibición de la hemoaglutinación para el VIA H5N2 (31). El cuidado y eutanasia de las aves se realizó con base a los lineamientos del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE), mediante la aplicación intravenosa de 100mg/kg de pentobarbital sódico. El sacrificio de tres aves se realizó a las 12, 24, 48 y 72 horas posinoculación. Durante la necropsia, se colectó tejido de cornetes nasales (cornete medio), laringe-tráquea, pulmón, duodeno, tonsilas cecales, parte media del intestino (a nivel del divertículo de Meckel), bazo, bolsa de Fabricio, glándula de Harder y timo. La necropsia y toma de muestras de los testigos negativos se realizó a las 72 horas posinoculación (Anexo 1).

PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO PRIMARIO PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

Se llevó a cabo mediante la inmunización de dos conejos machos raza Nueva Zelanda, de seis meses de edad, y de dos gallinas Leghorn SPF de seis meses. A todos los animales se les aplicó por vía subcutánea en la región de la espalda, entre ambas escapulas, diez dosis de una vacuna emulsionada del virus H5N2 de IA (Emulax AI^R, grupo IASA); con intervalos de dos semanas; posterior a la segunda aplicación, los intervalos fueron de un mes hasta completar siete inoculaciones. Posteriormente se obtuvieron 10 ml de sangre y se dejó coagular por 30-60 minutos y se mantuvo a 4° C durante toda la noche para la obtención del suero. El suero fue obtenido por centrifugación a 1000xg por diez minutos a 4° C, y almacenado a -20° C hasta su utilización (32).

VALIDACIÓN DEL ANTISUERO POR PRECIPITACIÓN EN GEL DE AGAR

Para determinar la presencia de anticuerpos específicos contra el virus de influenza aviar H5N2 en el suero, se realizó la prueba precipitación en gel de agar (PGA) (31). Posteriormente se realizó la dilución de los sueros de trabajo a razón de 1/2000 en PBS pH 7.4, con 1% de albúmina sérica bovina (ASB) libre de inmunoglobulinas y triglicéridos (Bovine Serum Albumin Fraction V, Fatty Acid free ROCHE^R), y se realizaron alícuotas de 10 ml que se almacenaron a 4° C hasta su uso (32).

TEJIDOS POSITIVOS PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

Como testigo positivo del tejido, se utilizó una muestra de cresta fijada en formalina e incluida en parafina, que se obtuvo de un ave Leghorn SPF de cuatro semanas, cuatro días pos-inoculación con una cepa del virus de IA de AP donada por el CENID-Microbiología. Como testigo negativo del anticuerpo primario se utilizó la misma muestra de tejido, pero se cambió la incubación con el anticuerpo primario por suero de pollo o de conejo diluido 1/2000 pH 7.4 con 1% de ASB y sin anticuerpos contra el virus de influenza aviar detectables por PGA. Como testigo negativo del tejido se utilizaron cortes de tráquea y bolsa de Fabricio provenientes de aves Leghorn de 3 semanas de edad no inoculadas que fueron negativas a la presencia de anticuerpos contra influenza aviar por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.

PREPARACIÓN DE LAMINILLAS PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cortes obtenidos para inmunohistoquímica fueron adheridos en laminillas tratadas previamente con Poly-L-Lysina (Sigma^R) (Anexo 2) (33).

PROCESAMIENTO DE TEJIDOS EN LAMINILLAS

Los órganos obtenidos en las necropsias de las aves fueron fijados en formalina amortiguada al 10% por 12 horas, seguido por una deshidratación, aclaramiento e infiltración en parafina. Posteriormente se realizó la inclusión de los órganos en parafina, se obtuvieron cortes de 3 micras por medio de un microtomo, y se montaron los cortes mediante flotación en laminillas sin Poly-L-Lysina para histopatología y con Poly-L-Lysina para inmunohistoquímica. A continuación, las muestras para histopatología fueron teñidas en forma convencional (34).

HISTOPATOLOGÍA

Las laminillas se observaron en un microscopio óptico y las lesiones histológicas fueron analizadas en forma subjetiva en rangos de 0.1-1 (grado leve), 1.1-2 (moderado) y 2.1-3 (severo), para facilitar la interpretación se calculó la media histológica de la lesión (Anexo 3).

PROCESAMIENTO DE LAMINILLAS PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

Desparafinado e hidratación de muestras: Las laminillas fueron incubadas a 60° C por dos horas y posteriormente sumergidas en xilol, alcohol y agua destilada (Anexo 4).

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Protocolos empleados: El descarte de biotina endógena, proteínas ligadoras de biotina y fosfatasa endógena en los tejidos se realizó mediante la substitución del anticuerpo primario por PBS pH 7.4 con 1% de albúmina sérica bovina en la técnica de inmunohistoquímica. Con base a la técnica de inmunohistoquímica, se probaron 7 protocolos distintos con la finalidad de elegir el mejor método con base a la técnica de recuperación antigénica, que tiene como finalidad la exposición de antígenos que quedan ocultos a causa de la fijación con formol y el tipo de anticuerpo primario que presente mayor especificidad antigénica y menor tinción de fondo inespecífica, como sigue:

- 1 Anticuerpo primario de pollo con recuperación antigénica enzimática. (Anexo 5)
- 2 Anticuerpo primario de pollo con bloqueo de inmunoglobulinas endógenas sin método de recuperación antigénica. (Anexo 6)
- 3 Anticuerpo primario de pollo con bloqueo de inmunoglobulinas endógenas con recuperación antigénica enzimática. (Anexo 7)
- 4 Anticuerpo primario de pollo con bloqueo de inmunoglobulinas endógenas con recuperación enzimática por calor con amortiguador de citrato. (Anexo 8)
- 5 Anticuerpo primario de conejo sin método de recuperación antigénica. (Anexo 9)
- 6 Anticuerpo primario de conejo con recuperación antigénica enzimática. (Anexo 10)
- 7 Anticuerpo primario de conejo con recuperación enzimática por calor con amortiguador de citrato (Anexo 11).

Recuperación antigénica por enzimas: Las laminillas fueron incubadas con una solución de pronasa (ROCHE^R) al 0.5% diluida en Tris 100mM, pH 7.5, con 0.5% de duodecil sulfato de sodio (SDS) a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente se hicieron 2 lavados con PBS pH 7.4 por 5 minutos cada uno.

Recuperación antigénica por calor en buffer de citrato: Las laminillas fueron sumergidas en una solución de citrato de sodio a 0.01 M, pH 6 y colocadas en el horno de microondas (Gold Start^R MA-6805, 2450MHz, 120V-60Hz, 910W, 8.5A) por 5 minutos con un nivel medio de potencia, posteriormente las laminillas se dejaron reposar en la misma solución a temperatura ambiente por 15 minutos seguido de 2 lavados de 5 minutos en PBS a pH 7.4.

Bloqueo: Se realizó mediante la incubación con suero normal de cabra al 2% (VECTOR LABORATORIES¹) diluido con PBS pH 7.4 con 1% de albúmina sérica bovina libre de inmunoglobulinas y triglicéridos (BSA Fracción V, ROCHE^R, por 30 minutos a temperatura ambiente seguido de 2 lavados con PBS pH 7.4 de 5 minutos cada uno.

Unión del anticuerpo primario: El antisuero anti-H5N2BP de conejo o de pollo diluido en PBS pH 7.4 con 1% de albúmina sérica bovina, se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente seguido de dos lavados con PBS pH 7.4 de 5 minutos cada uno.

Detección: La detección de los anticuerpos anti-H5N2BP se realizó mediante el uso del sistema comercial avidina-fosfatasa para inmunoglobulinas de conejo (VECTASTAIN^R ABC-AP Kit Rabbit IgG) y para inmunoglobulinas de pollo (VECTASTAIN^R ABC-AP Kit Chicken IgG), y el sistema comercial para evaluar la reacción enzimática con fosfatasa alcalina (VECTOR Red Substrate Kit^R). Entre cada incubación se realizaron dos lavados con PBS a pH 7.4 de cinco minutos cada uno. El uso del sustrato de la enzima fosfatasa alcalina se evidenció como precipitados de color rojo en la laminilla.

Contraste y montaje de las laminillas: Después del lavado de las laminillas en agua corriente, estas fueron sumergidas en una solución de hematoxilina de Harris por 5 minutos para lograr contraste. Finalmente las laminillas fueron lavadas en agua corriente para seguidamente ser deshidratadas y aclaradas en alcohol y xilol antes del montaje con resina (Anexo 12) (32).

TITULACIÓN VIRAL PARA EL DESAFÍO

Se utilizó un VIA BP A/pollo/México/2007 (H5N2) del CENID-Microbiología INIFAP donado por la CPA. El virus de replico con las medidas de bioseguridad adecuadas mediante dos pases consecutivos en embrión de pollo SPF ALPES II de nueve días de edad para alcanzar el título requerido (ALPES, Grupo IDISA, Tehuacán Puebla), siguiendo los procedimientos estandarizados y bajo las medidas de bioseguridad adecuadas (31). La titulación del virus fue realizada con base a la dosis infectante en embrión de pollo al 50% (DIEP₅₀) utilizando el método de Reed y Muench (1993). Se realizaron diluciones decuples seriadas para obtener un título de 10^7 DIEP₅₀/ml (35).

ANIMALES PARA EXPERIMENTACIÓN

En México no hay embriones de pato Pekín SPF, por lo tanto se adquirieron embriones de pato Pekín de una granja comercial productora de pato con certificado libre de enfermedades en campaña oficial (influenza aviar, enfermedad de Newcastle y Salmonelosis) ubicada en Cuernavaca Morelos. Los embriones fueron almacenados a 13° C y 70-80% de humedad por 2 días y llevados posteriormente a una incubadora privada ubicada en Tepetzotlán Estado de México en donde se recogieron al día siguiente de su nacimiento. Los patos fueron alojados en una unidad de aislamiento con sistema de filtración a presión negativa, con jaulas en batería convencionales con calefacción artificial y agua y alimento *ad libitum*. Todos los patos fueron identificados individualmente con cintas de colores en el metatarso. En el caso de los pollos, se adquirieron embriones de nueve días libres de patógenos específicos (SPF), tipo ALPES II comprados a la empresa IASA S.A. de C.V., los pollitos obtenidos de la incubación, fueron alojados con las mismas condiciones de crianza que los patos, pero en cuarto y jaulas independientes. Una semana antes de llevar a cabo el desafío experimental, todos los patos y pollos fueron monitoreados por inhibición de la hemoaglutinación y aislamiento a partir de laringe-tráquea y cloaca para el VIA BP H5N2 y enfermedad de Newcastle, así como para *Pasteurella spp* y *Salmonella spp*. El

10

Susceptibilidad del pato doméstico (Pekín) a la infección por el virus de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad

Ernesto Godínez García

bienestar y número de animales fue llevado conforme al protocolo autorizado por el CICUAE.

COLECTA DE TEJIDOS

Para la histopatología e inmunohistoquímica fueron colectadas muestras de 3mm de espesor aproximadamente de cada órgano parenquimatoso y 2 cm de longitud para cada órgano tubular, las cuales fueron almacenadas en un frasco con formalina amortiguada al 10%. Las muestras fijadas en formalina fueron procesadas a las 12 horas hasta la inclusión en parafina.

Para el aislamiento viral se colectó 1cm³ de cada órgano que fue almacenado en una bolsa de cierre hermético (Ziploc^R) a -70° C.

AISLAMIENTO VIRAL

Con la finalidad de relacionar las lesiones histopatológicas con la presencia del VIA BP H5N2, se realizó el aislamiento viral a partir de macerados de tejidos de los 3 patos y los 3 pollos en forma separada (Anexo 13) (31).

Se inocularon cinco embriones de pollo ALPES II de nueve días de edad (ALPES, Grupo IDISA Tehuacán Puebla) con 0.2ml del homogenizado por la vía de la cavidad alantoidea. Los embriones fueron incubados a 37° C durante 3 días. Durante los 3 días los embriones fueron revisados diariamente por ovoscopio para remover los embriones muertos. Aquellos embriones que murieron después de las 24 hrs de inoculación se les recolectó el líquido alantoideo para evidenciar la presencia del virus. A las 72hrs posinoculación, todos los embriones vivos se removieron de la incubadora y se mantuvieron a 4° C por 4 horas para ser sacrificados. Inmediatamente se recolectó el líquido alantoideo para realizar la prueba de hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación. Aquellos líquidos alantoideos que resultaron negativos a la hemoaglutinación se les realizaron un segundo pase en embriones de pollo de 9-11 días de desarrollo embrionario (31,35).

HEMOAGLUTINACIÓN

El procedimiento para la identificación de partículas hemoaglutinantes en líquido alantoideo inoculado con el sobrenadante de tejidos macerados en CTF se realizó conforme a los métodos estandarizados (Anexo 14) (31).

INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN

El procedimiento para la identificación del virus de IA H5N2 y descartar la presencia del virus de la enfermedad de Newcastle (ENC) a partir de líquido alantoideo positivo a la hemoaglutinación, se realizó conforme a los métodos estandarizados (Anexo 15) (31)

4. RESULTADOS

AVES LIBRES DE INFLUENZA AVIAR, ENFERMEDAD DE NEWCASTLE, SALMONELLA SPP Y PASTEURELLA SPP.

Con la finalidad de constatar la ausencia de infecciones previas a la inoculación experimental de los patos y pollos, se realizaron pruebas para aislamiento viral de Influenza aviar, enfermedad de Newcastle y aislamiento bacteriológico para *Salmonella spp* y *Pasteurella spp.*, así como serología para Influenza aviar y Enfermedad de Newcastle una semana antes de aplicar el inoculo. Todas las aves resultaron negativas al aislamiento a partir de muestras de hisopos cloacales y orofaríngeos, así como negativas a la presencia de anticuerpos detectables por HI para IA y enfermedad de Newcastle.

SIGNOS Y LESIONES MACROSCOPICAS A LA NECROPSIA

Todas las aves del grupo testigo negativo no presentaron signos y lesiones macroscópicas, pero sí cambios histológicos a las 72 horas posinoculación (HPI).

PATOS INOCULADOS

En los patos inoculados no se presentaron signos clínicos de enfermedad, las lesiones a la necropsia incluyeron presencia de petequias en timo en moderada cantidad a las 24 HPI 1/3 y consolidación con coloración gris peribronquial moderada (neumonía) a las 72 HPI 3/3. (Cuadro 1)

POLLOS INOCULADOS

Todos los pollos Leghorn inoculados presentaron estertores nasales moderados a partir de las 48 HPI. Las lesiones en los pollos inoculados se presentaron a partir de las 48 HPI, y consistieron en blefaritis leve 3/3 y rinitis catarral leve 3/3 a las 72 HPI, además de las lesiones anteriores, se presentó atrofia de timos moderada 3/3. (Cuadro 1)

Cuadro 1: Evolución de signos y lesiones en patos inoculados con el VIA H5N2 de BP y testigos positivos.

Signos y lesiones en patos Pekín	12 HPI	24 HPI	48 HPI	72 HPI
Signos				
Estertores nasales	(-)	(-)	(-)	(-)
Lesiones a la necropsia				
Petequias en timos	(-)	(++)1/3	(-)	(-)
Neumonía peribronquial	(-)	(-)	(-)	(++)3/3
Signos y lesiones en pollos Leghorn	12 HPI	24 HPI	48 HPI	72 HPI
Signos				
Estertores nasales	(-)	(-)	(++)3/3	(++)3/3
Lesiones a la necropsia				
Blefaritis	(-)	(-)	(+)3/3	(+)3/3
Rinitis catarral	(-)	(-)	(++)3/3	(++)3/3
Atrofia de timos	(-)	(-)	(-)	(++)3/3

(+)=Leve, (++)=Moderado, (+++)=Severo

AISLAMIENTO VIRAL

El virus fue recuperado a partir de tejidos del aparato respiratorio de los pollos inoculados durante todo el estudio, mientras que en patos se aisló en tracto respiratorio superior. En pollos también se aisló de glándula de Harder, párpado y bolsa de Fabricio, pero inesperadamente también de timo (Cuadro 2). Todos los sueros de los pollos y patos fueron negativos al virus de la ENC y positivas al VIA H5N2 mediante inhibición de la hemoaglutinación en placa.

En los patos inoculados se logró el aislamiento a partir de los tejidos donde se inoculó el virus, como fueron cornetes nasales desde las 12 hasta las 48 HPI y a partir de laringe-tráquea a las 12, 24 y 72 HPI, además de pulmón a las 12 HPI. En los patos no inoculados se aisló el virus de IA H5N2 a partir de muestras de pulmón, bazo, duodeno e intestino a nivel del divertículo de Meckel.

En los pollos se aisló el virus a partir de muestras de cornetes nasales desde las 12 HPI hasta las 72 HPI; laringe-tráquea desde las 12 hasta las 72 HPI; en pulmón desde las 12 hasta las 48 HPI; en párpado a las 12, 24 y 72 HPI; en timo a las 12 y 72 HPI, bolsa de Fabricio a las 72 HPI y glándula de Harder desde las 12 hasta las 72 HPI. Los resultados muestran la presencia del virus en las mucosas de los tejidos desde las 12hrs, lo cual coincide con la patogenia publicada (2,3,16,17,18,19,20,21,22,23,24). Mientras que en los pollos sin inocular no se aisló el virus.

CUADRO 2: AISLAMIENTOS DEL VIA H5N2 DE BP EN EMBRION DE POLLO

	Clave	AV/PI	Control	12HPI	24HPI	48HPI	72HPI
Patos Pekín	Cor	0/5	0/5	5/5	3/5	4/5	0/5
	LT	0/5	0/5	5/5	3/5	0/5	4/5
	Pul	0/5	2/5	2/5	0/5	0/5	0/5
	Par	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Tim	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	BF	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Bz	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	GH	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5
	TC	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Duo	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Mk	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Pollos Leghorn	Cor	0/5	0/5	5/5	5/5	4/5	4/5
	LT	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	3/5
	Pul	0/5	0/5	3/5	4/5	2/5	0/5
	Par	0/5	0/5	5/5	4/5	0/5	3/5
	Tim	0/5	0/5	3/5	0/5	0/5	3/5
	BF	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5
	Bz	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	GH	0/5	0/5	5/5	5/5	2/5	2/5
	TC	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Duo	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	MK	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

AV/PI=Aislamiento viral previo a la inoculación, Cor=Cornete nasal LT=Laringe-Tráquea, Pul=Pulmón, Par=Parpado, Tim=Timo, BF=Bolsa de Fabricio, Bz=Bazo, GH= Glandula de Harder, Tc=Tonsila cecal, Duo=Duodeno Mk=Yeyuno a nivel del divertículo de Mekel.

HISTOPATOLOGÍA

Los patos Pekín (Cuadro 3) mostraron lesiones de leve a moderado en el aparato respiratorio mientras que los pollos Leghorn (Cuadro 4) mostraron lesiones de moderado a severo en todo el aparato respiratorio. Sin embargo, en ambas especies se observaron otros cambios en diferentes órganos.

HISTOPATOLOGIA EN PATOS PEKÍN

CORNETE NASAL

El 33% de los patos Pekín inoculados presentó rinitis linfocitaria leve desde las 12 HPI, mientras que un pato a las 24 y uno a las 48 HPI (16% de todos los patos inoculados) presentaron rinitis linfocitaria moderada. La misma lesión se encontró en el 66% de los controles negativos con un grado leve (Figura 1A) (Cuadro 3).

SENO INFRAORBITARIO

El 25% de los patos Pekín inoculados presentó sinusitis linfocitaria leve y el 16% moderada a partir de las 12 HPI. Los controles negativos no presentaron estas lesiones (Figura 1B) (Cuadro 3).

DERMIS QUE CUBRE EL SENO INFRAORBITARIO

Los patos Pekín no presentaron lesiones en esta región (Cuadro 3).

LARINGE-TRAQUEA

A partir de las 12 HPI, el 41% de los patos Pekín inoculados presentó laringotraqueítis linfocitaria leve, el 8% moderada y el 33% severa. El 100% de los controles negativos presentó esta lesión con un grado de severidad leve (Figura 1C) (Cuadro 3).

PULMÓN

A partir de las 12 HPI, el 33% de los patos Pekín inoculados presentaron focos neumónicos linfoides leves, el 41% moderados y el 25% severos. En los controles negativos esta lesión se presentó con un grado de severidad moderado en el 100% de las aves (Figura 1D) (Cuadro 3).

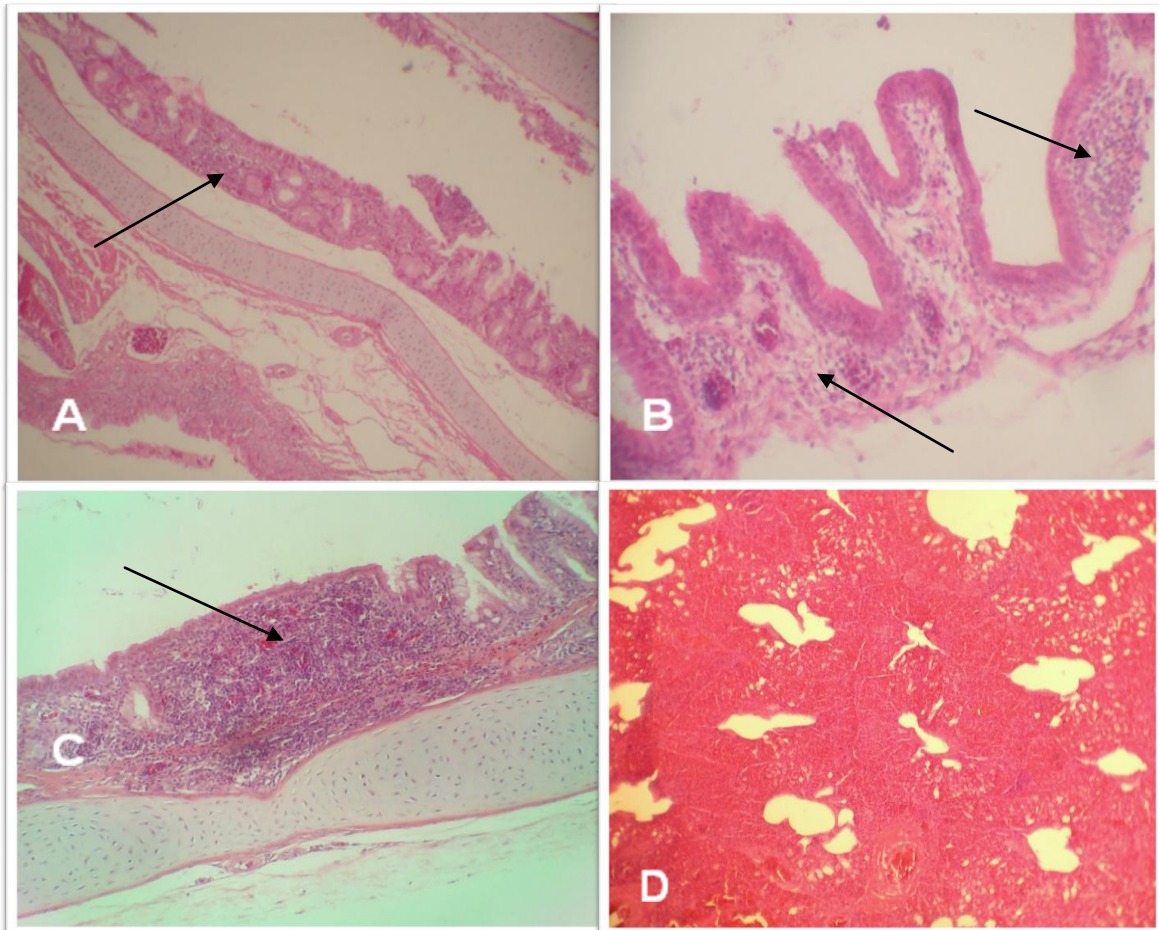


Figura 1, lesiones histológicas, HyE: Pato Pekín de 26 días, inoculado con el VIA H5N2 de BP. (A) Rinitis linfocitaria moderada, 24 HPI, 3.2X. (B) Sinusitis linfocítica moderada, 48 HPI, 10X. (C) Laringotraqueítis linfocitaria severa, 48 HPI, 10X. (D) Focos neumónicos linfoides severos que abarcan el 100% de la imagen, 72 HPI, 10X.

PÁRPADO

El 9% de los patos Pekín inoculados presentó blefaritis linfocitaria leve y el 36% moderada desde las 12 HPI. El 33% de las aves no inoculadas presentó esta lesión con un grado leve y el 66% con un grado moderado de severidad (Figura 2A) (Cuadro 3).

TIMO

A partir de las 12 HPI, el 41% de los patos Pekín inoculados presentó atrofia de la zona cortical en timo con un grado de severidad leve y el 16% moderada. Las aves no inoculadas no presentaron esta lesión (Figura 2B) (Cuadro 3).

El 25% de los patos inoculados presentó apoptosis leve en timo, el 50% moderada y el 16% severa en timo, a partir de las 12 HPI. El 33% de las aves no inoculadas presentó esta misma lesión con grado moderado y el 66% con grado severo (Figura 2B) (Cuadro 3).

