

01664 2
Rj



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**INFLUENZA AVIAR: DIAGNÓSTICO POR TRANSCRIPCIÓN
REVERSA-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-
PCR) E HISTOPATOLOGÍA EN AVES INFECTADAS
EXPERIMENTALMENTE**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS:
PATOLOGÍA**

PRESENTA:

MVZ ROBERTO PADILLA NORIEGA



ASESORES: M.C. ENRIQUE ABURTO FERNÁNDEZ
MVZ MOISÉS FRAIRE CACHÓN
DR. LUIS PADILLA NORIEGA

MÉXICO, D.F.

1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORICEN**



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.

Con todo mi amor a mis hijas: Anadelfina y Laura

A mi esposa por su amor y comprensión con mis estudios de posgrado

A mi madre por su cariño, amor, dedicación, comprensión y apoyo para mi formación

A mi padre in memoriam

A mis hermanos:

Carlos, Antonio, Manuel, Jorge, Francisco, Ana Maria, Luis y Juan por su apoyo

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Nuria de Buen, jefa del departamento de Patología de la Fac. De Med. Vet. Y Zoot. de la UNAM, por su confianza, su gran sensibilidad y calidad humana para impulsar, estimular y ayudarme en mi formación como patólogo.

Agradezco al Dr. Carlos Arias, del Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos, las facilidades que otorgó para llevar a cabo los estudios de RT-PCR en el laboratorio que dirige.

Al Dr. Moisés Fraire Cachón del Laboratorio de Alta Seguridad de la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Agradezco a los Químicos Paul Gaytan y Eugenio López de la Unidad de Síntesis Química de Macromoléculas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos, las síntesis de los oligonucleótidos empleados en este estudio.

Agradezco al Técnico Luis Morales Arreola que proceso los tejidos a cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina y la obtención de las secciones para RT-PCR.

A Guadalupe Juárez Jiménez que apoyó el trabajo con tinciones especiales para corroborar los hallazgos de hematoxilina-eosina.

Al MVZ Pedro Paz Ramírez por su ayuda desinteresada en el trabajo realizado el laboratorio de alta seguridad.

Al Biólogo Pedro Romero Guido por su ayuda desinteresada en la técnica de RT-PCR y técnicas colaterales.

A la Técnica en Microscopía Electrónica María de la Luz Rosales Montaña por el procesamiento de muestras de Sistema Nervioso Central para identificación de estructuras citoplásmicas neuronales.

Al Dr. Jorge Lecumberri López por la revisión del análisis estadístico.

A la Universidad Autónoma de Nayarit por el apoyo brindado para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIAL Y MÉTODOS	14
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	35
LITERATURA CITADA	40
CUADROS	48
FIGURAS	52
ANEXOS	64

RESUMEN

MVZ Padilla Noriega Roberto. Influenza aviar: Diagnóstico por transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) e histopatología en aves infectadas experimentalmente. Bajo la dirección de MC Enrique Aburto Fernández, MVZ Moisés Fraire Cachón y Dr. Luis Padilla Noriega.

