

7
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

FALLA DE ORIGEN

"DETERMINACION DE LA VIABILIDAD DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRAGICA VIRAL DE LOS CONEJOS EN ALFALFA, ALIMENTO BALANCEADO COMERCIAL, COSTALES CON ALIMENTO Y RATAS".



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
MEDICAS VETERINARIAS ZOOTECNISTAS
P R E S E N T A N :
LAURA BORJA GIL
MARIA DOLORES ORTEGA LARIOS



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Pag
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
HIPOTESIS	7
OBJETIVOS	7
MATERIAL Y METODOS	8
Animales	8
Unidades de aislamiento	8
Obtencion de Semilla Viral	8
Prueba de Hemoaglutinación (HA) e Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA)	9
Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFID).....	10
Medidas de Bioseguridad	11
Desinfectantes	11
Personal	12
Alimentos	14
Alfalfa fresca	14
Alfalfa achicalada	14
Alimento balanceado comercial	14
Costales	15
Experimento Complementario	15
Ratas	15

	Pag.
RESULTADOS	17
Alfalfa	18
Alimento balanceado comercial	18
Costales con alimento	19
Experimento complementario	19
Ratas	20
Cuadro 1	21
Gráfica 1	23
Cuadro 2	24
Gráfica 2	25
Cuadro 3	26
Gráfica 3	27
Cuadro 4	28
Gráfica 4	29
Cuadro 5	30
Gráfica 5	31
Cuadro 6	32
DISCUSION	33
Alfalfa	33
Alimento balanceado comercial	34
Costales	34
Ratas	35
CONCLUSIONES	38
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	37

RESUMEN

La Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC), es un padecimiento de reciente incursión en nuestro país, que se caracteriza por ser altamente contagioso con un periodo de incubación de 48 a 72 horas. Afecta a conejos domésticos principalmente, con una morbilidad que oscila entre el 30 y 80 % y una mortalidad de 80 al 100 % .

En la presente investigación se determinó la viabilidad del virus de la EHVC en alfalfa, alimento balanceado comercial, costales con alimento y ratas; observándose que estos actúan como vehículos de transmisión mecánica de la enfermedad.

Por otra parte se señala que el proceso de elaboración del alimento balanceado comercial, así como la aplicación de medidas de bioseguridad evitan la infección de la EHVC.

Para la realización de este estudio se elaboró la semilla viral, para calcular la dosis letal conejo 50 % / vía oral mediante el método de Reed and Muench.

Los alimentos y costales fueron contaminados con una suspensión viral de 100 DLC 50 % / ml / vía oral, mientras que a las ratas se les ofreció hígado de conejo infectado con el virus.

Los alimentos ya contaminados fueron ofrecidos a grupos de conejos a diferentes intervalos para observar la viabilidad del virus. Observándose que la alfalfa, alimento balanceado comercial y los costales, actúan como vehículos de transmisión de la enfermedad por más de 30 días, obteniéndose una mortalidad del 100 %, mientras que el alimento sometido a 80°C durante 3 minutos no es capaz de transmitir la enfermedad; por otro lado, las ratas solo actúan como vectores hasta el 3er día después de contaminarse.

INTRODUCCIÓN.

La Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC) es un padecimiento de etiología viral (21,50), que fue detectado por primera vez en China, extendiéndose rápidamente a otros países (15,17,19,46).

En Europa se convive con esta enfermedad desde 1987 en donde se vieron afectadas la República Federal Alemana, Alemania Oriental, Checoslovaquia, Rusia, Rumania, Polonia, Hungría, Francia, Italia, Portugal, España, Suiza y Austria (15,17,19,44, 46).

En México se detectó a mediados de diciembre de 1988, asociándose con la introducción ilegal de canales congeladas de conejos procedentes de China un mes anterior (15,17,18,46).

El periodo de mayor difusión de la EHVC fue a mediados de febrero de 1989 detectándose su presencia en los estados de México, Distrito Federal, Guanajuato, Michoacán, Puebla, Morelos, Queretaro, San Luis Potosí, Tlaxcala, Jalisco, Hidalgo, Coahuila, Nuevo León, Guerrero y Veracruz (9,14,18,24,28).

Esta enfermedad se caracteriza por ser altamente contagiosa con un periodo de incubación de 48 a 72 horas. Afecta a conejos domésticos principalmente, con una morbilidad que oscila entre 30 y 80 % y una mortalidad que va de 80 al 100 % (3,7,15,18,20,28, 55).

En algunos brotes se han observado picos de mortalidad entre los 2 y 3 días posteriores a la introducción de la enfermedad; iniciándose con un curso agudo y muerte a las 72 horas. Y un segundo pico de los 7 a 13 días posteriores a la infección, por lo que se habla de una mortalidad difásica (13,14,26,55).

Existen estudios que indican que la signología de la EHVC es difícil de observar debido a que se presenta muerte súbita; sin embargo, se señala que en algunas ocasiones antes de la muerte

se presenta inquietud, convulsiones, chillidos y agonía por asfixia (48). Otros autores señalan la presencia de líquido sanguinolento en fosas nasales, distensión abdominal, piroxia y ocasionalmente parálisis de los miembros. (3,15,18,18,19,20,26,27, 39,52).

Otros trabajos mencionan que las primeras muertes ocurren en hembras en periodo de lactación, seguido de hembras gestantes y machos adultos, mientras que los animales menores de 2 meses resultan refractarios a la enfermedad (3,9,10,12,19,20,26,42,46, 47,50,54).

Las lesiones macroscópicas más frecuentes son: congestión pulmonar y bronquial, presencia de espuma de color rojizo al abrir la tráquea, distensión intestinal, hepatomegalia con decoloración y friabilidad, y esplenomegalia; ocasionalmente congestión renal, lesiones hemorrágicas en miocardio, tracto digestivo y corteza adrenal, así como presencia de líquido hemorrágico en cavidad torácica y abdominal (12,16,18,20,26,43, 44,46,54).

En cuanto a las lesiones microscópicas: se observan cambios circulatorios, edema y trombosis pulmonar; hemorragias y edema perivascular, necrosis hepática multifocal y difusa, necrosis focal en riñones y en corteza adrenal, así como cuerpos de inclusión en células hepáticas, renales y encefálicas (1,13,16, 18,26,27,42,55).

Se afirma que hasta el momento no ha sido posible aislar el agente etiológico de la enfermedad en cultivos celulares por lo que aún existe gran controversia al respecto (20,50,55). Algunos autores indican que el genoma del virus esta constituido

por DNA (20,21,54), que el virión es estable a pH 3 a 50 °C durante 60 minutos (16,20,46), y que se inactiva con hidróxido de sodio al 1 %, formaldehído al 0.4% a temperatura de 4 a 37 °C y β propiolactona a 4 °C (53).

Estudios de microscopía electrónica han demostrado la existencia de partículas virales de 32 a 34 nm de diámetro de forma icosaédrica, con capsíde constituida por 32 capsómeros. Características compatibles con las observadas en la familia Parvoviridae (7,18,29,33,34,54). Otros autores mencionan que puede corresponder a un Picornavirus o a un Calicivirus (7,18,20,47,48,55). Sin embargo, el genoma de estos está constituido por RNA (16,20).