BOLSA DE FABRICIO

A partir de las 12 HPI, el 8% de los patos Pekín inoculados presentó apoptosis leve en los folículos de la bolsa de Fabricio, el 50% moderada y el 41% severa. En el 100% de los controles negativos se presentó la misma lesión en un grado de severidad moderado. (Figura 2C). El 41% de los patos Pekín inoculados presentó depleción leve de la zona cortical en los folículos de la bolsa de Fabricio, a partir de las 12 HPI. Esta lesión no se presentó en aves no inoculadas (Cuadro 3).

A partir de las 12 HPI, el 50% de los patos Pekín inoculados presentó depleción leve en la zona medular de los folículos de la bolsa de Fabricio, el 25% moderada y el 16% severa. Esta lesión se presentó en el 33% de las aves sin inocular con un grado de severidad leve y en el 33% con grado moderado (Figura 2C). (Cuadro 3).

GLÁNDULA DE HARDER

El 83% de los patos Pekín inoculados presentó desarrollo de tejido linfoide leve en la glándula de Harder y en el 8% fue moderado. En aves sin inocular se observó desarrollo de tejido linfoide leve en el 66% de las aves (Figura 2D) (Cuadro 3).

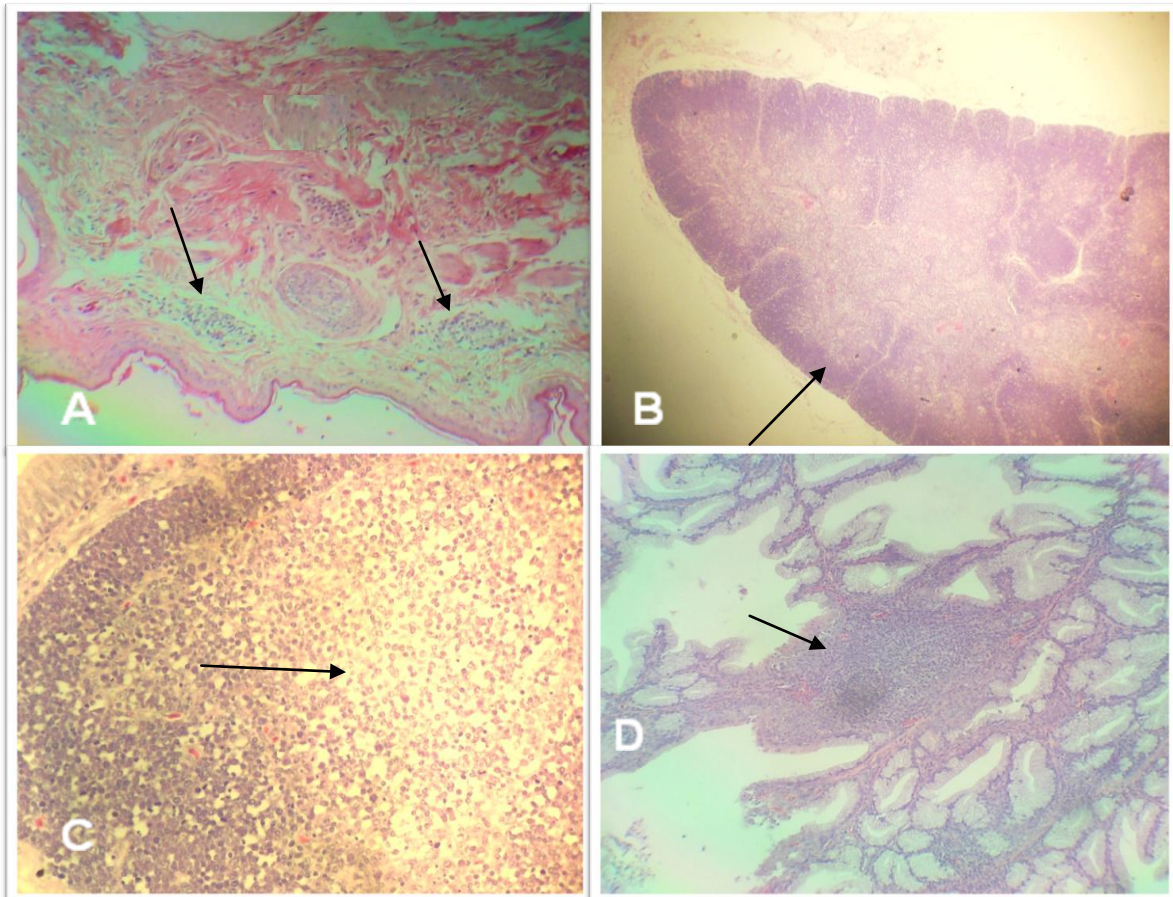


Figura 2, lesiones histológicas HyE: Patos Pekín de 26 días, inoculado con el VIA H5N2 de BP. (A) Blefaritis linfocitaria moderada, 48 HPI, 10X. (B) Timo con atrofia cortical moderada por apoptosis severa, 72 HPI, 10X, (C) Bolsa de Fabricio con depleción medular moderada y apoptosis severa, 72 HPI, 40X. (D) Glándula de Harder con desarrollo de tejido linfoide leve, 48 HPI, 10X.

OTROS ÓRGANOS

Las lesiones encontradas en duodeno, intestino a nivel del divertículo de Meckel, tonsilas cecales y bazo, carecen de valor para este estudio, debido a la ausencia de aislamiento viral en estos órganos y la falta de información científica que sugiera que son órganos para un VIA de BP.

CUADRO 3: Evolución de lesiones histopatológicas en patos Pekín inoculados con el VIA H5N2 de BP.

	12 HPI	MHL 12HPI	24 HPI	MHL 24HPI	48 HPI	MHL 48HPI	72 HPI	MHL 72HPI	CN	MHL CN
Cornetes nasales										
Rinitis linfocitaria	(+) ¹ / ₃	0.33	(+) ¹ / ₃ (++) ¹ / ₃	1.00	(++) ¹ / ₃	0.66	(+) ² / ₃	0.66	(+) ² / ₃	0.66
Seno infraorbitario										
Sinusitis linfocitaria	(+) ¹ / ₃ (++) ¹ / ₃	1.00	(+) ¹ / ₃	0.33	(++) ¹ / ₃	0.66	(+) ¹ / ₃	0.33	(-)	0.00
Sinusitis linfocitaria asociada a infiltración heterofílica	(+++) ² / ₃	2.00	(+) ¹ / ₃	0.33	(-)	0.00	(+) ¹ / ₃	0.33	(-)	0.00
Dermis que recubre el seno infraorbitario										
Infiltración linfocitaria perivasular	(-)	0.00	(-)	0.00	(-)	0.00	(-)	0.00	(-)	0.00
Dermatitis linfocitaria asociada a infiltración heterofílica	(-)	0.00	(-)	0.00	(-)	0.00	(-)	0.00	(-)	0.00
Laringe/Tráquea										
Laringotraqueítis linfocitaria	(+) ¹ / ₃ (+++) ² / ₃	2.33	(+) ² / ₃ (++) ¹ / ₃	1.33	(+) ² / ₃ (+++) ¹ / ₃	1.66	(+++) ¹ / ₃	1.00	(+) ³ / ₃	1.00
Traqueítis linfocitaria asociada a infiltración heterofílica	(+) ² / ₃ (++) ¹ / ₃	1.33	(+) ² / ₃	0.66	(+) ³ / ₃	1.00	(+) ¹ / ₃	0.33	(+) ² / ₃	0.66
Pulmón										
Bronquitis linfocitaria	(+) ¹ / ₃ (++) ² / ₃	1.66	(+) ¹ / ₃	0.33	(+) ² / ₃ (++) ¹ / ₃	1.33	(+) ² / ₃ , (++) ¹ / ₃	1.33	(+) ¹ / ₃	0.33
Bronquitis linfocitaria asociada a infiltración heterofílica	(+) ¹ / ₃	0.33	(-)	0.00	(-)	0.00	(+) ¹ / ₃	0.33	(-)	0.00
Focos neumónicos linfoides	(+) ¹ / ₃ (++) ² / ₃	1.66	(+) ² / ₃ (++) ¹ / ₃	1.33	(+) ¹ / ₃ (++) ¹ / ₃ (+++) ¹ / ₃	2.00	(++) ¹ / ₃ (+++) ² / ₃	2.66	(++) ³ / ₃	2.00
Párpado										
Blefaritis linfocitaria	(++) ² / ₃	1.33	(++) ¹ / ₃	0.66	(+) ¹ / ₂	0.50	(++) ¹ / ₃	0.66	(+) ¹ / ₃ (++) ² / ₃	1.66
Blefaritis linfocitaria asociada a infiltración heterofílica	(-)	0.00	(-)	0.00	(-)	0.00	(+) ¹ / ₃	0.33	(+) ² / ₃	0.66

	12 HPI	MHL 12HPI	24 HPI	MHL 24HPI	48 HPI	MHL 48HPI	72 HPI	MHL 72HPI	CN	MHL CN
Timo										
Atrofia de zona cortical	(+)/3	0.33	(+)/3	0.33	(+)/2/3	0.66	(+)/1/3 (++)/2/3	1.66	(-)	0.00
Apoptosis	(++)/1/3 (+++)/1/3	1.66	(+)/2/3 (++)/1/3	1.33	(+)/1/3 (++)/2/3	1.66	(++)/2/3 (+++)/1/3	2.33	(++)/1/3 (+++)/2/3	2.66
Bazo										
Atrofia linfoides folicular	(+)/1/3	0.33	(+)/1/3	0.33	(-)	0.00	(-)	0.00	(+)/2/3	0.66
Bolsa de Fabricio										
Apoptosis	(+++)/3/3	3.00	(++)/3/3	2.00	(+)/1/3 (++)/2/3	1.66	(++)/1/3 (+++)/2/3	2.66	(++)/3/3	2.00
Depleción de zona cortical	(+)/1/3	0.33	(-)	0.00	(+)/2/3	0.66	(+)/2/3	0.66	(-)	0.00
Depleción de zona medular	(+)/3/3	1.00	(+)/1/3 (++)/1/3	1.00	(+)/1/3 (++)/1/3 (+++)/1/3	2.00	(+)/1/3 (++)/1/3 (+++)/1/3	2.00	(+)/1/3 (++)/1/3	1.00
Glándula de Harder										
Desarrollo de tejido linfoides	(+)/2/3	0.66	(+)/3/3	1.00	(+)/3/3	1.00	(+)/2/3 (++)/1/3	1.33	(+)/2/3	0.66
Tonsila cecal										
Nódulos linfoides	(+)/1/3	0.33	(+)/1/2	0.50	(-)	0.00	(-)	0.00	(+)/2/2	1.00
Duodeno										
Enteritis linfocitaria	(+)/2/3 (++)/1/3	1.33	(+)/1/3 (++)/1/3	1.00	(+)/2/3 (++)/1/3	1.33	(+)/1/3 (++)/2/3	1.66	(+)/3/3	1.00
Hiperplasia de placas de Peyer	(-)	0.00	(-)	0.00	(-)	0.00	(-)	0.00	(-)	0.00
Intestino medio a nivel del divertículo de Mekel										
Enteritis linfocitaria	(+)/1/2 (++)/1/2	1.50	(+)/2/3	0.66	(+)/2/3	0.66	(+)/3/3	1.00	(+)/2/2	1.00
Hiperplasia de placas de Peyer	(-)	0.00	(-)	0.00	(-)	0.00	(-)	0.00	(-)	0.00

HPI=Horas postinoculación, MHL=Media histológica de lesión, CN= Aves sin inoculación, (-)= Sin lesión, (+)=Leve, (++)=Moderado, (+++)=Severa, NE=No evaluado

HISTOPATOLOGIA EN POLLOS INOCULADOS

CORNETES NASALES

El 41% de los pollos Leghorn inoculados presentó rinitis linfocitaria moderada y el 59% la presentó de forma severa a partir de las 12 HPI. En las aves sin inocular se presentó esta lesión en el 33% de las aves con un grado de severidad moderado. (Figura 3A) (Cuadro 4).

SENO INFRAORBITARIO

En los pollos Leghorn a partir de las 24 HPI se presentó sinusitis linfocitaria leve en el 16% de las aves, moderada en el 25% y severa en el 8%. Las aves sin inocular no manifestaron estas lesiones (Figura 3B) (Cuadro 4).

DERMIS QUE CUBRE EL SEÑO INFRAORBITARIO

A partir de las 24 HPI se presentó infiltración linfocitaria moderada en el 27% de los pollos Leghorn y severa en el 27%. Los testigos negativos no presentaron esta lesión (Figura 3C) (Cuadro 4).

LARINGE-TRÁQUEA

En los pollos Leghorn inoculados, a partir de las 12 HPI, se presentó laringotraqueítis linfocitaria moderada en el 27% de las aves y severa en el 54%. En los testigos negativos se encontró laringotraqueítis linfocitaria leve en el 66% de los animales (Figura 3D) (Cuadro 4).