Aunque los virus de influenza aviar se encuentran ampliamente distribuidos a través del mundo, los reportes por virus altamente virulentos son esporádicos, como el caso de México (1994-95). La patogenia de esta enfermedad no está del todo esclarecida y los estudios histopatológicos están limitados principalmente a aquellas condiciones graves con virus altamente virulentos de otros países. El objetivo de este estudio fue establecer la técnica de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para el diagnóstico de influenza aviar de tejidos incluidos en parafina de aves infectadas experimentalmente, y correlacionarlo con las características histopatológicas. Ocho lotes de 10 pollos Arbor Acres de 5 semanas de edad se inocularon por vía endovenosa, con 10^1 a 10^8 dosis letales de pollo del 50% (DLP₅₀) del virus de influenza aviar A/Ck/Querétaro/20/95 (H5N2). Todas las aves se sometieron a estudio histopatológico general y una ave por dosis a diagnóstico por RT-PCR en tres tipos de tejidos incluidos en parafina, pulmón, sistema nervioso central y riñón. Las principales lesiones histopatológicas observadas en las aves infectadas, incluyeron: destrucción del tejido linfoide, vasculitis, necrosis tubular aguda, encefalitis no supurativa y en general áreas focales o multifocales de necrosis en los órganos estudiados. Las principales diferencias con otras cepas altamente virulentas fueron: mayor frecuencia de daño vascular, nefropatogenicidad, necrosis en islotes pancreáticos y destrucción extensa y grave del tejido linfoide. El conjunto de éstos hallazgos le confieren a la cepa bajo estudio características propias distintivas. Se detectó la presencia del virus de influenza con la técnica de RT-PCR en pulmón, independientemente de la dosis, y en sistema nervioso central y riñón en 7 de las 8 dosis empleadas, lo cual es indicativo de que el virus se replica en estos tejidos, y los cambios patológicos observados pueden ser atribuidos a la replicación viral, sin excluir la participación de otros mecanismos de daño celular. En este estudio se demostró que la técnica de RT-PCR es aplicable a tejidos incluidos en parafina, lo cual abre la posibilidad de hacer estudios retrospectivos, en los que potencialmente se podría inclusive identificar a la cepa infectante por secuenciación de ácidos nucleicos.

Palabras clave: Influenza aviar, histopatología, RT-PCR.

SUMMARY

Avian influenza viruses are distributed throughout the world with sporadic outbreaks of highly virulent viruses in chickens, like the 1994-1995 outbreak in Mexico. The pathogenesis of the disease is not clear, and histopathological studies have been limited to the highly virulent strains from abroad. The aim of this study was to establish a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the diagnosis of avian influenza virus in paraffin embedded tissues, and to correlate viral detection by this method with the histopathologic changes. Eight groups of 10 Arbor Acres chickens were inoculated intravenously with 10^1 to 10^8 50% chicken lethal doses of A/Ck/Querétaro/20/95 (H5N2) influenza virus. All of the chickens were subjected to a general histopathologic study, and one chicken per dose to RT-PCR diagnosis on paraffin embedded sections of lung, central nervous system, and kidney. The main histopathologic lesions observed in infected birds were: destruction of lymphoid tissue, vasculitis, acute renal tubular necrosis, non suppurative encephalitis, and focal or multifocal necrosis in all of the organs studied. The main differences with another highly virulent strains were: greater frequency on vascular injury, nephropathogenicity, pancreatic islet necrosis, and severe and extensive destruction of lymphoid tissue. The histopathologic changes found in the affected tissues collectively constitute a distinctive feature of the strain under study. By RT-PCR influenza virus was detected in lung, independently of the viral dose, and in central nervous system and kidney in 7 of 8 doses used. These results are indicative of virus replication in all three organs studied, hence the pathologic changes can be attributed to virus replication, without excluding other mechanisms of cell injury. In addition we proved that RT-PCR is applicable to the diagnosis of influenza virus in paraffin embedded tissues, making it possible to perform retrospective studies, where the particular viral strain involved could possibly be identified by nucleic acid sequencing.

I. INTRODUCCIÓN

DEFINICIÓN

La influenza aviar, anteriormente denominada peste de las aves, es una enfermedad de etiología viral de las aves domésticas y silvestres, y su forma de presentación varía, desde la infección subclínica, enfermedad respiratoria leve, pérdida aguda de la producción de huevo, hasta una enfermedad generalizada fatal (8, 12, 36).

IMPORTANCIA ECONÓMICA

En las distintas especies domésticas, los virus de influenza han causado considerables pérdidas económicas (12, 13, 55), los altamente virulentos por sí mismos (8); y los de baja virulencia porque predisponen y exacerbaban otros problemas infecciosos propios de cada granja (31).