Para el diagnóstico de la EHVC se han utilizado las pruebas de Hemoaglutinación (HA) e Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA), debido a que el virus es capaz de aglutinar glóbulos rojos tipo 0 de humano (25,26,47). Un estudio realizado en España señala títulos mayores de 1:4 096 en la prueba HA y en sueros de conejos sobrevivientes, título de anticuerpos de 1:640 por la prueba de IHA (20). El diagnóstico por HA se realiza a partir de muestras de cerebro, músculo, corazón, riñón, bazo, pulmón, hígado; señalando a este último como órgano de elección para el diagnóstico, ya que contiene mayor concentración de virus (4,15,16,51,55).

También se ha comunicado el uso de la prueba de Inmunofluorescencia para el diagnóstico de la enfermedad, empleando improntas y cortes por congelación de órganos, siendo los más importantes el hígado, bazo y riñón (15).

La técnica de inmunofluorescencia es importante ya que esta contribuye para la clasificación del virus. En el caso del Parvovirus la inmunofluorescencia se observa en el núcleo y

citoplasma mientras que en el Picornavirus y Calicivirus solamente en el citoplasma (42).

En varios casos de la EHVC se ha aislado Pasteurella multocida y Bordetella bronchiseptica en pulmón, desconociéndose hasta el momento la posible interacción entre estos; (9,13,14,20,47). Sin embargo, resulta imprescindible un diagnóstico diferencial con estas enfermedades debido a que las lesiones macroscópicas que producen se asemejan (37).

Aún hay dudas acerca de la existencia de animales portadores de esta enfermedad. Algunos estudios realizados hasta el momento indican que animales altamente susceptibles expuestos a animales recuperados de la enfermedad, después de 2 meses, no enferman y no se producen anticuerpos contra la EHVC (21,29,32,40,41,).

Por otra parte las vías de transmisión de la EHVC no han sido bien establecidas hasta el momento, algunos trabajos sugieren que la principal vía es la aerógena (48). Sin embargo no deben descartarse otras de mayor o menor importancia como mucosas, solución de continuidad y la vía oral, a través de alimentos o agua contaminada (2,7,8,10,13,20,48,51,54,55).

Al respecto se señala que la mayor incidencia de esta enfermedad se ha presentado en explotaciones de traspatio y pequeñas granjas cunicolas (14,16,20,46). Tomando en consideración que en este tipo de explotaciones normalmente no se aplican medidas de bioseguridad y se emplean alimentos frescos como fuente de alimentación, se sugiere que la vía oral juega un papel de suma importancia en la transmisión del virus, ya que alimentos contaminados accidentalmente podrían actuar como posibles vehículos mecánicos del virus de la EHVC.

Es común que gente que carezca de información sobre la EHVC

o cualquier otra enfermedad exótica se deshaga de los cadáveres y desechos de las granjas arrojándolos a canales de aguas negras que sirven para la irrigación de sembradíos de alfalfa, pudiendo ser ésta, una fuente de contaminación como sucede en otros tipos de enfermedades virales, tal como la Poliomielititis en el humano (43). Lo mismo ocurre con otros plantíos que son empleados para la fabricación de alimento balanceado comercial; sin embargo, se desconoce si los procedimientos utilizados para su elaboración inactivan al virus, de tal forma que puedan actuar como posibles vehículos de transmisión de la EHVC.

Así mismo personas que comercializan con la alfalfa (alfalferos), pueden actuar como vehículos de transmisión mecánica ya que es frecuente que estos vayan de una a otra granja realizando sus entregas, siendo común que bajen la alfalfa y la coloquen cerca de donde se encuentran los animales, dándose la posibilidad de tener contacto con cadáveres o excretas infectadas por el virus y de esta forma diseminar la enfermedad a otras explotaciones cunícolas por medio de la alfalfa contaminada (55).

También a través de cadáveres infectados que son arrojados a basureros en los que normalmente existe fauna nociva (ratas), que en un momento dado pueden servir como transmisores mecánicos de la enfermedad debido a sus hábitos de alimentación y comportamiento migratorio.

H I P O T E S I S

Si la alfalfa, el alimento balanceado comercial y los costales con alimento se contaminaran con el virus de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos, estos actuaran como vehiculos transmisores de la enfermedad. Asi mismo las ratas que consumen deshechos (cadaveres y alimento) de explotaciones infectadas, serviran como vectores mecanicos de la enfermedad.

O B J E T I V O S

El principal objetivo del presente trabajo fue; investigar si la alfalfa, alimento balanceado comercial, costales con alimento y ratas, al infectarse con material organico que contenga virus de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos actuan como vehiculos de transmisión mecanica de la enfermedad. En segundo lugar, determinar si los procesos de elaboración de la alfalfa achicalada, del alimento balanceado comercial, asi como la aplicación de medidas de bioseguridad, evitan la infección por el agente etiológico de esta enfermedad.

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Alta seguridad de la Comisión México-Americana para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (C.P.A.), ubicado en el Km 15.5 de la carretera México-Toluca, en México, D.F.

Para la realización de este estudio se utilizaron:

ANIMALES. - 80 Conejos de las razas Nueva Zelanda y California, mayores de 3 meses de edad y más de 2.5 Kg de peso que fueron obtenidos de la Granja Experimental Avícola y Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., y de la Granja Cunicola de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

2 Ratas Albinas (Clasus norvegicus), Cepa Wister, hembras; de 8 meses de edad y con un peso de 350 g que fueron proporcionadas por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

UNIDADES DE AISLAMIENTO. - Se emplearon 6 unidades de aislamiento, una de estas se ocupó como bodega, las restantes se utilizaron para los diferentes experimentos que se llevaron a cabo. Para cada estudio se emplearon de 3 a 4 conejos y 4 más se tuvieron en jaulas individuales que fueron colocadas en puntos estratégicos en el pasillo interno que da acceso a las unidades de aislamiento, estos conejos sirvieron como control de las medidas de bioseguridad que se aplicaron durante todo el tiempo que duró la investigación, sangrandose constantemente para verificar la ausencia de anticuerpos por medio de la prueba de IHA que se realizó cada 15 días.

OBTENCION DE SEMILLA VIRAL. - Se emplearon 2 conejos que se

sangraron para comprobar la ausencia de inmunoglobulinas contra el virus de la EHVC por la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA). A éstos se les administró 1 ml por vía intraperitoneal de un macerado de hígado diluido 1:10 de un conejo muerto por la enfermedad durante un brote de campo en nuestro país.

Inmediatamente después de la muerte se les realizó la necropsia y se recolectaron; pulmón, riñón, tráquea, ganglios linfáticos y bazo; estas muestras fueron conservadas en formal al 10 % y se utilizaron para estudios histopatológicos. Por otra parte, fragmentos de hígado fueron utilizados para preparar la semilla viral que se utilizó en los diferentes experimentos. Esta consistió de un macerado 1:10 en solución amortiguadora de fosfatos (SAF) pH 7.2; la suspensión se congeló y descongeló para permitir la liberación del virus de las células, posteriormente se centrifugó a 15 000 g durante 20 minutos a 4 °C ; al sobrenadante se le adicionó 1 000 UI de penicilina G sódica / ml y 0.001 g de sulfato de estreptomycin / ml. Posteriormente se pasó a través de una membrana estéril de 0.22 micras de diámetro de poro, se fraccionó en ampollitas de vidrio con 2 ml cada una y se congeló en un termo con nitrógeno líquido hasta su uso, posteriormente se procedió a su titulación.