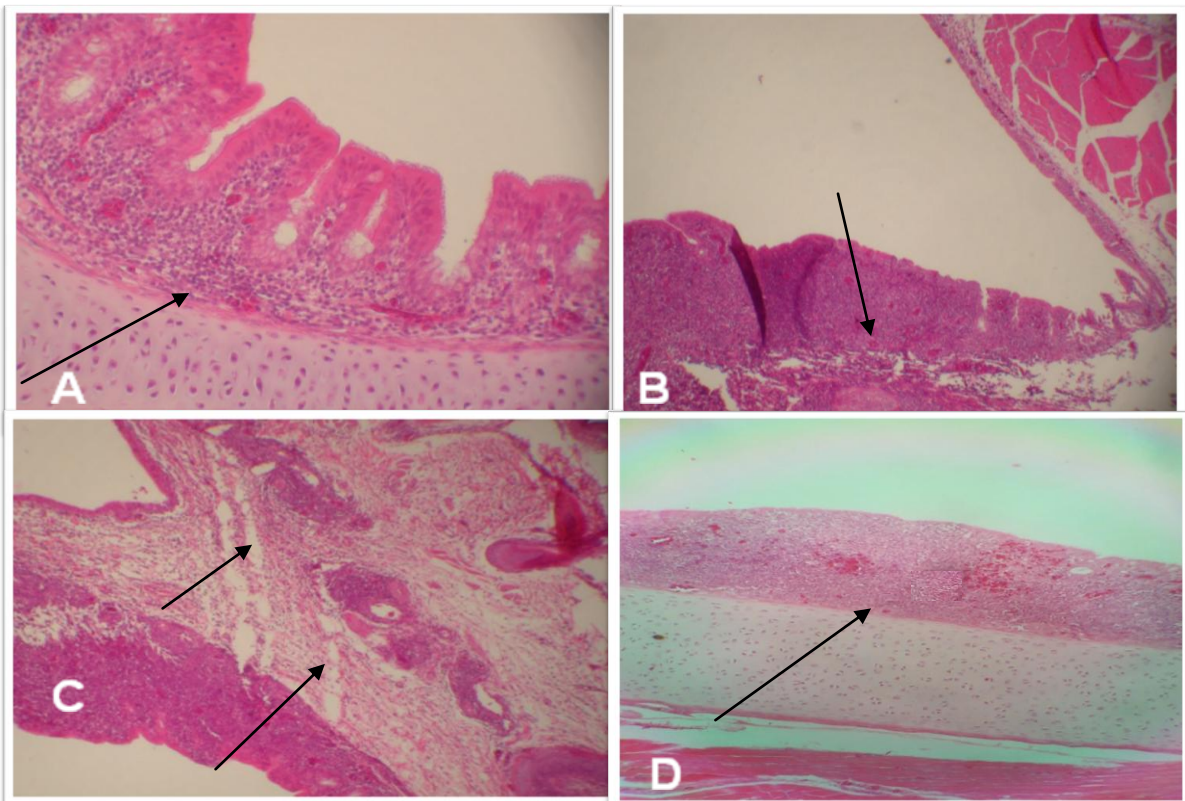


Figura 3, lesiones histológicas, HyE: Pollo Leghorn de 26 días, inoculado con el VIA H5N2 de BP. (A) Rinitis linfocitaria severa, 24 HPI, 10X. (B) Sinusitis linfocítica severa, 24 HPI, 3.2X. (C) Infiltración linfocitaria perivascular severa, 24 HPI, 3.2X. (D) Laringotraqueítis linfocitaria severa, 48 HPI, 10X.

PULMÓN

Desde las 12 HPI, el 16% de los pollos Leghorn inoculados presentó focos neumónicos linfoides leves y el 25% moderados. El 33% de las aves sin inocular presento esta lesión con grado moderado. La única diferencia entre pollos Leghorn

inoculados y no inoculados se observó a las 48 HPI con un grado moderado en el 66% de las aves inoculadas. (Figura 4A) (Cuadro 4).

PÁRPADO

El 25% de los pollos Leghorn inoculados presentó blefaritis linfocitaria leve y el 41% moderada a partir de las 24 HPI. Los testigos negativos no presentaron esta lesión (Figura 4B) (Cuadro 4).

TIMO

El 25% de los pollos Leghorn inoculados presentó atrofia de la corteza de timo leve y el 33% moderada, a partir de las 12 HPI. Esta lesión se observó en el 33% de los controles negativos con un grado leve de severidad. (Figura 7C). A partir de las 12 HPI, el 16% de los pollos Leghorn inoculados presentó apoptosis leve, el 25% moderada y el 58% severa. En las aves sin inocular esta lesión tuvo un grado moderado de severidad en el 100% de los animales (Figura 4C) (Cuadro 4).

BOLSA DE FABRICIO

A partir de las 12 HPI, el 33% de los pollos Leghorn inoculados presentó apoptosis moderada y el 66% severa. Esta lesión se observó en el 100% de las aves sin inocular con un grado moderado de severidad (Figura 7D). A partir de las 12 HPI, el 16% de los pollos Leghorn inoculados presentó depleción de la zona cortical en la bolsa de Fabricio leve y el 16% moderada. Esta lesión estuvo ausente en los controles negativos. A partir de las 12 HPI, el 16% de los pollos Leghorn inoculados presentó depleción leve en la zona medular de los folículos en la bolsa de Fabricio, el 75% moderada y el 8% severa. Esta lesión estuvo presente en el 100% de las aves sin inocular con un grado de severidad moderado. La única diferencia en la manifestación de esta lesión se observa a las 24 HPI, donde un ave manifestó un grado severo (Figura 4D)(Cuadro 4).

GLÁNDULA DE HARDER

Los pollos Leghorn presentaron desarrollo de tejido linfoide leve con una frecuencia del 45%, y moderada con una frecuencia del 55%. El 100% de las aves sin inocular presentó esta lesión con un grado leve de severidad. (Figura 4E) (Cuadro 4).

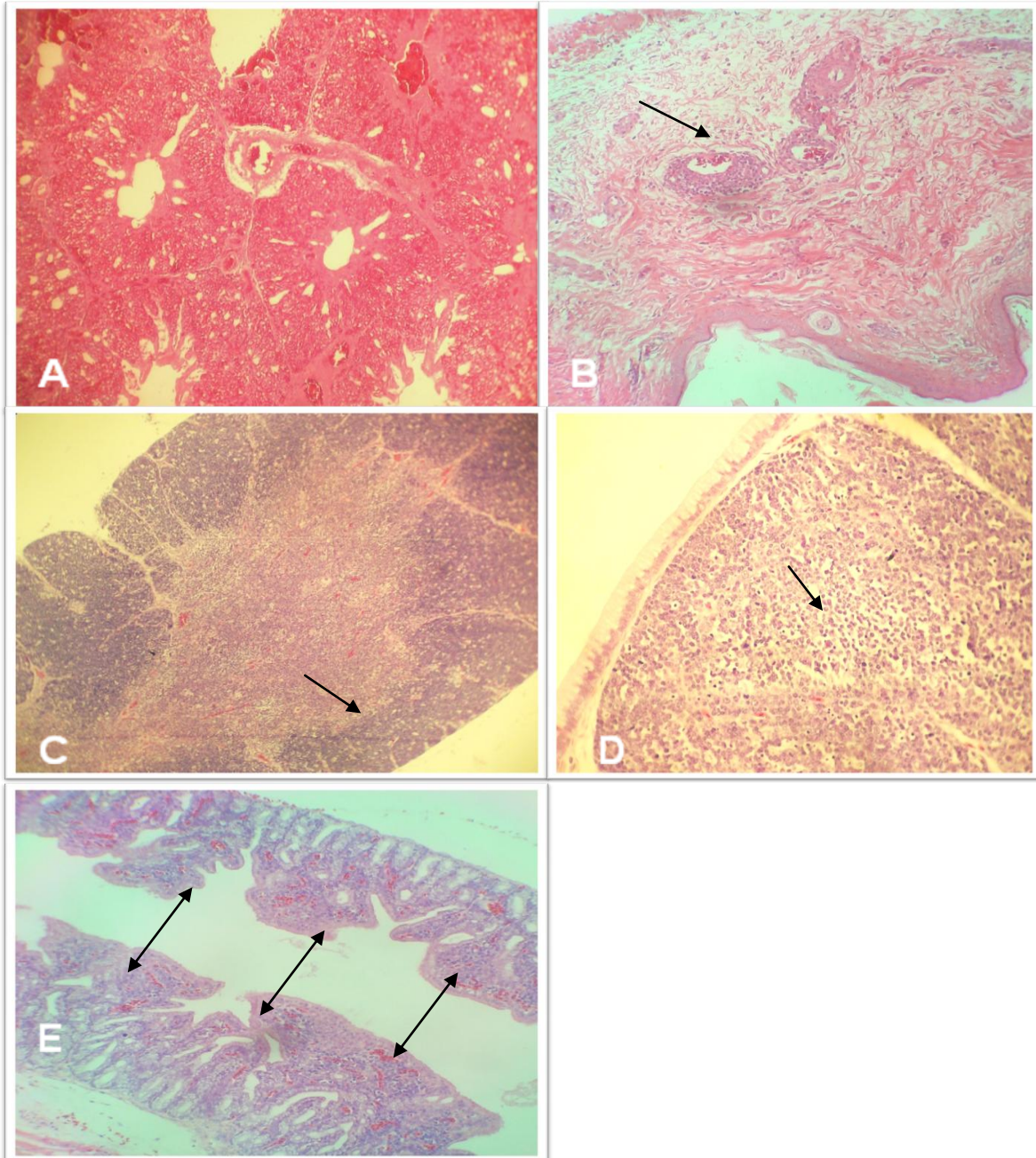


Figura 4, lesiones histológicas HyE: Pollos Leghorn de 26 días, inoculado con el VIA H5N2 de BP.(A) Focos neumónicos linfoides moderados que abarcan el 100% de la imagen, 48 HPI, 10X. (B) Blefaritis linfocitaria moderada, 48 HPI, 10X. (C) Timo con atrofia cortical moderada por apoptosis severa, 72 HPI, 10X, (D) Bolsa de Fabricio con depleción medular moderada y apoptosis severa, 72 HPI, 40X. (E) Glándula de Harder con desarrollo de tejido linfoide moderado, 48 HPI, 10X

CUADRO 4: Evolución de lesiones histopatológicas en pollos Leghorn inoculados con el VIA H5N2 de BP (Testigos positivos).

	12 HPI	MHL 12HPI	24 HPI	MHL 24HPI	48 HPI	MHL 48HPI	72 HPI	MHL 72HPI	CN	MHL CN
Cornetes nasales										
Rinitis linfocitaria	(+++) ¹ / ₃ (++) ¹ / ₃	1.66	(++) ² / ₃ (+++) ¹ / ₃	2.33	(++) ¹ / ₃ (+++) ² / ₃	2.66	(++) ¹ / ₃ (+++) ² / ₃	2.66	(++) ¹ / ₃	0.66
Seno infraorbitario										
Sinusitis linfocitaria	(-)	0.00	(+) ¹ / ₃ (++) ¹ / ₃ (+++) ¹ / ₃	2.00	(+) ¹ / ₃	0.33	(++) ² / ₃	1.33	(-)	0.00
Sinusitis linfocitaria asociada a infiltración heterofílica	(-)	0.00	(+) ¹ / ₃ , (++) ¹ / ₃	1.00	(-)	0.00	(++) ¹ / ₃	0.66	(-)	0.00
Dermis que recubre el seno infraorbitario										
Infiltración linfocitaria perivascular	(-)	0.00	(++) ¹ / ₃ (+++) ² / ₃	2.66	(++) ¹ / ₂	1.00	(++) ¹ / ₃ (+++) ¹ / ₃	1.66	(-)	0.00
Dermatitis linfocitaria asociada a infiltración heterofílica	(-)	0.00	(+++) ¹ / ₃	1.00	(-)	0.00	(-)	0.00	(-)	0.00
Laringe/Tráquea										
Laringotraqueítis linfocitaria	(+++) ¹ / ₃	1.00	(+++) ³ / ₃	3.00	(++) ¹ / ₃ (+++) ² / ₃	2.66	(++) ² / ₂	2.00	(+) ² / ₃	0.66
Traqueítis linfocitaria asociada a infiltración heterofílica	(+) ¹ / ₃	0.33	(+) ¹ / ₃ (++) ¹ / ₃	1.00	(+++) ¹ / ₃	1.00	(-)	0.00	(-)	0.00
Pulmón										
Bronquitis linfocitaria	(++) ² / ₃	1.33	(-)	0.00	(++) ¹ / ₃ , (+++) ¹ / ₃	1.66	(+) ² / ₃ , (++) ¹ / ₃	1.33	(+++) ² / ₃	2.00
Bronquitis linfocitaria asociada a infiltración heterofílica	(-)	0.00	(-)	0.00	(+) ¹ / ₃	0.33	(-)	0.00	(-)	0.00
Focos neumónicos linfoides	(++) ¹ / ₃	0.66	(+) ¹ / ₃	0.33	(++) ² / ₃	1.33	(+) ¹ / ₃	0.33	(++) ¹ / ₃	0.66
Párpado										
Blefaritis linfocitaria	(-)	0.00	(+) ¹ / ₃ (++) ¹ / ₃	1.00	(+) ¹ / ₃ , (++) ² / ₃	1.66	(+) ¹ / ₃ , (++) ² / ₃	1.66	(-)	0.00
Blefaritis linfocitaria asociada a infiltración heterofílica	(-)	0.00	(-)	0.00	(+) ¹ / ₃	0.33	(-)	0.00	(-)	0.00
Timo										
Atrofia de zona cortical	(+) ² / ₃	0.66	(-)	0.00	(+) ¹ / ₃ (++) ¹ / ₃	1.00	(++) ³ / ₃	2.00	(+) ¹ / ₃	0.33
Apoptosis	(++) ² / ₃ (+++) ¹ / ₃	2.33	(+) ² / ₃ (+++) ¹ / ₃	1.66	(++) ¹ / ₃ (+++) ² / ₃	2.66	(+++) ³ / ₃	3.00	(++) ³ / ₃	2.00
Bazo										
Atrofia linfoide folicular	(+) ² / ₃ (++) ¹ / ₃	1.33	(+) ¹ / ₃ (++) ² / ₃	1.66	(++) ³ / ₃	2.00	(++) ¹ / ₃	0.66	(++) ¹ / ₃	0.66