ETIOLOGÍA

Los virus de influenza constituyen la familia *Orthomixoviridae*. Estos virus son envueltos, de tamaño medio, con un diámetro de 80 a 120 nm, genoma de ácido ribonucleico (ARN) pleomórfico con simetría helicoidal, y proyecciones glucoproteicas en la superficie que tienen actividad de hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N). Existen tres tipos, A, B y C, definidos por la naturaleza antigénica de la nucleoproteína (NP), que está íntimamente asociada con el ARN, y el antígeno de la matriz (M), que recubre la parte interna de la envoltura lipídica viral. Las pruebas que se utilizan para diferenciar a los distintos grupos son prueba de fijación de complemento o de inmunodifusión doble. Los tipos A y B tienen un genoma de 8 segmentos y el tipo C de 7 segmentos de ARN de cadena sencilla y polaridad negativa, es decir, complementaria al ARN mensajero. Otro miembro de la familia, los tipos D, son virus transmitidos por garrapatas (Dhori y Thogoto), estructural y genéticamente similares a los virus de influenza (14, 36).

El influenzavirus tipo A, responsable de la influenza aviar, se encuentra en muchas especies aviares, así como; humanos, cerdos, caballos y ocasionalmente otros mamíferos tales como el visón, focas y ballenas (8, 12). El tipo B sólo infecta a los humanos y el C a humanos y cerdos (Baine *et al.*, citados por Murphy y Webster (36)).

Los virus de influenza tipo A son divididos en subtipos de acuerdo a la naturaleza antigénica de las Hs y Ns, identificadas con base en su reactividad en pruebas de inmunodifusión doble (56). Se reconocen actualmente 15 Hs y 9 Ns distintas (40). A la fecha, los subtipos altamente virulentos para pollos de engorda y gallinas de postura son el H5 y H7. Sin embargo, no todos los virus subtipo H5 y H7 son patógenos (8, 11, 36).

REPLICACIÓN VIRAL

Para la replicación viral, los virus adsorbidos a los receptores glucoproteicos en la superficie celular, aún no identificados para el virus de influenza (12), entran a la célula por endocitosis mediada por receptores. La liberación del complejo ribonucleoproteico viral en el citoplasma ocurre seguido de la internalización del virus en endosomas celulares, donde condiciones moderadamente ácidas (pH 5) inducen la fusión de la membrana viral y celular. La nucleocápside así entra al citoplasma y migra después al núcleo. El virus de influenza utiliza un mecanismo único para iniciar la transcripción en que una endonucleasa viral corta el extremo 5' de los ARNm celulares y los utiliza como iniciadores para la síntesis de las ARN virales por la transcriptasa viral. Se producen seis ARNm monocistrónicos y éstos son traducidos en la H, N, NP, y las tres polimerasas (PB1, PB2 y PA). Los ARN genómicos de los genes NS y M presentan dos marcos de lectura empalmados, cada uno capaz de producir ARNm, los cuales son traducidos para producir las proteínas NS₁, NS₂, M₁ y M₂. La H y N son glucosiladas en el retículo endoplásmico rugoso, maduras en el aparato de Golgi y transportadas a la superficie donde quedan insertadas en la membrana celular. Después de la producción y ensamble de las proteínas virales que forman la nucleocápside y el ARN, el virus sale de la célula por gemación de la membrana plasmática. Finalmente, para que el virus sea infeccioso la H debe ser cortada

por las proteasas de las células huésped en HA₁ (36 KDa) y HA₂ (27 KDa), las que quedan unidas por enlaces disulfuro (12, 36).

VIRULENCIA

La virulencia en los virus de Influenza es de carácter poligénico donde la H juega un papel central en la patogenicidad de los virus de influenza aviar. La H de los subtipos H5 o H7 virulentos es rápidamente cortada en cultivo celular y no requiere una proteasa exógena para la formación de placas (36). Se ha demostrado que el número de aminoácidos básicos en el sitio de corte y la presencia o ausencia de un carbohidrato cercano afecta el corte de la H. El requerimiento de secuencia mínima para el corte de la hemaglutinina H5 por proteasas intracelulares (furina ó PC6)(25) es R/K-X-R/K-R (X = aminoácido no básico) en la ausencia de una cadena lateral de carbohidrato. En presencia de carbohidrato se requiere al menos de la inserción de dos aminoácidos (X-X-R/K-X-R/K-R) o aminoácidos básicos extras precediendo el sitio de corte [B (X)-X(B)-R/K-X-R/K-R] (B = aminoácidos básicos) (24).