PRUEBAS DE HEMOAGLUTINACION (HA) E INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION (IHA).- Se realizaron de acuerdo a las técnicas descritas por Lennette y Col., para Encefalitis Equina (38), y se utilizaron los métodos alfa y beta señalados por Cunningham (23). Las pruebas se efectuaron en microplacas de 96 pozos fondo U empleándose SAF pH 7.2, glóbulos rojos de humano tipo O al 1 %, como antígeno la semilla viral, sueros

* Previamente: por el Laboratorio de Alta Seguridad de la U. P. S.

positivos y negativos al virus de la EHVC * y sueros de conejos y ratas que se emplearon en los diferentes experimentos.

Método Alta. - Se utilizó para la detección de antígeno viral de la EHVC, a partir de diluciones dobles seriadas de los macerados de hígado siendo la inicial 1:500 y la final 1:512 000.

Se emplearon 2 hileras de pozos para cada muestra a una hilera se le adicionó un volumen igual de suero con 4 Unidades Inhibitorias de la Hemoaglutinación (UIHA) y a la otra un mismo volumen de SAF pH 7.2 que permitió conocer el título viral.

Método Beta. - Se utilizó para comprobar la presencia de inmunoglobulinas contra el virus de la EHVC en los sueros sanguíneos de los conejos y ratas que se usaron en el presente estudio. Los sueros de los conejos se obtuvieron mediante la punción de la vena marginal de la oreja. Los de las ratas por punción cardíaca y estos se absorbieron en tiras de papel filtro de 0.5 cm de ancho por 2.5 cm de largo, previamente identificadas. Con un perforador se obtuvieron fracciones de 12 mm². cada fragmento se colocó en un pozo de la microplaca al cual se le adicionaron 100 microlitros de SAF pH 7.2, se colocaron a 37 °C, 30 minutos y a partir de este se realizaron diluciones dobles seriadas considerando a la inicial 1:40 y la final 1:5120 (29), estas se enfrentaron a un volumen igual de SAF pH 7.2, contra 4 Unidades Hemoaglutinantes (UHA) del virus de la EHVC.

PRUEBA DE INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA (IFID). - Se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Kaplan y Koprosky (35). Se hicieron cortes por congelación a partir de los hígados de los conejos y ratas empleados en la investigación; se usó suero positivo y negativo a la EHVC y un conjugado

* Preparaciones por el Laboratorio de Alta Seguridad de la O. P. S.

(contra gamaglobulinas de conejo teñido con isotiocianato de fluoresceína)es. Como control se utilizaron cortes de hígados de conejos normales .

La semilla viral se tituló por la prueba de HA y se calculó la Dosis Letal Conejo 50 % (DLC 50 %) / ml / vía oral empleando diluciones decuples o logarítmicas desde 10^{-2} hasta 10^{-8} , mediante el Método de Reed and Muench (23).

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD.- Debido a que el virus de la EHVC es altamente contagioso se llevaron a cabo medidas de bioseguridad para evitar que el virus escapara de las unidades de aislamiento o se infectaran conejos sanos. Estas medidas consistieron en la aplicación de procedimientos técnicos, medidas sanitarias y normas de trabajo que a continuación se enumeran:

DESINFECTANTES:

- Solución desinfectante 1 (SD 1)

5 Metil, 2 Isopropil, Fenol	2.64 g
Metildodecibenciltrimetil Cloruro de Amonio	1.69 g
Metildodecixileno Bistremetil Cl. de Amonio	0.42 g
Alcohol Etilico	25.25 ml
Alcohol Metilico	8.40 ml
	cbp 100.00 ml

De esta solución se emplearon 10 ml por cada 2 litros de agua para la desinfección de los pasillos, unidades de aislamiento y todo el material que fue sacado de la unidad.

- Solución desinfectante 2 (SD 2).

Formaldehido comercial al 38.8 %

Se utilizó en la desinfección de la ropa mediante vapores de

esta solución al introducir un algodón empapado dentro de una bolsa de plástico; la ropa permaneció aquí por un tiempo mínimo de 24 horas.

- Mezcla para fumigación (M. F.)

Formaldehído comercial (38.8 %) 53 ml que se le adicionaron a 15 g de permanganato de potasio. Cantidades suficientes para fumigar 1 m³ (49).

PERSONAL.- Para el trabajo en las unidades de aislamiento se emplearon overoles, sandalias, botas, guantes desechables, lentes protectores y cubrebocas previamente desinfectados con SD 2.

El personal que labora en las unidades de aislamiento estuvo sujeto a ciertas normas que consistieron en dejar su ropa de calle en el vestidor externo incluyendo anillos, cadenas, relojes, etc., tomaba un baño a conciencia limpiando sus uñas, fosas nasales y boca para posteriormente pasar al vestidor interno donde se vestía con ropa desinfectada para transitar por el pasillo externo que da acceso a las unidades de aislamiento. Antes de ingresar a estas se cambiaba la ropa y se ponía ropa de trabajo desinfectada, atendía primeramente a los animales sanos y posteriormente a los conejos inoculados con el virus de la EHVC, se observaba cuidadosamente si estos presentaban algún signo de enfermedad o bien si había mortalidad; y por ningún motivo se regresaba a las unidades de aislamiento donde se encontraban los animales sanos. Los animales muertos al igual que la basura y las excretas se colocaron en bolsas de plástico, que fueron desinfectadas externamente con SD 1, antes de trasladarlas al laboratorio de Alta Seguridad de la C. P. A. o al horno crematorio según fuera el caso.

Antes de abandonar las unidades de aislamiento el personal desinfectaba por aspersión sus botas y el pasillo interno con SD 1, se despojaba de su ropa de trabajo, la que dejaba en una bolsa de plástico para su desinfección, se ponía ropa para trasladarse al vestidor interno donde la dejaba desinfectándose, finalmente se daba un baño con las mismas características que tomó al entrar y se ponía su ropa de calle en el vestidor externo.

En el laboratorio de Alta Seguridad de la C.P.A. se efectuaron las necropsias, estas se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar vertical, el manejo de los cadáveres se hizo utilizando guantes desechables, las necropsias se hicieron sobre las mismas bolsas de plástico en las que se transportaron los cadáveres al laboratorio, los desechos de las necropsias se colocaron dentro de otra bolsa de plástico que se desinfectó externamente con SD 1 y se esterilizó en un autoclave a 15 lbs. de presión por 20 minutos. La campana de flujo laminar se limpió y desinfectó con SD 1 al finalizar las necropsias.

NOTAS.- Todos los conejos que se utilizaron en los diferentes experimentos se sangraron previamente y a estas muestras se les realizó la prueba de IHA.

- A todos los animales que murieron durante la investigación se les hizo la necropsia para la extracción de hígado con el fin de llevar a cabo las pruebas de HA e IFID.

- Después de cada experimento se realizó la limpieza, lavado y desinfección de las unidades con SD 1 y M.F. 48 hrs. antes de introducir nuevos animales.

ALIMENTOS:

ALFALFA FRESCA.- Se infectaron 2 Kg de alfalfa fresca con 2 ml contenían $10^{2.8}$ de suspensión viral, que corresponde a 100 DLC 50 % / ml / vía oral. La alfalfa ya contaminada se mantuvo en una unidad de aislamiento durante 1 día, pasado este tiempo se le dio de comer a 4 conejos a los cuales se les retiró el alimento balanceado comercial.

ALFALFA ACHICALADA.- En un cajón de metal se colocaron 20 Kg de alfalfa fresca sobre una malla; la alfalfa se contaminó con 20 ml conteniendo 100 DLC 50 % / ml / vía oral de suspensión viral y se procedió a su achicalamiento directamente al sol, la alfalfa se volteó diariamente durante 8 días; el cajón se mantuvo cubierto con una malla de alambre y el piso circundante se desinfectó con SD 1 antes y después de infectar y voltear la alfalfa.