	12 HPI	MHL 12HPI	24 HPI	MHL 24HPI	48 HPI	MHL 48HPI	72 HPI	MHL 72HPI	CN	MHL CN
Bolsa de Fabricio										
Apoptosis	(+++) ^{3/3}	3.00	(++) ^{3/3}	2.00	(+++) ^{3/3}	3.00	(++) ^{1/3} (+++) ^{2/3}	2.66	(++) ^{3/3}	2.00
Depleción de zona cortical	(++) ^{1/3}	0.66	(-)	0.00	(+) ^{2/3} (++) ^{1/3}	1.33	(-)	0.00	(-)	0.00
Depleción de zona medular	(+) ^{2/3} (++) ^{1/3}	1.33	(++) ^{2/3} (+++) ^{1/3}	2.33	(++) ^{3/3}	2.00	(++) ^{3/3}	2.00	(++) ^{3/3}	2.00
Glándula de Harder										
Desarrollo de tejido linfoide	(+) ^{2/3} (++) ^{1/3}	1.33	(++) ^{2/2}	2.00	(++) ^{2/3} (+) ^{1/3}	1.66	(++) ^{1/3} (+) ^{2/3}	1.33	(+) ^{2/2}	1.00
Tonsila cecal										
Nódulos linfoides	(+++) ^{3/3}	3.00	(+++) ^{2/2}	3.00	(+++) ^{2/3}	3.00	(+++) ^{3/2}	3.00	(+++) ^{3/3}	3.00
Duodeno										
Enteritis linfocitaria	(-)	0.00	(+) ^{1/3} (++) ^{1/3}	1.00	(+) ^{1/3} (++) ^{2/3}	1.66	(++) ^{1/3} (+++) ^{1/3}	1.66	(++) ^{3/3}	2.00
Hiperplasia de placas de Peyer	(++) ^{2/3}	1.33	(+) ^{1/3} , (+++) ^{1/3}	1.33	(+++) ^{2/3}	2.00	(-)	0.00	(+) ^{1/3} (+++) ^{1/3}	1.33
Intestino medio a nivel del divertículo de Mekel										
Enteritis linfocitaria	(-)	0.00	(+) ^{1/3}	0.33	(-)	0.00	(+) ^{1/3}	0.33	(+) ^{1/3}	0.33
Hiperplasia de placas de Peyer	(+++) ^{1/3}	1.00	(-)	0.00	(-)	0.00	(-)	0.00	(-)	0.00

HPI=Horas postinoculación, MHL=Media histológica de la lesión, CN= aves sin inoculación, (-)= Sin lesión, (+)=Leve, (++)=Moderado, (+++)=Severa, NE=No evaluado

VALIDACIÓN DEL ANTISUERO POR PRECIPITACIÓN EN GEL DE AGAR

La presencia de anticuerpos presentes en el suero de pollos y conejos inmunizados dirigidos hacia el VIA H5N2BP se determinó por un precipitado intenso y la ausencia de este en sueros de pollos y conejos sin inmunizar (Figura 5).

INMUNOHISTOQUÍMICA

Se produjo el antisuero en pollo y conejo y se evaluó por precipitación en gel de agar (Figura 5). Sin embargo, en todos los protocolos utilizados se observó una inmunoreacción inespecífica lo que hizo imposible distinguir la presencia del virus en el tejido.

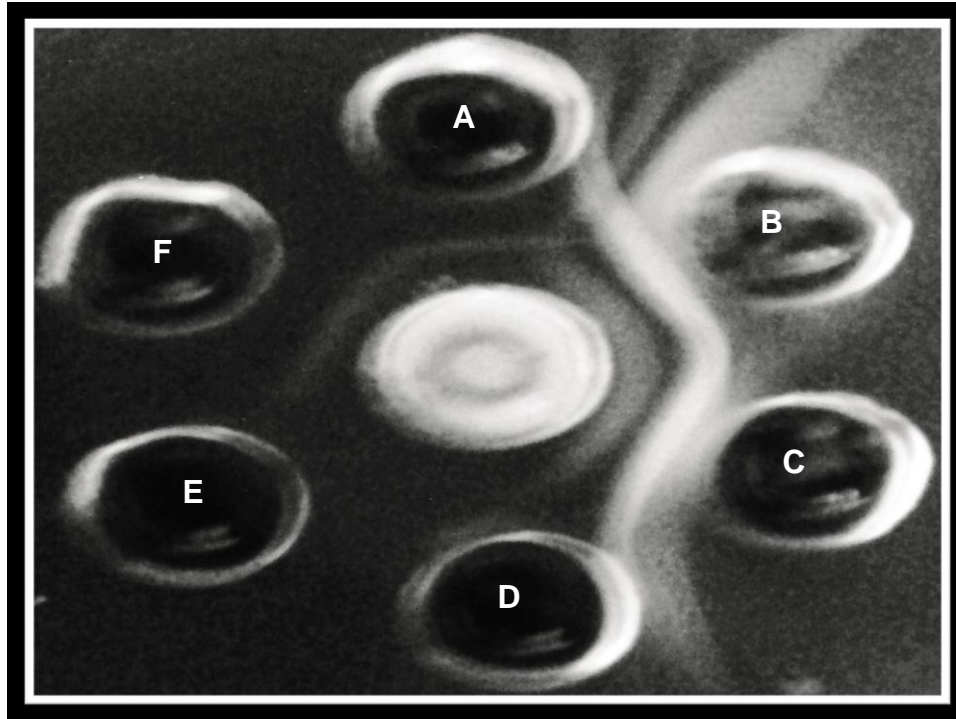


Figura 5, PGA: Pozo A: suero hiperinmune de pollo (muestra uno); Pozo B: suero hiperinmune de conejo (muestra uno); Pozo C: suero hiperinmune de conejo (muestra dos); Pozo D: suero normal de conejo; Pozo E: suero normal de pollo; Pozo F: suero hiperinmune de pollo (muestra 2).

8. DISCUSIÓN

SIGNOS CLÍNCOS

Está ampliamente documentado que los signos causados por VIA H5N2BP en pollos, son principalmente del aparato respiratorio y que confirman lo observado en esta tesis. En el caso de los patos, los VIA de BP como el H5N2 no causan lesiones como lo observó Pillai *et al* (2008) en un estudio experimental y que concuerdan con los resultados de esta tesis. Con base a los resultados clínicos, es claro que la cepa del VIA H5N2 de BP utilizada en nuestro estudio es patógena para los pollos y no para los patos. Sin embargo, las lesiones histológicas y el aislamiento del virus en ambas especies sugieren que los patos si podrían cursar con una enfermedad subclínica ya que, con excepción de pulmón, las lesiones respiratorias en los patos inoculados fueron más severas que los no inoculados.

AISLAMIENTO VIRAL

Pato Pekín

La patogenia del VIA H5N2 de BP en patos se está describiendo actualmente debido a que los patos son considerados resistentes a la enfermedad. Recientemente, en estudios de excreción viral se demostró la presencia de virus únicamente en orofaringe y hasta por 2 días PI (Mundt 2009). Mientras que Pillai

et al 2008, detectó la presencia de RNA viral de un virus H5N2 de BP aislado de loro con linaje genético mexicano en orofaringe entre los 2 y 14 días PI y en menor cantidad en cloaca entre los 4 y 7 días PI. En el mismo estudio de Pillai *et al* 2008, utilizando inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal anti-VIA, demuestra la presencia discreta del VIA H5N2 de BP en células del epitelio traqueal, macrófagos infiltrados en submucosa traqueal, infiltrados de macrófagos en pulmón y células epiteliales de bronquios a los 3 días PI. En nuestro estudio el virus fue aislado únicamente a las 12 HPI a partir de pulmón que coincide con las observaciones de Pillai *et al* 2008; la diferencia en el tiempo de aislamiento entre las 12 HPI de nuestro estudio y los 3 días del estudio de Pillai *et al* (2008), podría explicarse a la naturaleza genética entre las cepas, la diferencia de un logaritmo en el inóculo y la vía de inoculación. El aislamiento del virus a partir de pulmones, bazo, y duodeno de patos no inoculados probablemente se debió a una contaminación en el manejo de las muestras y no a una infección accidental debido a que el virus no se aisló de cornetes y/o tráquea como en los patos inoculados, y a que las aves fueron negativas al aislamiento viral y serología previo y posterior al estudio, mantenidas en cuartos separados y procesadas antes de trabajar con las muestras de aves inoculadas.

Pollos inoculados

La presencia de virus H5N2 BP en tráquea y pulmón de pollos cuando el virus es inoculado por vía sistémica (intracraneal) o por vía natural (intranasal o intracoanal) ha sido descrito por Mo *et al* 1997 y Pillai *et al* 2008, lo cual también ha sido observado en este estudio. Sin embargo, hay diferencias respecto al tiempo de detección posterior a la inoculación; por ejemplo, la presencia de viriones en pulmón se ha observado hasta los 3 días PI y en nuestro estudio el virus se detectó entre las 12 y 48 HPI, lo anterior pudo deberse a que inoculamos el virus en la tráquea y los otros autores en narinas o coana. En otros estudios donde utilizaron cepas H5N2 BP de origen mexicano y japonés (Mundt 2009, Swayne 1997) se demostró la presencia del virus en otros órganos o tejidos diferentes al aparato respiratorio como fueron riñón, bolsa de Fabricio, páncreas y recto. En nuestro estudio se aisló el virus a partir de timo y bolsa de Fabricio, pero desconocemos si estuvo presente en páncreas, recto y riñón ya que no se incluyeron en nuestro estudio. Lo anterior evidencia que las cepas de un mismo subtipo como el H5N2 de BP pueden tener cambios en su patogenia y sostiene la hipótesis de que algunas cepas de H5N2 de BP tendrían viremia. Finalmente en nuestro estudio reportamos la presencia de virus en párpado y glándula de Harder que son tejidos adyacentes al sitio de inoculación y que no han sido descritos en pollos inoculados con virus H5N2 de BP.

HISTOPATOLOGÍA

Durante la evaluación histopatológica fue claro que tanto los pollos como los patos tuvieron una infección subclínica durante el desarrollo del experimento a pesar de los resultados negativos previo a la inoculación y valoración clínica. Lo anterior con base a la histopatología de las aves sin inocular. Estas lesiones se encontraron en cornetes nasales, párpado, glándula de Harder, laringe-tráquea,

pulmón, timo, y bolsa de Fabricio que indican un cuadro respiratorio e inmunológico de etiología no determinada en este estudio.