SITUACIONES DE CAMPO

Bajo condiciones de campo hay casos en las cuales los virus de influenza producen marcada morbilidad y mortalidad en las parvadas, no así en aves inoculadas experimentalmente. Estudios por Tashiro y col. (50) han sugerido que las infecciones bacterianas concurrentes juegan un papel importante en la enfermedad relacionada con los virus de influenza de baja y moderada virulencia. Esto podría ocurrir porque bacterias como *Staphylococcus aureus* proveen proteasas capaces de cortar la H de los virus de influenza de baja y moderada virulencia, lo cual permite replicarse y diseminarse ampliamente en ese huésped.

DISTRIBUCIÓN

Los virus de influenza aviar se encuentran ampliamente distribuidos a través del mundo. Sin embargo, los reportes de la enfermedad causada por virus altamente virulentos son esporádicos.

Los brotes comprobados desde 1975 incluyen: Australia (1975, 1985), Inglaterra (1979), EUA (1983-84), e Irlanda (1983-84) (8, 12). En México, el 23 de mayo de 1994 se notificó oficialmente la presencia del virus de la Influenza Aviar de baja virulencia (11, 17) y en diciembre del mismo año se aisló en Tehuacán, Puebla y posteriormente en Querétaro un virus de Influenza aviar de alta virulencia. Los diferentes aislamientos del virus epizoótico correspondieron al subtipo H5N2 (11). En estudios retrospectivos se demostró que a finales de 1993 se presentaron problemas respiratorios (15), disminución de la producción de huevo y aumento de la mortalidad (16), en asociación a evidencia serológica del virus de Influenza Aviar (6, 26).

PATOGENIA

La patogenia de la enfermedad no está totalmente esclarecida. Se sabe que es diferente a la influenza de los mamíferos, ya que los virus se replican en el tracto intestinal así como en el respiratorio. En infecciones con cepas virulentas de influenza ocurre viremia, lo cual deriva en una infección generalizada. Pueden ocurrir lesiones hemorrágicas en órganos viscerales así como en cresta y barbillas de pollo y pavos. La influenza aviar es frecuentemente complicada por infecciones bacterianas o virales oportunistas (14).

Las aves infectadas excretan el virus del tracto respiratorio, conjuntiva e intestino (8, 12), para contagiar a las aves susceptibles por contacto directo, o bien, en forma indirecta por material contaminado, en especial con heces, que es donde existen grandes cantidades del virus (36). Rutas experimentales para la infección incluyen administración en aerosol, intranasal, intrasínusal, intratraqueal, oral, conjuntival, intramuscular, intraperitoneal, sacos aéreos caudales, intravenoso, cloacal e intracraneal (12).

El período de incubación para enfermedades causadas por estos virus varía de unas pocas horas hasta 3 días; lo cual es dependiente de la dosis del virus, ruta de exposición y las especies expuestas (8, 12).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los signos de la enfermedad son extremadamente variables y dependen de: especies afectadas, edad, sexo, infecciones concurrentes, características genéticas del virus, factores ambientales, etc. Los animales afectados pueden manifestar alteraciones del aparato respiratorio, digestivo, reproductor o del sistema nervioso. Los signos más comúnmente reportados incluyen disminución de la actividad y consumo de alimento, emaciación; y disminución de la producción de huevo; signos respiratorios discretos a graves, como tos, estornudos, estertores y excesivo lagrimeo; amontonamiento; plumas erizadas; edema de cabeza y cara; cianosis de la piel en áreas sin plumas; desordenes nerviosos; y diarrea. Estos signos pueden ocurrir aislados o en varias combinaciones (6, 12).