Una vez achicalada se ofrecieron 2 Kg a 4 conejos. A los 25 y 45 días después de su achicalamiento se repitió el mismo esquema con otros grupos de 3 conejos.

ALIMENTO BALANCEADO COMERCIAL.- Se contaminaron 1.750 Kg de alimento balanceado comercial con 3.5 ml, conteniendo 100 DLC 50 % / ml / vía oral de suspensión viral. Del alimento ya contaminado se tomaron 750 g y este se sometió a una temperatura de 80 °C durante 3 minutos, después de este tratamiento, el alimento se le ofreció a un grupo de 3 conejos.

El kilogramo de alimento restante se puso en una bolsa de plástico y esta se colocó en otra, almacenándose durante un mes, después del cual se les dio a 4 conejos.

COSTALES. - Se prepararon 6 costales con capacidad de 1 Kg de alimento, cantidad suficiente para mantener a 4 conejos durante 1 día. Cada costal se infectó externamente por aspersión con 2 ml conteniendo 100 DLC 50 % / ml / vía oral de suspensión viral; inmediatamente después uno de estos se desinfectó con SD 1 por aspersión y pasadas 24 horas se manipuló este costal y se vació su contenido manejándose este con las manos para finalmente depositarlo en los comederos de los animales. También a las 24 horas se manejó en igual forma otro costal sin desinfectarlo, para ofrecerlo a otro grupo de conejos.

Este procedimiento se repitió a los 20 y 40 días de haberse infectado los costales.

EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO. - Este experimento se realizó para comprobar la eficacia del desinfectante (SD 1), utilizado durante toda la investigación.

En una caja de unicol se colocó 1 Kg de alimento balanceado comercial, la cual se cerró herméticamente y se infectó externamente con 2 ml conteniendo 100 DLC 50 % / ml / vía oral de suspensión viral, 24 horas antes de dar el alimento a los conejos se desinfectó la caja con SD 1 por aspersión, se manipuló externamente previo aseo de las manos y su contenido se le ofreció a 3 conejos.

RATAS. - Las ratas se dejaron sin comer por un periodo de 24 horas. Pasado este tiempo se les ofrecieron 23.5 g de hígado de los conejos empleados para elaborar la semilla viral; a las 24 horas estas ratas se pasaron a jaulas limpias y desinfectadas que contenían 1 Kg de alimento balanceado comercial para que lo consumieran y caminaran sobre el, y se mantuvieron en este sitio

(18)

durante 24 horas; pasadas las cuales se sacó el alimento y se les ofreció a un grupo de 4 conejos. Mientras que las ratas se pasaron a otras jaulas con alimento. Este procedimiento se repitió a los 3, 5 y 25 días después de haber sido consumido el hígado por las ratas.

R E S U L T A D O S

El título obtenido del virus de la semilla viral fue de 1 : 256 000 en la cual se tenía 1 Unidad Hemaglutinante (UHA). Utilizandose para este trabajo una dilución 1 : 64 000 en donde se encontraron 4 UHA.

La Dosis Letal Conejo 50 % / ml / vía oral se encontró en una dilución de 10^{-8} .

Como dosis infectante se utilizó una dilución de $10^{-2.9}$, la cual correspondió a 100 Dosis Letales Conejo 50 % / ml / vía oral.

Todos los animales utilizados en los diferentes experimentos que fueron sangrados previamente, al realizarles la prueba de IHA resultaron seronegativos.

Por otro lado el conjugado utilizado para la prueba de IFID no se recomienda para el diagnóstico certero de esta enfermedad, ya que resultó inespecífico, debido a que éste fue preparado en conejo, por lo que mostró reacción antígeno-anticuerpo con todo el tejido hepático. Por lo que no se le dio confiabilidad a esta prueba.

Por otra parte las lesiones macroscópicas más frecuentes observadas en los animales muertos durante la investigación fueron las siguientes: congestión pulmonar, presencia de espuma de color rojizo en tráquea, hepatomegalia con decoloración y friabilidad.

Mientras que las lesiones encontradas en el estudio histopatológico que se les realizó a los tejidos de los conejos utilizados en la obtención de la semilla viral fueron: edema y

trombosis pulmonar, hemorragia y edema perivascular, necrosis hepática multifocal y difusa, hemorragias y necrosis en ganglios linfáticos y bazo.

A continuación se enumeran los resultados obtenidos en forma individual de cada uno de los experimentos realizados:
ALFALFA.-En esta investigación la mortalidad alcanzó el 100 %. Presentándose esta del primero al tercer día en los animales a los que se les dio la alfalfa fresca; y a los que se les ofreció la alfalfa achicalada, esta ocurrió del segundo al séptimo día después de haber suministrado el alimento infectado (Cuadro 1).

Los títulos obtenidos mediante la prueba de HA en los tejidos de los animales que se utilizaron en los experimentos, tanto de la alfalfa fresca como de la achicalada fueron de 1:2 000 hasta 1:128 000 (Cuadro 1 y Gráfica 1)

Como se puede observar en la gráfica 1 los títulos de HA, en los tejidos, se incrementaron en los animales a los que se les dio la alfalfa achicalada de 25 días, mientras que fueron menores considerablemente, en los animales a los que se les ofreció la de 45 días (Cuadro 1; Gráfica 1).

ALIMENTO BALANCEADO COMERCIAL.- En este estudio la mortalidad alcanzada fue del 100 % en los conejos a los que se les dio el alimento contaminado, sin someterlo a ningún tratamiento; presentándose esta del segundo al sexto día de haberlo dado y los títulos obtenidos por la prueba HA, en los tejidos de los conejos, fueron de 1:8 000 a 1:32 000 (Cuadro 2; Gráfica 2).

Sin embargo, a los animales a los que se les proporcionó el alimento contaminado y sometido a una temperatura de 80 °C durante 3 minutos (temperatura promedio obtenida después de haber

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

(19)

consultado varias fábricas procesadoras de alimento), no murieron; resultando seronegativos a la prueba IHA, 15 días posteriores al suministro del alimento contaminado (Cuadro 2).

COSTALES CON ALIMENTO. - La mortalidad en estos experimentos fue del 100 %. Presentándose esta del cuarto al séptimo día, en los animales a los que se les ofreció el alimento proveniente de los costales que fueron inicialmente infectados y después desinfectados con SD 1, 24 horas antes de ofrecerlo a los animales (Cuadro 3).

Mientras que la mortalidad en los conejos que recibieron alimento proveniente de costales infectados se presentó del segundo al sexto día (Cuadro 4).

Los títulos obtenidos por la prueba HA fueron de 1: 8 000 hasta 1:256 000, siendo mayores que los títulos presentados por los conejos a los que se les dió el alimento de los costales infectados (Cuadros 3 y 4 respectivamente; y Grafica 3).

Como se observa en las graficas 3 y 4 los títulos de la prueba de HA fueron mayores, ligeramente, en los animales a los que se les ofreció el alimento del primero y veintavo días, ya que en los que lo recibieron a los 40 fueron más bajos (Cuadros 3 y 4).

EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO. - Los animales empleados en este estudio no murieron durante los 15 días después de haberseles dado el alimento proveniente de la caja desinfectada; y cuando se sangraron se les realizó la prueba de IHA resultando seronegativos a esta (Cuadro 5).