Patos Pekín

En este estudio se aprecia un grado mayor de severidad en las lesiones observadas en cornetes nasales, seno infraorbitario, tráquea y pulmón, al comparar entre patos inoculados y patos no inoculados, lo que sugiere que el VIA H5N2 de BP es capaz de producir lesiones en el sistema respiratorio de los patos e incluso difundirse a partir de cavidad nasal hacia tejidos del seno infraorbitario y producir lesión. Las lesiones observadas en los testigos negativos podrían explicarse por efecto de otro agente patógeno no determinado en este estudio. Lo que sugiere que ambos grupos de aves cursaron con una enfermedad subclínica respiratoria diferente a los agentes descartados previos a la inoculación viral, lo que implicaría que este agente no determinado coadyuvó a la manifestación de lesiones en las aves. En cuanto a las lesiones en órganos linfoides, se aprecia un aumento en la severidad de la atrofia cortical en timo por apoptosis y la depleción linfoide en bolsa de Fabricio por apoptosis, entre patos inoculados y no inoculados, lo cual sugiere que el VIA H5N2 de BP participa en la inmunodepresión, sin embargo, la presencia de las mismas lesiones en los patos no inoculados crea la necesidad de validar esta hipótesis en estudios posteriores, lo anterior implicaría que ambos grupos de patos estuvieron expuestos a un agente patógeno inmunosupresor diferente al VIA H5N2. Con respecto a las lesiones observadas en párpado y glándula de Harder, no se aprecia un incremento en la frecuencia o severidad de lesiones entre patos inoculados y no inoculados, por lo tanto no pueden ser relacionadas con la inoculación del VIA H5N2 de BP lo que sugiere que éste no tiene la capacidad de producir lesiones en estos órganos en el pato Pekín.

Algunos autores como Mundt *et al.* (2009) y Pillai *et al.* (2008) han descrito lesiones en aparato respiratorio y sistema linfoide como traqueítis catarral linfocítica moderada; traqueítis linfoplasmocítica de moderada a severa con hiperplasia difusa, desciliación focal del epitelio e infiltración heterofílica en algunas ocasiones; infiltrados linfocitarios moderados en pulmón; neumonía intersticial linfohistiocítica moderada; bronquitis de leve a moderada con desciliación, hiperplasia y degeneración del epitelio; atrofia de la corteza de timo moderada; atrofia moderada de folículos linfoides en bolsa de Fabricio e incremento de nódulos linfoides en tonsilas cecales. Las lesiones encontradas en órganos respiratorios fueron relacionadas con la presencia del VIA en células del epitelio traqueal, macrófagos infiltrados en submucosa traqueal, infiltrados de macrófagos en pulmón y células epiteliales de bronquios, en patos mediante inmunohistoquímica. Las lesiones descritas en esta tesis son consistentes con lo descrito por Mundt *et al* (2009) y Pillai *et al* (2008).

La presencia de lesiones en los patos Pekín control de esta tesis, sugieren que las aves cursaron con una enfermedad subclínica provocada por un agente diferente al VIA, sin embargo con excepción de las encontradas en pulmón, estas fueron generalmente menos severas. Sin embargo, con base a los artículos anteriores y los resultados de esta tesis, se sugiere que el VIA H5N2 de BP puede replicarse y producir daño en órganos respiratorios de patos Pekín, y que estos manifiestan

depresión linfoide posterior a la inoculación de estos virus. Lo que indica que a pesar de que los patos Pekín no son susceptibles a la manifestación clínica de la enfermedad posterior a la inoculación del virus, estos pueden replicarlo en órganos respiratorios, lo que los hace un potencial reservorio. Lo cual ya había sido señalado por otros autores (Mundt *et al.* 2009 y Pillai *et al.* 2008).

Pollos inoculados

En los pollos Leghorn inoculados se aprecia un aumento en la severidad y frecuencia de lesiones en cornetes nasales, seno infraorbitario, dermis que recubre el seno infraorbitario, tráquea y párpado, con relación a los pollos Leghorn no inoculados, lo que sugiere que el VIA H5N2 de BP tiene la capacidad de causar lesiones en el sistema respiratorio, párpado y difundirse de cavidad nasal hacia tejidos adyacentes como el seno infraorbitario y la piel que lo recubre. Sin embargo no se observó diferencia significativa en el grado de lesión en pulmón entre pollos inoculados y no inoculados. Las lesiones observadas en los pollos Leghorn no inoculados podrían explicarse por la presencia de otro agente patógeno no determinado en este estudio, lo que sugiere que ambos grupos de aves cursaron con una enfermedad subclínica. Además se aprecia un aumento en la severidad de lesiones observadas en timo y Bolsa de Fabricio, entre testigos positivos y negativos, esto sugiere que ambos grupos de aves estuvieron expuestas a un agente patógeno inmunosupresor diferente al VIA H5N2, sin embargo, el daño a tejido linfoide fue mayor en las aves inoculadas, lo que sugiere que la infección por este virus puede generar lesión en órganos linfoides bajo estas circunstancias. En glándula de Harder se puede apreciar un aumento en el desarrollo de tejido linfoide en las aves inoculadas, lo que sugiere que el VIA H5N2 de BP tiene la capacidad de inducir una respuesta del sistema linfoide en este órgano.

Las lesiones en pollos Leghorn causadas por el VIA H5N2 de BP han sido descritas principalmente en órganos respiratorios, linfoides y en órganos internos como páncreas y riñón. Ente ellas se ha descrito la pérdida de cilios y degeneración del epitelio traqueal, traqueítis linfocitaria, degeneración vacuolar y necrosis de las células del epitelio en laringe e hiperplasia difusa con áreas de metaplasia escamosa (Masatoshi *et al* 2007, Mo *et al* 1997, Pillai *et al* 2008); sin embargo, en algunos casos estas lesiones han sido relacionadas con el virus a través de inmunohistoquímica (Masatoshi *et al* 2007, Mo *et al* 1997), lo cual sugiere una inconsistencia entre la presencia de viriones y lesiones o falta de sensibilidad de la prueba. Estas lesiones son consistentes con las encontradas en esta tesis, sin embargo en esta tesis no se observaron zonas con metaplasia, hiperplasia o necrosis del epitelio traqueal, probablemente debido a que los tiempos de toma de muestras fueron de 3 días comparados con otros estudios de hasta 10 días. También se ha reportado la presencia de neumonía intersticial linfocítica y neumonía intersticial linfocitaria, estas lesiones fueron relacionadas con la presencia de viriones en infiltrados de macrófagos de pulmón y células epiteliales de bronquios en la mayoría de los casos mediante inmunohistoquímica (Mo *et al* 1997, Pillai *et al* 2008, Swayne *et al* 1997), sin embargo en este caso también existen inconsistencias en la relación de lesión y presencia viral, donde se ha observado la presencia de viriones sin que se

mencionen lesiones (Masatoshi *et al* 2007), y lesiones sin presencia de viriones (Swayne *et al* 1997), sin embargo las lesiones descritas son consistentes con las observadas en esta tesis. Las lesiones descritas por otros investigadores en órganos linfoides como es la depleción y necrosis linfoide en timo, bolsa de Fabricio y órganos linfoides secundarios; atrofia moderada de folículos linfoides en bolsa de Fabricio y el incremento de nódulos linfoides en tonsilas cecales, han sido relacionadas con la presencia de viriones mediante inmunohistoquímica en epitelio y macrófagos medulares de bolsa de Fabricio (Mo *et al* 1997, Pillai *et al* 2008, Swayne *et al* 1997). Estos hallazgos son consistentes con los resultados observados en esta tesis, sin embargo en esta tesis la interpretación de daño celular en linfocitos se atribuyó a apoptosis y no a necrosis, además de que no se observaron lesiones evidentes en órganos linfoides secundarios.

Otros autores han reportado lesiones en órganos internos cuando inoculan con cepas de origen mexicano o japonés del VIA H5N2 de BP. Las lesiones descritas consisten en degeneración de los acinis pancreáticos, tubulonecrosis y nefritis intersticial leucocitaria, estas lesiones han sido relacionadas con la presencia de viriones en la mayoría de los tejidos (Masatoshi *et al* 2007, Swayne *et al* 1997). Lo anterior concuerda con los aislamientos virales a partir de órganos internos observada en esta tesis y sostiene la hipótesis de que los VIA H5N2 de BP causan viremia. Por otro lado, las lesiones en glándula de Harder, cornetes nasales, seno infraorbitario y párpado descritas en esta tesis no han sido descritas para el VIA H5N2 de BP.

La presencia de lesiones encontradas en las aves control, sugieren que los pollos Leghorn cursaron con una manifestación subclínica de enfermedad a consecuencia de la implicación de otro agente patógeno diferente al VIA, sin embargo la severidad y frecuencia de estas lesiones fue menor a las encontradas en los pollos inoculados. Con base a los resultados de esta tesis y de otros investigadores, podemos concluir que el VIA H5N2 de BP, causa lesiones principalmente en órganos respiratorios (cornetes, laringe, bronquios y pulmón) y órganos linfoides (bolsa de Fabricio y timo), y con menor frecuencia en órganos internos como riñón y páncreas.

PATOS PEKÍN Y POLLOS LEGHORN

Al comparar las lesiones entre ambas especies mediante la media histológica de lesión, se aprecia que los patos Pekín se encuentran en un rango menor de severidad (párpado, glándula de Harder, cornetes, seno infraorbitario y laringe-tráquea). Respecto al pulmón, se observa que los patos presentaron una mayor severidad que los pollos posiblemente por una infección subclínica diferente al VIA. En los órganos linfoides como el timo y bolsa de Fabricio las lesiones en ambas especies fueron moderadas, pero con mayor frecuencia en los pollos.

Con base a los resultados de esta tesis la hipótesis alterna es aceptada debido a que el VIA H5N2 de BP causa lesiones menos severas en el pato Pekin que en el pollo Leghorn.

INMUNOHISTOQUÍMICA

La presencia de inmunorreacción en zonas de lesión en tejidos de cresta infectada por el VIA empleando suero normal de pollo, indica que éste podría tener reacciones cruzadas con las proteínas del tejido liberadas durante el proceso de inflamación. También la naturaleza policlonal del antisuero junto con la falta de purificación para producirlo, son elementos que explican la inmunoreactividad inespecífica en el tejido de aves infectadas. La presencia de inmunorreacción en tejidos de pollo no inoculados con el VIA podría explicarse por una posible contaminación de la vacuna empleada con antígenos de tejidos de pollo, ya que estas vacunas generalmente son elaboradas en embrión de pollo. Lo anterior supone el empleo de un anticuerpo monoclonal como se ha hecho en otras publicaciones o purificación del antígeno para producir el antisuero (17,21,30).

9. CONCLUSIONES

1. El pato Pekín no es susceptible a la manifestación clínica de enfermedad posterior a la infección por el VIA H5N2 de BP de origen mexicano.
2. Es menos susceptible que los pollos a la manifestación de lesiones. Las lesiones histopatológicas en órganos respiratorios, incluyen rinitis linfocitaria, sinusitis linfocitaria y laringotraqueítis linfocitaria, además de depleción linfoide por apoptosis en bolsa de Fabricio y atrofia cortical en timo de patos y pollos, siendo más severas en pollos. Los pollos presentan además blefaritis linfocitaria, desarrollo de tejido linfoide en glándula de Harder e infiltración perivascular linfocitaria en la piel que recubre el seno infraorbitario.
3. Este virus puede ser aislado a partir de órganos o tejidos respiratorios en patos clínicamente sanos. El estudio concluye que el pato Pekín puede ser considerado un potencial reservorio para el VIA H5N2 de BP que aún persiste en la avicultura mexicana

ANEXOS

ANEXO 1: Técnica de necropsia

El primer paso consistió en sumergir al ave en agua con detergente en polvo y cloro al 8%, después de escurrir al ave por aproximadamente 10 segundos y colocarla en la mesa de necropsias, se hizo una incisión en la piel del pliegue inguinal para posteriormente dislocar la cabeza del fémur, posterior a esto, se hizo un corte transversal en la piel entre las 2 incisiones para poder retirar mediante tracción la piel que cubre la pechuga y finalmente continuar la incisión con tijeras hasta la comisura del pico. Para llegar al celoma se hizo un corte transversal de los músculos abdominales que se continuó hasta la articulación izquierda del hombro a través de las uniones costocondrales, una vez desarticulada la unión humero-escapulo-coraoidal, se flexionó el esternón hacia el lado derecho del ave. Una vez expuesto el celoma, se hizo un corte transversal en el epiplón, se sujetó la molleja para hacer un corte que separó el proventrículo del esófago y posteriormente se cortó el ligamento que une la molleja con el hígado, finalmente se retiraron los intestinos ejerciendo tracción mediante la manipulación de la molleja y se tomaron las muestras de duodeno, intestino a nivel del divertículo de Meckel y por último tonsila cecal. Posteriormente se tomaron las muestras de bazo, bolsa de Fabricio y finalmente timo. Después de esto, se hizo un corte a través de la comisura del pico para poder retirar laringe, tráquea y pulmones; y así tomar las muestras de estos órganos en el mismo orden. Por último se desarticuló la cabeza y se hizo un corte longitudinal a través de la línea media, para posteriormente tomar las muestras de glándula de Harder, párpado y por último cornetes nasales.