RATAS. - En los conejos a los que se les ofreció el alimento balanceado comercial, el cual fue contaminado a las 24 y 72 horas por medio de ratas, una vez que estas fueron alimentadas con hígado proveniente de los conejos empleados en la elaboración de la semilla viral, se obtuvieron títulos, mediante la prueba de HA, de 1:8 000 a 1:32 000, a las 24 horas; mientras que los correspondientes a las 72 horas variaron de 1:16 000 a 1:32 000. Presentándose la muerte de todos estos, entre el tercero y sexto día después de haber suministrado el alimento (Cuadro 6; Grafica 5).

Los conejos a los que se les ofreció el alimento contaminado a los 5 y 25 días, por medio de las ratas, no murieron; posteriormente estos se sangraron a los 15 días y se les practicó la prueba de IHA, a la que resultaron seronegativos (Cuadro 6 ; Grafica 5).

C. M. P. E. O. No. 1

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE HA + IFID OBTENIDOS DE MACERADO Y
CORTES DE HIGADO DE CONEJOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON ALFALFA
CONTAMINADA CONTENIENDO 100 DLC 50 % / ml / VIA ORAL DE SUSPENSION VIRAL.

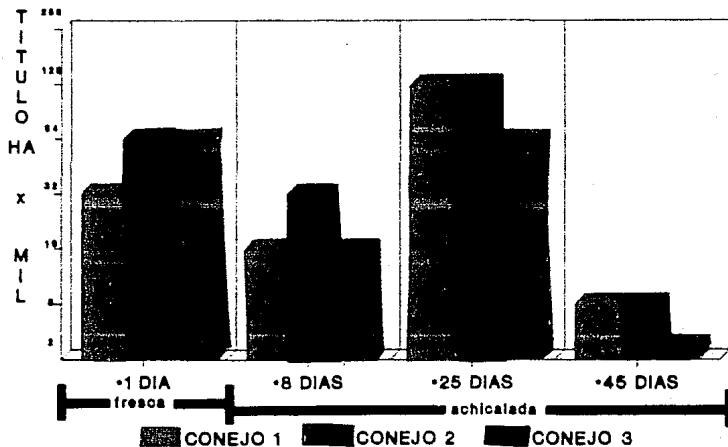
EXPERIMENTO ALFALFA FRESCA Conejo utilizado* (No. ?)	DIAS QUE TRANSCURRIERON ENTRE FECHA DE INFECCION Y FECHA DE MUERTE.	PRUEBA HA (POR MIL.)	PRUEBA IFID
1	1	1:92	-
2	2	1:64	--
3	2	1:64	--
4	2	1:92	-
ALFALFA ACHICALADA			
5	2	1:16	--
6	4	1:92	--
7	7	1:16	-
8	7	1:64	---
ALFALFA ACHICALADA Y ALMACENADA 25 DIAS.			
9	4	1:128	--
10	4	1:128	--
11	6	1:64	-

C U A I F O 1 (continuación)

EXPERIMENTO ALFALFA ACRICALADA Y ALMACENADA x 45 DIAS. Conejo utilizado ^o (No.)	DIAS QUE TRANSCURRIERON ENTRE FECHA DE INFECCION Y FECHA DE MUERTE.	PRUEBA BA (POR MIL)	PRUEBA IFID
12	2	1:8	+
13	3	1:8	+
14	4	1:2	+D

- Todos los conejos fueron negativos a anticuerpos contra ENVC, al inicio del experimento.
- D 10 % Del Campo Visual
- 25 % Del Campo Visual
- 50 % Del Campo Visual
- 75 % Del Campo Visual
- 100 % Del Campo Visual

GRAFICA 1.- Comparación de los títulos de HA obtenidos en los hígados de los conejos alimentados con la alfalfa fresca y achicalada, contaminada con 100 DLC 50 % /ml/via oral de virus de la EHVC, ofrecida a los animales después de 1, 8, 26 y 45 días.



-Tiempo que transcurrió desde la ingestión de la alfalfa hasta el momento de ofrecerla a los conejos.

CONVENCIONES No. 1

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE HA, IHA e IFID OBTENIDOS DE CORTES Y MACERADOS DE HIGADO INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON ALIMENTO BALANCEADO COMERCIAL CONTAMINADO CON 100 D/LC 50 x / ml / VIA ORAL DE SUSPENSIÓN VIRAL.

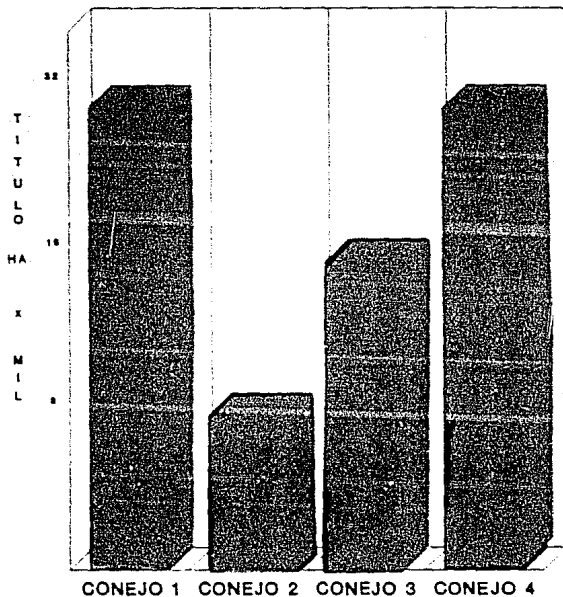
EXPERIMENTO ALIMENTO CONTAMINADO Y ALMACENADO (30 DÍAS) Conejo Utilizado * (No.)	DÍAS QUE TRANSCURREN ENTRE FECHA DE CONTA MINACION Y FECHA DE MUERTE.	PRUEBA HA (POR MIL)	PRUEBA IFID
15	2	1:32	+
16	4	1:2	++
17	6	1:16	+
18	6	1:32	-
ALIMENTO BALANCEADO COMERCIAL TRATADO A 80°C POR 3 MINUTOS.		PRUEBA IHA	
19	SV	EN	
20	SV	EN	
21	SV	EN	

SV = SOBREVIVIENTE

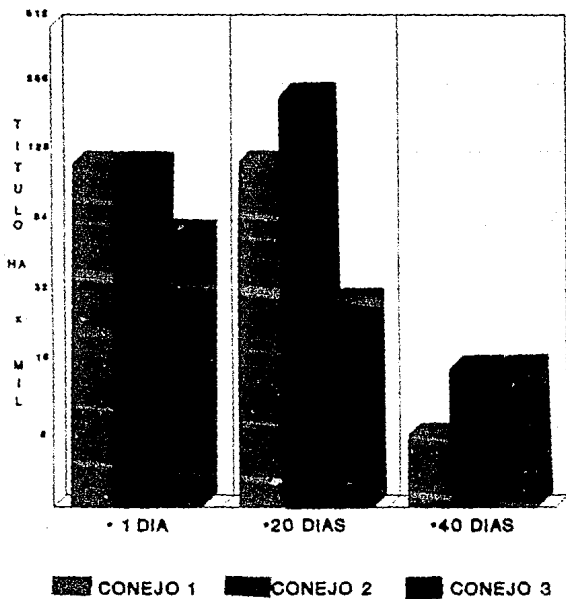
EN = SERONEGATIVO

* Todos los conejos fueron seronegativos a anticuerpos contra ENVC, al inicio del experimento.

GRAFICA 2.- Titulos HA obtenidos en los higados de conejos que recibieron concentrado contaminado, con 100 DLC 50 % /ml/ via oral, almacenado y proporcionado a los 30 días.