ANEXO 2: Tratamiento de laminillas con Poly-L-Lysina

1. Inmersión en acetona 4°C por 15 min
2. Inmersión en una solución de Poly-L-Lysina al 10% diluida en acetona, a 4°C por 15 min
3. Dejar secar en estufa a 60°C por 30 min

ANEXO 3: Escala de lesiones microscópicas

1. Rinitis y laringotraqueítis linfocitaria: (+)=Dos o más focos con escasos linfocitos subepiteliales con presencia de hiperemia y/o hemorragias, (++)=Tres a cinco focos con moderados número de linfocitos subepiteliales, y disminución de glándulas mucosas o uno a dos focos con abundante número de linfocitos donde la lesión abarque un campo visual o más con un aumento de 10X, y presencia de hiperemia y/o hemorragias, (+++)=Seis a más focos con moderados linfocitos subepiteliales, disminución severa de glándulas mucosas, o más de dos focos con abundante cantidad de linfocitos donde la lesión abarque un campo visual o más con un aumento de 10X, y presencia de hiperemia y/o hemorragias.
2. Sinusitis, bronquitis, blefaritis, enteritis y neumonía linfocitaria: (+)=Dos o más focos con escasos linfocitos subepiteliales y presencia de hiperemia y/o hemorragias, (++)=Tres a cinco focos con moderados linfocitos subepiteliales, o uno a dos focos con abundante número de linfocitos donde la lesión abarque

- aproximadamente un campo visual o más con un aumento de 10X, y presencia de hiperemia y/o hemorragias, (+++)=Seis o más focos con moderados linfocitos subepiteliales o más de dos focos con abundante cantidad de linfocitos donde la lesión abarque aproximadamente un campo visual o más con un aumento de 10X, y presencia de hiperemia y/o hemorragias.
3. Infiltración heterofílica: (+)=Escasa cantidad de heterófilos subepiteliales infiltrados, (++)=Mayor cantidad de heterófilos subepiteliales infiltrados, (+++)=Abundante cantidad de heterófilos subepiteliales infiltrados.
 4. Atrofia cortical de timo: (+)=Relación corteza medula aproximadamente menor a 1/3 en el 20% del corte, (++)=Relación corteza médula aproximadamente menor a 1/3 en el 30-40% del corte, (+++)=Relación corteza médula aproximadamente menor a 1/3 en el 50% o más del corte.
 5. Apoptosis: (+)=Escasos espacios redondos con presencia de detritus celulares y núcleos picnóticos, (++)=Moderados espacios redondos con presencia de detritus celulares y núcleos picnóticos, (+++)=Abundante número de espacios redondos con presencia de detritus celulares y núcleos picnóticos.
 6. Depleción medular en bolsa de Fabricio: (+)=Escasas áreas dispersas sin linfocitos ocupadas por células reticulares, (++)=Moderadas áreas dispersas sin linfocitos ocupadas por células reticulares, (+++)=Abundantes áreas dispersas sin linfocitos ocupadas por células reticulares.
 7. Atrofia cortical en folículos de bolsa de Fabricio: (+)=Relación corteza médula aproximadamente menor a 1/3 en el 20% de los folículos, (++)=Relación corteza médula aproximadamente menor a 1/3 en el 30-40% de los folículos, (+++)=Relación corteza médula aproximadamente menor a 1/3 en el 50% o más de los folículos.
 8. Desarrollo de tejido linfoide en glándula de Harder: (+)=Escasa cantidad de linfocitos, (++)Moderada cantidad de linfocitos, (+++)=Abundante cantidad de linfocitos.
 9. Presencia de nódulos linfoides: (+)=Uno a dos nódulos linfoides, (++)=Dos a cinco nódulos linfoides, (+++)=Seis a más nódulos linfoides.
 10. Atrofia linfoide folicular en bazo: (+)=Disminución escasa en el número de linfocitos foliculares, (++)=Disminución moderada en el número de linfocitos foliculares, (+++)=Disminución abundante en el número de linfocitos foliculares.
 11. Hiperplasia de placas de Peyer: (+)=Uno o dos placas de Peyer que abarquen aproximadamente un campo visual o más con un aumento de 10X, (++)=Tres o cinco placas de Peyer que abarquen aproximadamente un campo visual o más con un aumento de 10X, (+++)=Seis o más placas de Peyer que abarquen aproximadamente un campo visual o más con un aumento de 10X,

ANEXO4: Desparafinado e hidratación de muestras para histopatología

1. Xilol durante 10 minutos
2. Xilol durante 10 minutos
3. Xilol durante 10 minutos
4. Alcohol absoluto durante 5 minutos
5. Alcohol absoluto durante 5 minutos

6. Alcohol al 96% durante 5 minutos
7. Alcohol al 96% durante 5 minutos
8. Alcohol al 75% durante 5min
9. Alcohol al 75% durante 5 min
10. Agua destilada durante 5 minutos
11. Agua destilada durante 5 minutos.

ANEXO 5: Protocolo de inmunohistoquímica 1

1. Incubar laminillas previamente tratadas con Poly-Lycine, que fueron montadas en cortes en blanco, por 2 horas a 60°C en estufa.
2. 3 lavados en xilol de 10 min c/u.
3. 2 lavados de 5 minutos c/u con alcoholes al 100, 96 y 75%.
4. 2 lavados en agua destilada de 5 min.
5. Recuperación antigénica incubando las laminillas con una solución de pronasa al 0.5%, diluida en Tris 100Mm, con 0.5% de SDS, pH 7.5, por 15min.
6. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min
7. Bloqueo con suero de cabra al 2% diluido en PBS con 1% de ASB a pH 7.5, por 30 minutos.
8. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
9. Incubación con anticuerpo primario de pollo diluido 1/2000 en PBS con 1% de ASB a pH 7.5..
10. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
11. Incubación del anticuerpo secundario biotinilado anti IgG de pollo hecho en cabra por 30 min.
12. 2 lavados con PBS pH 7.5, por 5 min.
13. Incubación del complejo avidina DH-fosfatasa biotinilada H, por 30 min.
14. 2 lavados con PBS pH 7.5, por 5 min.
15. Incubación del cromógeno (Vector red sustrato solution) por 5-6 min, diluido con Tris HCl 100mM pH 8.4.
16. 2 lavados con PBS pH 7.4, por 5 min.
17. Enjuagar en agua corriente.
18. Contraste con hematoxilina de Harris por 5 minutos.
19. Enjuagar con agua destilada.
20. Deshidratación, aclaramiento y montaje de las laminillas.

ANEXO 6: Protocolo de inmunohistoquímica 2

1. Incubar laminillas previamente tratadas con Poly-Lycine, que fueron montadas en cortes en blanco, por 2 horas a 60°C en estufa.
2. 3 lavados en xilol de 10 min c/u.
3. 2 lavados de 5 minutos c/u con alcoholes al 100, 96 y 75%.
4. 2 lavados en agua destilada de 5 min.

5. Bloqueo con suero de cabra al 2% diluido en PBS con 1% de ASB a pH 7.5, por 30 minutos.
6. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
7. Bloqueo de inmunoglobulinas endógenas con un anticuerpo sin biotinar echo en cabra contra IgG de pollo, diluido al 2% en PBS a pH 7.5, por 30 minutos.
8. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
9. Incubación con anticuerpo primario de pollo diluido 1/2000 en PBS con 1% de ASB a pH 7.5, por 30 minutos.
10. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
11. Incubación del anticuerpo secundario biotinilado anti IgG de pollo hecho en cabra por 30 min.
12. 2 lavados con PBS pH 7.5, por 5 min.
13. Incubación del complejo avidina DH-fosfatasa biotinilada H, por 30 min.
14. 2 lavados con PBS pH 7.5, por 5 min.
15. Incubación del cromógeno (Vector red sustrato solution) por 5-6 min, diluido con Tris HCl 100mM pH 8.4.
16. 2 lavados con PBS pH 7.4, por 5 min.
17. Enjuagar en agua corriente.
18. Contraste con hematoxilina de Harris por 5 minutos.
19. Enjuagar con agua destilada.
20. Deshidratación, aclaramiento y montaje de las laminillas.

ANEXO 7: Protocolo de inmunohistoquímica 3

1. Incubar laminillas previamente tratadas con Poly-Lycine, que fueron montadas en cortes en blanco, por 2 horas a 60°C en estufa.
2. 3 lavados en xilol de 10 min c/u.
3. 2 lavados de 5 minutos c/u con alcoholes al 100, 96 y 75%.
4. 2 lavados en agua destilada de 5 min.
5. Recuperación antigénica incubando las laminillas con una solución de pronasa al 0.5%, diluida en Tris 100Mm, con 0.5% de SDS, pH 7.5, por 15min.
6. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
7. Bloqueo con suero de cabra al 2% diluido en PBS con 1% de ASB a pH 7.5, por 30 minutos.
8. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
9. Bloqueo de inmunoglobulinas endógenas con un anticuerpo sin biotinar hecho en cabra contra IgG de pollo, diluido al 2% en PBS a pH 7.5, por 30 minutos.
10. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
11. Incubación con anticuerpo primario de pollo diluido 1/2000 en PBS con 1% de ASB a pH 7.5, por 30 minutos.
12. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.

- 13 Incubación del anticuerpo secundario biotinilado anti IgG de pollo hecho en cabra por 30 min.
- 14 2 lavados con PBS pH 7.5, por 5 min
- 15 Incubación del complejo avidina DH-fosfatasa biotinilada H, por 30 min
- 16 2 lavados con PBS pH 7.5, por 5 min.
- 17 Incubación del cromógeno (Vector red sustrato solution) por 5-6 min, diluido con Tris HCl 100mM pH 8.4.
- 18 2 lavados con PBS pH 7.4, por 5 min.
- 19 Enjuagar en agua corriente.
- 20 Contraste con hematoxilina de Harris por 5 minutos.
- 21 Enjuagar con agua destilada.
- 22 Deshidratación, aclaramiento y montaje de las laminillas.

ANEXO 8: Protocolo de inmunohistoquímica 4

1. Incubar laminillas previamente tratadas con Poly-Lycine, que fueron montadas en cortes en blanco, por 2 horas a 60°C en estufa.
2. 3 lavados en xilol de 10 min c/u.
3. 2 lavados de 5 minutos c/u con alcoholes al 100, 96 y 75%.
4. 2 lavados en agua destilada de 5 min.
5. Recuperación antigénica sumergiendo las laminillas en una solución buffer de citratos a 0.01 M pH 6 y colocándolas en el horno de microondas por 5 min en el nivel medio de potencia.
6. Dejar reposar las laminillas por 15 minutos a temperatura ambiente.
7. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
8. Bloqueo con suero de cabra al 2% diluido en PBS con 1% de ASB a pH 7.5, por 30 minutos.
9. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
10. Bloqueo de inmunoglobulinas endógenas con un anticuerpo sin biotinilar hecho en cabra contra IgG de pollo, diluido al 2% en PBS a pH 7.5, por 30 minutos.
11. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
12. Incubación con anticuerpo primario de pollo diluido 1/2000 en PBS con 1% de ASB a pH 7.5, por 30 minutos.
13. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
14. Incubación del anticuerpo secundario biotinilado anti IgG de pollo hecho en cabra por 30 min.
15. 2 lavados con PBS pH 7.5, por 5 min.
16. Incubación del complejo avidina DH-fosfatasa biotinilada H, por 30 min
17. 2 lavados con PBS pH 7.5, por 5 min.
18. Incubación del cromógeno (Vector red sustrato solution) por 5-6 min, diluido con Tris HCl 100mM pH 8.4.

19. 2 lavados con PBS pH 7.4, por 5 min.
20. Enjuagar en agua corriente.
21. Contraste con hematoxilina de Harris por 5 minutos.
22. Enjuagar con agua destilada.
23. Deshidratación, aclaramiento y montaje de las laminillas.

ANEXO 9: Protocolo de inmunohistoquímica 5

1. Incubar laminillas previamente tratadas con Poly-Lycine, que fueron montadas en cortes en blanco, por 2 horas a 60°C en estufa.
2. 3 lavados en xilol de 10 min c/u.
3. 2 lavados de 5 minutos c/u con alcoholes al 100, 96 y 75%.
4. 2 lavados en agua destilada de 5 min.
5. Bloqueo con suero de cabra al 2% diluido en PBS con 1% de ASB a pH 7.5, por 30 minutos.
6. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
7. Incubación con anticuerpo primario de conejo diluido 1/2000 en PBS con 1% de ASB a pH 7.5, por 30 minutos.
8. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
9. Incubación del anticuerpo secundario biotinilado anti IgG de conejo hecho en cabra por 30 min.
10. 2 lavados con PBS pH 7.5, por 5 min.
11. Incubación del complejo avidina DH-fosfatasa biotinilada H, por 30 min
12. 2 lavados con PBS pH 7.5, por 5 min.
13. Incubación del cromógeno (Vector red sustrato solution) por 5-6 min, diluido con Tris HCl 100mM pH 8.4.
14. 2 lavados con PBS pH 7.4, por 5 min.
15. Enjuagar en agua corriente.
16. Contraste con hematoxilina de Harris por 5 minutos.
17. Enjuagar con agua destilada.
18. Deshidratación, aclaramiento y montaje de las laminillas.

ANEXO 10: Protocolo de inmunohistoquímica 6

1. Incubar laminillas previamente tratadas con Poly-Lycine, que fueron montadas en cortes en blanco, por 2 horas a 60°C en estufa.
2. 3 lavados en xilol de 10 min c/u.
3. 2 lavados de 5 minutos c/u con alcoholes al 100, 96 y 75%.
4. 2 lavados en agua destilada de 5 min.
5. Recuperación antigénica incubando las laminillas con una solución de pronasa al 0.5%, diluida en Tris 100Mm, con 0.5% de SDS, pH 7.5, por 15min.
6. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
7. Bloqueo con suero de cabra al 2% diluido en PBS con 1% de ASB a pH 7.5, por 30 minutos.

8. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
9. Incubación con anticuerpo primario de conejo diluido 1/2000 en PBS con 1% de ASB a pH 7.5, por 30 minutos.
10. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
11. Incubación del anticuerpo secundario biotinilado anti IgG de conejo hecho en cabra por 30 min.
12. 2 lavados con PBS pH 7.5, por 5 min.
13. Incubación del complejo avidina DH-fosfatasa biotinilada H, por 30 min.
14. 2 lavados con PBS pH 7.5, por 5 min.
15. Incubación del cromógeno (Vector red sustrato solution) por 5-6 min, diluido con Tris HCl 100mM pH 8.4.
16. 2 lavados con PBS pH 7.4, por 5 min.
17. Enjuagar en agua corriente.
18. Contraste con hematoxilina de Harris por 5 minutos.
19. Enjuagar con agua destilada.
20. Deshidratación, aclaramiento y montaje de las laminillas.

ANEXO 11: Protocolo de inmunohistoquímica 7

1. Incubar laminillas previamente tratadas con Poly-Lycine, que fueron montadas en cortes en blanco, por 2 horas a 60°C en estufa.
2. 3 lavados en xilol de 10 min c/u.
3. 2 lavados de 5 minutos c/u con alcoholes al 100, 96 y 75%.
4. 2 lavados en agua destilada de 5 min.
5. Recuperación antigénica sumergiendo las laminillas en una solución buffer de citratos a 0.01 M pH 6 y colocándolas en el horno de microondas por 5 min en el nivel medio de potencia.
6. Dejar reposar las laminillas por 15 minutos a temperatura ambiente.
7. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
8. Bloqueo con suero de cabra al 2% diluido en PBS con 1% de ASB a pH 7.5, por 30 minutos.
9. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
10. Incubación con anticuerpo primario de conejo diluido 1/2000 en PBS con 1% de ASB a pH 7.5, por 30 minutos.
11. 2 lavados con PBS pH 7.5, de 5 min.
12. Incubación del anticuerpo secundario biotinilado anti IgG de conejo hecho en cabra por 30 min.
13. 2 lavados con PBS pH 7.5, por 5 min.
14. Incubación del complejo avidina DH-fosfatasa biotinilada H, por 30 min.
15. 2 lavados con PBS pH 7.5, por 5 min.
16. Incubación del cromógeno (Vector red sustrato solution) por 5-6 min, diluido con Tris HCl 100mM pH 8.4.

17. 2 lavados con PBS pH 7.4, por 5 min.
18. Enjuagar en agua corriente.
19. Contraste con hematoxilina de Harris por 5 minutos.
20. Enjuagar con agua destilada.
21. Deshidratación, aclaramiento y montaje de las laminillas.

ANEXO 12: Deshidratación de laminillas para inmunohistoquímica.

1. Alcohol al 75% por 1 minuto.
2. Alcohol al 75% por 1 minuto.
3. Alcohol al 95% por 1 minuto.
4. Alcohol al 95% por 1 minuto.
5. Alcohol absoluto por 1 minuto.
6. Alcohol absoluto por 1 minuto.
7. Xilol por 1 minuto.
8. Xilol por 1 minuto.

ANEXO 13: Aislamiento viral

1. Las muestras se cortaron en trozos pequeños con tijeras estériles
2. Posteriormente fueron maceradas en mortero con caldo triptosa fosfato (CTF) y antibióticos (penicilina G sódica 10,000 UI/ml, sulfato de estreptomicina 10 mg/ml, gentamicina 250 ug/ml y micostatina 5,000 UI/ml) a manera de obtener una suspensión del 10 al 20% (peso/volumen).
3. Esta suspensión se centrifugó a 1000 X g durante diez minutos, a una temperatura de 4° C
4. Posteriormente se pasó el sobrenadante por un filtro tipo membrana con un poro de 0.45 micras y se dejó reposar el sobrenadante durante dos horas para dejar actuar los antibióticos
5. Inoculación en embriones de pollo de nueve a once días de desarrollo embrionario en cavidad alantoidea.

ANEXO 14: Hemoaglutinación

1. Se colocaron 0.050 a 0.100 ml de fluido alantoideo en una placa de acrílico para aglutinación
2. Se mezclaron con 0.050-0.100 ml de eritrocitos de pollo lavados, a una concentración del 2%.
3. Posteriormente se movió la placa suavemente durante 10 a 15 segundos y se observó la presencia o ausencia de hemoaglutinación.

ANEXO 15: Inhibición de la hemoaglutinación

1. Se colocaron 25 µl de cada uno de los fluidos positivos a la hemoaglutinación de eritrocitos de pollo en dos pozos de la microplaca en forma de "V".
2. En el primer pozo se añadió un volumen igual de suero negativo a la presencia de anticuerpos contra el virus H5N2 de IA
3. En el segundo pozo se añadió un volumen igual de antisuero anti-H5N2BP (CPA-SENASICA).

4. Se agitó gentilmente la microplaca y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente.
5. Posteriormente se añadieron 25 µl de la suspensión de eritrocitos lavados de pollo al 1% a cada pozo, seguido de un movimiento gentil y se incubó por 40 minutos a temperatura ambiente.
6. La inhibición de la hemoaglutinación en la microplaca se observa con la aparición de un botón rojo intenso de glóbulos rojos en el fondo del pozo en “V” de la microplaca.
7. Como testigo positivo se utilizó líquido alantoideo positivo al VIA H5N2BP (Proporcionado por el INIFAP).
8. Como testigo negativo se utilizó líquido alantoideo de embriones SPF ALPES II de doce días de edad que no fueron inoculados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Easterday BC, Hinshaw VS, Halvorson DA. Influenza. In Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Mc Dougald LR, Saif YM. Diseases of Poultry. 10th ed. Iowa, State University Press, 1997.
2. Gill FB. Ornithology. 2^{da} ed. W.H. Freeman and Company New York, EUA, 1995.
3. Swayne DE, Halvorson DA. Influenza. In. Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE. Diseases of Poultry. 12th ed. Blackwell Publishing, Ames IA, USA, 2008.
4. He X, Zhou J, Bartlam M, Zhang R, Ma J, Lou Z, Li X, Li J, Joachimiak A, Zeng Z, Ge R, Rao Z y Liu Y. Crystal structure of the polymerase PA_C-PB1_N complex from an avian influenza H5N1 virus. Nature. 2008; 454:1123-1127.
5. Lamb RA, Kolakofsky D. Orthomyxoviridae, The viruses and their replication. Fundamental virology. Eds, Knipe DM, Howley PM. 4ta ed. USA: Lippincott Williams and Wilkies. 2001.
6. Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In Field Virology. Eds, BN, Knipe DM, Howley PM. USA: Lippincott-Raven. 1996.
7. Justin DB, Stalknecht DE, Beack JR, Suarez DL, Swaynet DE. Susceptibility of North American ducks and gulls to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. Emerg. Infect. Dis. 2006; 12:1663-1700.
8. Louchern RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfs S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus DME. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J. Virol. 2005; 79: 2814-2822.
9. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev. 1992; 56:152-79.
10. Garcia M, Crawford JM, Latimer JW, Rivera CE, Perdue M. Heterogeneity in the hemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. J. Gen. Virol. 1996; 77:1493-1504.
11. Seene DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, Person JE, Suss J, Lipkind M, Kida H, Webster RG. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site secuencia of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid secuencia at HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. Avian Dis. 1996; 40:425-437.
12. Stieneke GA, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, Klenk HD, Garten W. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. EMBO J. 1992; 11:2407-2414.
13. Bosch FX, Orlich M, Klenk HD, Rott R. The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. Virol. 1979; 95:197-207.
14. Li Z, Jiang Y, Jioao P, Wang A, Zhao F, Tian G, Wang X, Yu K, Bu Z y Chen H. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. J. Virol. 2006; 80:11115-11123.
15. OIE. Avian influenza, International animal health code-2006.
16. Hooper P. Selleck P. Pathology of low and high virulent influenza virus infections. In Proceedings of the fourth international symposium on avian

- influenza. Eds. Swayne DE, Slemons RD. U.S. Animal Health Association. 1998.
17. Masatoshi O, Saito T, Yamamoto Y, Mase M, Tsuduku S, Nakamura K, Tsukamoto K, Yamaguchi S. Low pathogenicity H5N2 avian influenza outbreak in Japan during the 2005-2006. *Vet. Microbiol.* 2007; 124:35-46.
 18. Mo IP, Brugh M, Fletcher OJ, Rowland GN, Swayne DE. Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. *Avian. Dis.* 1997; 41:125-136.
 19. Mundt E, Gay L, Jones L. Replication and pathogenesis associated with H5N1, H5N2 and H5N3 low pathogenic avian influenza virus infection in chickens and ducks. *Arch. Virol.* 2009; 154:1241-1248.
 20. Slemons, R. D. and D. E. Swayne. Nephrotropic properties demonstrated by A/chicken/Alabama/75 (H4N8) following intravenous challenge of chickens. *Avian Dis.* 1992; 36:926—931.
 21. Swayne DE. Pathobiology of H5N2 Mexican avian influenza virus infections of chickens. *Vet. Pathol.* 1997; 34:557-567.
 22. Swayne DE, Alexander DJ. Confirmation of nephrotropism and nephropathogenicity of 3 low-pathogenic chicken-origin influenza viruses for chickens. *Avian Pathol.* 1994; 23:345—352.
 23. Swayne DE. Slemons RD. Renal pathology in specific-pathogen free chickens inoculated with a waterfowl- origin type A influenza virus. *Avian Dis.* 1990; 34:285-294.
 24. Swayne DE, Radin MJ, Hoepf TM, Slemons RD. Acute renal failure as the cause of death in chickens following intravenous inoculation with avian influenza virus A/chicken/Alabama/7395/75 (H4N8). *Avian Dis.* 1994; 38:151-157.
 25. Hernández MA. Estudio de la patogenicidad del virus de la influenza aviar (H5N2) altamente patógeno mediante inmunohistoquímica. Tesis de maestría. Fac. Med. Vet. y Zoo. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1998.
 26. Padilla R. Avian influenza: histopathology and viral detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by RT-PCR. *Rev. Vet. Mex.* 2004; 35 :1-19.
 27. Perkins LEL Swayne DE. Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Vet. Pathol.* 2001; 38:149-164.
 28. Shortridge, K. F., N. N. Zhou, Y. Guan, P. Gao, T. Ito, Y. Kawaoka, S. Kodihalli, S. Krauss, D. Markhill, G. Murti, M. Norwood, D. Senne, L. Sims, A. Takada, and R. G. Webster. 1998. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virol.* 1998; 252:331—342.
 29. Swayne DE. Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian Dis.* 2007; 51:242-249.
 30. Pillai SPS, Suarez DL, Pantin JM, Lee CW. Pathogenicity and transmission studies of H5N2 parrot avian influenza virus of Mexican lineage in different poultry species. *Vet. Microbiol.* 2008; 129:48-57.
 31. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar. D. O. F. 30 de enero de 2006.

32. Lane D. Antibodies, a laboratory manual. 1^{ra} ed. Harlow, EUA, 1998.
33. Sánchez GFD. Diagnóstico de neosporosis bovina en fetos por inmunohistoquímica y PCR del gen pNc5 y el ITS-1. Tesis de maestría. Fac. Med. Vet. y Zoo. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 2006.
34. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Métodos histotecnológicos. Preparado por el Instituto de patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos (AFIP) y el Registro de Patología de los Estados Unidos (ARP). Washington D.C. 1995.
35. Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM. Isolation and identification of avian pathogen . The American association of avian pathologists. University of Pennsylvania E.U. 1998.