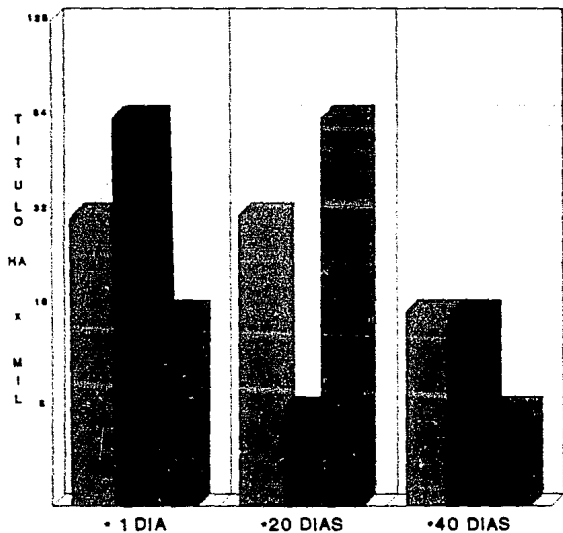


GRAFICA 3.- Comparación de los títulos de HA obtenidos en los experimentos realizados con alimento de costales que se infectaron y desinfectaron con SD1 (por aspiración) 24 horas antes de ofrecerlo a los animales.



*Tiempo en días transcurridos después de la infección de los costales con 2 ml. conteniendo 100 DLC 50 % /ml/via oral de la suspensión viral.

GRAFICA 4.- Comparación de los títulos de HA obtenidos en los experimentos realizados con el alimento de costales infectados con 2 ml. conteniendo 100 DLC 50 % /ml/via oral de la suspensión viral.



CONEJO 1 CONEJO 2 CONEJO 3

-Tiempo que transcurrió desde la infección de los costales con alimento, hasta el momento de ofrecer su contenido a los conejos.

C U A D R O No. 2

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE IHA OBTENIDOS DE CORTES Y MACERADOS DE HIGADOS EXTRAIDOS DE LOS ANIMALES A LOS QUE SE LES PROPORCIONO ALIMENTO PROVENIENTE DE UNA CAJA DE UNICEL INICIALMENTE INFECTADA Y DESPUES DESINFECTADA.

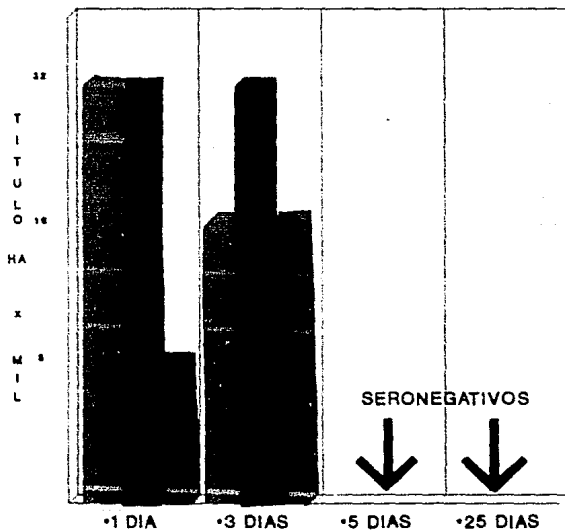
EXPERIMENTO CAJA DESINFECTADA (24 HORAS) Conejo Utilizado *	DIAS QUE TRANSCURRIERON ENTRE FECHA DE INFECCION Y FECHA DE MUERTE.	PRUEBA IHA
(No.)		
42	SV	SN
43	SV	SN
44	SV	SN

* Todos los conejos fueron negativos a anticuerpos contra ERVC,
al inicio del experimento.

SV = SOBREVIVIENTE

SN = SERONEGATIVO

GRAFICA 5.-Comparación de los títulos de HA e IHA detectados en los hígados de los conejos alimentados con alimento balanceado comercial previamente infectado por medio de ratas contaminadas con virus de la EHVC.



■ CONEJO 1 ■ CONEJO 2 ■ CONEJO 3

-Tiempo que transcurrió desde el día en que el alimento fué contaminado por las ratas y el día en que fué ofrecido a los conejos.

C U R R E N O N O. 6

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE HA, IHA e IFID OBTENIDOS DE CORTES Y MACERADOS DE HIGADOS QUE SE EXTRAJERON DE CONEJOS A LOS QUE SE LES OFRECIO ALIMENTO CONTAMINADO POR MEDIO DE RATAS PREVIAMENTE ALIMENTADAS CON HIGADOS DE CONEJOS QUE CONTENIAN VIRUS DE LA EHVC.

EXPERIMENTO CON RATAS ALIMENTADAS 24 HORAS ANTES DE QUE CONTAMINARAN EL ALIMENTO DE LOS CONEJOS. Conejo utilizado (No.)	DIAS TRANSCURRIDOS ENTRE INFECCION Y MUERTE.	PRUEBA HA (POR MIL)	PRUEBA IHA	PRUEBA IFID
45	4	1:32	SN	**
46	4	1:32	SN	+
47	4	1:8	SN	**
** 48	21		1:128	-
** SOBREVIVIENTE SACRIFICADO.				
RATAS (3 DIAS)				
49	3	1:16	SN	+++
50	3	1:32	SN	-
51	4	1:16	SN	+++
RATAS (5 DIAS)				
52	SV	-	SN	-
53	SV	-	SN	-
54	SV	-	SN	-
55	SV	-	SN	-
RATAS (15 DIAS)				
56	SV	-	SN	-
57	SV	-	SN	-
58	SV	-	SN	-

SV = SOBREVIVIENTES

SN = SERONEGATIVOS

+++ = NEGATIVOS

* Todos los conejos fueron negativos a anticuerpos contra EHVC, al inicio del experimento.

D I S C U S I Ó N

Las pruebas serológicas de IHA demostraron que los conejos empleados en esta investigación no habían estado en contacto con el virus de la EHVC.

ALFALFA.- En el primero de los experimentos en el que la alfalfa contaminada, se dió como alimento, sin ningún procesamiento, la mortalidad alcanzada fue del 100 %; estos resultados se esperaban debido a que se tenían antecedentes de las características del virus de la EHVC, una de las cuales es la carencia de envoltura lo cual los hace resistentes al medio ambiente por largos periodos, tal como sucede con los Parvovirus, Picornavirus y Calicivirus (37,41).

En los 3 restantes experimentos, en los que la alfalfa se sometió a un proceso de achicalamiento, se esperaba que las radiaciones del sol aunadas a la deshidratación que sufrió la alfalfa, produjeran una inactivación letal sobre el virus (40), ya que los virus antes mencionados son altamente susceptibles a las radiaciones solares por el hecho de poseer un filamento unico de ácido nucleico (37).

Sin embargo, el virus, resistió este tratamiento y el almacenaje, detectándose aun infectante hasta los 45 días, como puede observarse en la gráfica 1.

Una posible explicación a este fenómeno sería que las partículas virales se hayan filtrado entre los tejidos vegetales, utilizando la proteína contenida en estos, como barrera protectora ante el medio ambiente.

ALIMENTO BALANCEADO COMERCIAL. - Como se observó en los resultados, en condiciones medio ambientales, el agente etiológico permaneció infectante por un periodo de 30 días en el alimento almacenado, produciendo una morbilidad y letalidad del 100 %.

Esta resistencia al medio, su infectividad por largos periodos y la alta mortalidad que produce en los animales expuestos, se asemejan a las características observadas en la Enteritis Hemorrágica Viral Canina, enfermedad producida por un virus de la familia Parvoviridae, a diferencia de las enfermedades producidas por los virus de las familias Picornaviridae, en la mayoría de las cuales la mortalidad que se produce es baja; excepto en la hepatitis viral de los patos (25.42).

Estudios anteriores mencionan que el agente etiológico de la EHVC es estable a 50 °C durante 60 minutos (18, 20, 44). Sin embargo, al someter el alimento infectado a una temperatura de 80 °C durante 3 minutos con el virus potencialmente activo, se observó que éste perdió su capacidad infectante, ya que la mortalidad de los animales a los que se les ofreció el alimento fue de 0 %. Cabe hacer notar que se esperaba una respuesta inmune en los animales expuestos, sin embargo, esto no sucedió ya que al efectuar la prueba de IHA se verificó la ausencia de anticuerpos.

COSTALES. - Al comparar los resultados obtenidos en los experimentos de los costales desinfectados y no desinfectados (Cuadros 3 y 4), se observó, al contrario de lo que se esperaba, que los títulos virales (HA), en los hígados de los animales a los que se les dio alimento proveniente de los costales desinfectados, fueron mayores que los que resultaron al utilizar los costales infectados.

En lo primero que se especuló fue en una falla en el desinfectante o en el procedimiento de desinfección, una segunda opción sería que una vez que se desinfectaron los costales haya pasado el virus de la superficie del costal al comprimido alimenticio por la facilidad de filtración que permite el material con que se empaacan.

La primera alternativa quedó descartada una vez que, realizado un cuarto experimento, en lugar de un costal se utilizó para guardar el alimento una caja hermética, siguiendo la misma técnica para su desinfección que en los costales. Se observó que no hubo mortalidad en este grupo de conejos y después de 15 días se sangraron los conejos para realizarles la prueba de IHA, para detectar anticuerpos, a la cual salieron negativos.

En lo que respecta a la segunda opción la posible respuesta a este fenómeno, sería el hecho de que el material con el que se elaboran los costales permite la filtración de líquidos por lo que se sospecha que al contaminar y desinfectar posteriormente los costales se haya filtrado una mayor cantidad de virus al interior del comprimido la cual se protegió del formal debido a que este no actúa profundamente sobre la materia orgánica (30, 35).

RATAS. - En este experimento se observó que las ratas solo actuaron como un vehículo mecánico de transmisión de la EHVC, ya que se constató que después del tercer día de contaminadas son incapaces de transmitir la infección a los conejos por medio del alimento, del cual se alimentaron y en el que caminaron.

CONCLUSIONES

Los estudios aquí realizados indican que la alfalfa, alimento balanceado comercial y las ratas, al contaminarse con material orgánico que contenga virus de la EHVC, son capaces de servir como vehículos en la transmisión de esta enfermedad; por más de 30 días, en condiciones medio ambientales, en el caso de la alfalfa y del alimento comercial; y por 3 días en el caso de las ratas, las cuales solo funcionan como vectores.

Se observó que el proceso de achicalamiento de la alfalfa y su almacenaje hasta un mes, no son capaces de inactivar al virus de la EHVC, debido a las características propias de este virus.

Por otro lado, el tratamiento a una temperatura de 80 °C por 3 minutos a la cual se sometieron los ingredientes, para la elaboración del alimento balanceado comercial, resultó eficaz para la inactivación del virus de la EHVC.

En la presente investigación pudo observarse que llevando a cabo medidas de bioseguridad, estas contribuyeron a eliminar totalmente la posibilidad de que el agente patógeno (que se considera altamente infectante), entrara en contacto con los conejos centinelas y con los animales sanos recibidos periódicamente para ser utilizados en los experimentos conforme se fueron realizando. Los cuales estaban localizados en los pasillos de toda la unidad de alta seguridad y en las unidades de aislamiento, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Arguello Villares, J. L.; Llanos Pellitero, A.; Pérez Ordollo, J.L.: Contribución al estudio de la Enfermedad Virica hemorrágica del conejo. Servicio Técnico de laboratorios Ovejeros. A. León pp. 58-60 España (1988).
- 2.- Arguello Villares, J.L.; Llanos Pellitero, A.; Pérez Ordoyo; García, J.I.: Medicina Veterinaria. Enfermedad Virica de los Conejos en España. Servicio Técnico Laboratorios Ovejeros, S.A.; 5(12) (1983)
- 3.- Asociación Española de Cuniculturas Informe de la Asociación Española de Cunicultura sobre la llamada "Enfermedad Virica Hemorrágica del Conejo". Asociación Española de Cunicultura. España (1989).
- 4.- Bellanti Joseph. A.: Manual de Prácticas de Inmunología. Ed. Interamericana 3era. ed., México, D.F., (1980).
- 5.- Berson, M.C.; Dermott, Cecil-Loed. Ed. Interamericana, Tomo 1, México, D.F., (1979)
- 6.- Blood, D.C.; Rodostist, O.M.; Henderson, J.A.; Arandel, J.H.; Gay, C.C.: Medicina Veterinaria. Ed. Interamericana. 5a. ed. pp:331. México (1986).
- 7.- Buonovoglia, C.; Di Trani.: Instituto Superiore di Sanità Roma Da "Selezione Veterinaria" Sui recenti episodi di mortalità nei conigli in Italia, octubre (1988)
- 8.- Buonoglia, C.; Trani Di, L.; Pasquale Di, R.; Trinari, A.; Ruggeri, F.M.; Galassi, Di.: Sui Recenti Episodi di mortalità nei conegli in Italia (Nota preliminar). Sel. Vet. XXIX (19):1509-1510 (1988).
- 9.- Campomanes C., A.: Operación del Sistema Nacional de Emergencia de Salud Animal de México para la erradicación del brote de la Enfermedad Hemorrágica de los Conejos. (CPA), (1989).

- 10.- Cancelotti, F.M.; Renzi, M.; Vecchi, G.; Villareni C.: Considerazioni derivati da esperienze naturale nel curso di focali di Malattia Hemorragica Virale nell, Italia del Nort. Instituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Padova (1988).
- 11.- Cao, S.Z.; Liu, S.G.; Gan, M.H.; Liu, R.P.; Cai, S.; Liu S.F.: A preliminary report on viral haemorrhagic pneumonia (tentative name) in rabbits Chinese. Journal of Veterinary Medicine. 12 (4): 9-11 (1986).
- 12.- Chao L., G.L.; Chail, L.: Contribution al estudie de la Pneumonia Hemorragique virale du Lapin. Chin Jour. Vet. Med. 12: 9-11(1988).
- 13.- Ciprian C., A.; Colmenares, G.; Mendoza, S.; Gonzalez G., S.; Tortora, J.; Hernández B., E.: Hepatitis Hemorragica de los Conejos. Informe experimental realizado por el Departamento de Epizootiologia del CENID, Microbiologia del INIFAP y los departamentos de Virologia y Patologia el de Microscópio y Microscopia Electrónica de la Coordinación General de Investigación y Estudios de Posgrado de la FES-Cuautitlan, UNAM. (1989).
- 14.- Ciprian C., A.; Colmenares V., G.; Mendoza E., S.; Hernández B., E.: Descripción de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Memoria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. Mexico. (1989)
- 15.- Comisión Mexico-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales. (C.P.A.): Enfermedad Hemorragica Viral de los Conejos. Boletín Extra de la CPA México (1989).

- 16.- Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales. (C.P.A.): Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos. Boletín Informativo. C.P.A. México (1989).
- 17.- C.P.A.: Brote de la Enfermedad Hepática-Respiratoria en Conejos del Valle de México (Boletín Informativo) (1989).
- 18.- C.P.A.: Nota Informativa (1989)
- 19.- C.P.A.: Operación del Sistema Nacional de Emergencia en Salud Animal (SINESA) de México para la erradicación del Brote de la Enfermedad Hemorrágica de los Conejos (EHVC). Boletín C.P.A. Vol. 2 (2):4-12 (1989).
- 20.- Contera, C.: La Nueva Enfermedad Hemorrágica del Conejo. Enfermedad Virica Hemorrágica del Conejo en España. Gallina Blanca Purina; pp.3-12. España (1989).
- 21.- Contera, C.; Verona y Valencia: Cumbres Técnicas Internacionales acerca de la Enfermedad Virica Hemorrágica del Conejo. Gallina Blanca Purina. España (1989).
- 22.- Correa Girón, Pablo: Enfermedades Virales de los Animales Domésticos (Monogástricos) Vol. 1, 4a. ed.; México (1981).
- 23.- Cunningham Charles, H.A.: Laboratory Guide in Virology Publishing. Company.
- 24.- Diaro Oficial.: Poder Ejecutivo SARH; 21 de febrero (1989).
- 25.- Dorsey William Bruner, B. S., D. V. M., Ph. D.; James Howar Gillespie, V. M. D.: Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Ed. Prensa Médica Mexicana. 3era. ed., México, (1977).
- 26.- Dirección General de Fomento y Protección Pecuaria: Información Oficial sobre el Síndrome Neumo-Hepático en Conejos. Dirección General de Fomento y Protección Pecuaria. México (1989).
- 27.- Facchin, E.: La Maladie X des Lapins. Cuniculture No. 84, 15 (6): 275-276. (1988).

28. - Flores H., A.: Campaña contra la Enfermedad Hemorrágica de los Conejos; Boletín No. 3. SARH-SINESA.; México. Diciembre (1989).
29. - Fraire C., M.; Hamdy, F.; Saldivar Z., E.; Gay G., M.: Determinación de Animales Portadores del Virus de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). Memorias. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. SARH-UNAM. pp.90 (1989).
30. - Gay G., M.: Bioseguridad de las Explotaciones Pecuarias Programa de Acreditación de Médicos Veterinarios Zootecnistas. SARH-UNAM. (1989).
31. - Gay G., M.; Hamdy M., P.: Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación con Microtécnica con muestras de sangre obtenidas con un papel filtro para el serodiagnóstico de la EHVC. Memorias. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, SARH-UNAM. pp. 89 (1989).
32. - Gay G., M.; Zamora R., H.; Hamdy M., I.: Determinación del estado de portador en sobrevivientes 2 meses después de un brote de la EHVC. Memorias. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, SARH-UNAM. pp. 88 (1989).
33. - Gregg, D.; House, C.: Necrotic Hepatitis of Rabbits a fatal new parvoviral disease of rabbit. In press, (1990).
34. - Gregg, D.; Wilson, T.; House, C.: Necrotic Hepatitis of Rabbits. A Parvovirus. Foreign Animal Disease Report. 17 (2): 7-10 (1989).
35. - Higiene y Patologías: La enfermedad "X" del conejo en Italia, Conagliocultura 25:8-11 (1988).
36. - Koprowsky, H.: The mouse inoculation test In Laboratory Techniques in Rabies. 3era. ed., Ed. by Kaplan, M., N., Koprowsky, H., Genova (1973).

- 37.- Kotsche, W.: Enfermedades del Conejo y la Liebre. Ed. Acribia. Zaragoza, España (1974).
- 38.- Lee, C.S.; Park, C.K.: A etiological studies on an acute fatal disease of Angora rabbits; so-called Rabbit Viral Sudden Death, Koren. Journal of Veterinary Research 27 (2): 277-290 (1987).
- 39.- Lennette, E.H., M.D., Ph. D.: Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Disease. Editor Nathalie J. Schmidt Ph. O., Editor American Public Health Associate, Inc. 3ra. edition New York (1964).
- 40.- Maldonado Hernandez, A.; Coba Ayala, M.A.; Anaya Escalera, A.M.; Correa Girón, P.; Fraire Chacón, M.: Inmunesupresión de conejos criollos, sobrevivientes de una granja previamente afectada por el virus de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). Memorias. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, CENID-M., INIFAP., SARH., pp. 116-118 (1990).
- 41.- Maldonado Hernández, A.; Coba Anaya, M.A.; Anaya Escalera, A.M.; Correa Girón, P.; Fraire Chacón, M.; González, D.; Monroy B., J.; Batalla C., D.: Estudio Preliminar de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos. Anais da 12^a. Reunião da Associação Latino-Americana de Produção Animal. Brasil (1990).
- 42.- Mohanty S., B.; Dutta S., K.: Virología Veterinaria. Nueva Editorial Interamericana. 1ra. ed. México (1983).
- 43.- Morisse J., P.: Le syndrome "Septicémie Hémostatique" chez le lapin. Premières observations en France. Le point Veterinaire, 20: 70-83 (1988).
- 44.- Morisse J., P.; Lavezza, A.: A Viral Hemorrhagic Disease (VHD) of rabbits. Commission for the Control of FMD and other disease. Vol. 2 (3); 5-7 (1980).
- 45.- Nelson Vaughan, Mc. Kay: Tratado de Pediatría. Ed. Salvat. Tomo I. México, D.F., (1981).

- 46.- Organización Mundial de Epizootias (O.I.E.): Viral Hemorrhagic disease (VHD) of rabbits 2 (3) 20, Junary (1989).
- 47.- Pages Mante, A.: Aspectos epidemiológicos y laboratoriales de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo (RHD) en España. Laboratorios HIPRA S.A., pp. 11-16. España (1989).
- 48.- Plana, D.J.; Voyreda, M.; Bostons M.; Vilá, X.: Calicivirus. Firme candidato como agente inductor de la Enfermedad Virica Hemorrágica del Conejo. Laboratorio Sobrino, S.A. pp. 1-5. España (1989).
- 49.- Programa de adiestramiento en Salud Animal para América Latina. Organización Panamericana de la Salud; Organización Mundial de la Salud Banco Interamericano de Desarrollo. 3,
- 50.- Pu, B.Q.; Qulan, N.H.; Cui, S.J.: Micro H.A. and H.I. test for the detection of antibody titres to so-called Haemorrhagic pneumonia in rabbits Chinese. Journal of Veterinary Medicine, 11 (10): 16-17 (1985).
- 51.- Review, A.: Viral Haemorrhagic Disease in Rabbits. Veterinary Reserach Communications. 13, (3) 205-212. (1989).
- 52.- Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH); Sistema Nacional de Emergencia en Salud Animal (SINESA): Operación del Sistema Nacional e Emergencia en Salud Animal en México para la erradicación del brote de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC) SINESA y SARH. México (1988).
- 53.- Xu, F.N.; Shen, W.P.; Liu, S.J.: Study of the etiology of Viral Haemorrhagic Disease in Rabbits. Animal Hus banary and Veterinary Medicine. 7 (4): 153-155 (1985).

- 54.- Xu, W.; Du, M.; Liu, S.: A new virus isolates from haemorrhagic disease in rabbits, 4th. World Rabbits Congress. pp. 456-462. Budapest (1989).
- 55.- Xu, Z.J.; Chen, W.X.: Viral Haemorrhagic Disease in Rabbits: A review veterinary Research Communications (13): 205-212 (1989).