En algunos casos, la enfermedad es fulminante y las aves mueren sin signos previos. Los virus que son idénticos antigénicamente pueden tener características biológicas completamente diferentes, lo que da lugar a una enfermedad grave en una especie dada, mientras que en otra (pollo, pavo, pato, codorniz) puede originar una infección inaparente (2).

LESIONES MACROSCÓPICAS

Las lesiones macroscópicas observadas varían considerablemente en función de su localización y gravedad. En enfermedades leves hay pocas lesiones notables; en los senos, puede observarse sinusitis catarral, fibrinosa, serofibrinosa, mucopurulenta o caseosa; en mucosa traqueal, edema con exudado que varía de seroso a caseoso; en los sacos aéreos, engrosamiento con exudado fibrinoso o caseoso; en peritoneo, peritonitis fibrinosa y "peritonitis de huevo"; en el ciego y/o intestino, enteritis catarral o fibrinosa, especialmente en pavos y exudados en los oviductos de aves de postura (6, 12, 21).

En los casos de virus altamente virulentos, puede no haber lesiones prominentes porque las aves mueren antes que las lesiones macroscópicas se desarrollen. Sin embargo, se ha descrito congestión, hemorragias, trasudados y necrosis. Los cambios iniciales incluyen edema de la

cabeza con sinusitis; barbillas y cresta cianóticas, congestionadas y hemorrágicas (1, 7, 21); focos de necrosis en hígado, bazo, riñones y pulmones (28). Los brotes de Pennsylvania de influenza aviar de alta virulencia en el año de 1983-84 se caracterizron por hinchazón grave de la cresta y barbillas, con edema periorbital; en barbillas, desde vesículas a tumefacción grave, cianosis, equimosis y necrosis franca. Algunos veces hubo hinchazón de patas y manchado equimótico. En vísceras; hemorragias petequiales de superficies serosas y mucosas, particularmente la superficie mucosa del proventrículo cerca de la unión con el ventrículo; en páncreas, manchas amarillo brillante y áreas rojo oscuras a todo lo largo. Otras presentaban sólo deshidratación (1, 13). Los pollos infectados con el virus pavo/Ontario/7732/66 (H5N9) presentaron necrosis severa de tejido linfoide, apreciado macroscópicamente por la apariencia moteada del bazo (53).

LESIONES MICROSCÓPICAS

Las descripciones histopatológicas de infecciones de influenza aviar se han limitado primariamente a aquellas condiciones con enfermedad grave y cambios macroscópicos evidentes, causados por virus altamente virulentos (12). La peste de las aves se caracterizó por edema, hiperemia, hemorragias, infiltrado perivascular principalmente en miocardio, bazo, pulmones, cerebro, barbillas y en menos extensión en hígado y riñones. La degeneración del parénquima estuvieron presentes en bazo, hígado y riñones (Gerlach y Michalka, citados por Easterday y Himshaw (12). Las lesiones en cerebro incluyeron focos de necrosis, manguitos linfoides perivascuales, focos gliales, proliferación vascular y cambios neuronales (12). Los pollos muertos por la inoculación intravenosa del virus de la plaga de las aves presentaron edema de amplia distribución, hiperemia y hemorragia, y también focos de necrosis en el bazo, hígado, pulmones, riñones, intestino y páncreas en orden decreciente de frecuencia (28). En el brote de Pennsylvania se describen en diferentes grados de afección: una encefalitis difusa no supurativa, pancreatitis necrótica difusa, y miositis subaguda necrótica de los músculos esqueléticos, en especial, de miembros y oculares externos. Esto fue más grave en pollo de engorda que en gallinas ponedoras (1).

DIAGNÓSTICO

Un diagnóstico definitivo de la infección con el virus de la influenza A es dependiente del aislamiento e identificación del virus, ya que los signos clínicos pueden variar dramáticamente, por lo que el diagnóstico clínico es considerado presuntivo (8, 12).

Los virus se aíslan comúnmente de la tráquea y/o cloaca ya sea de aves vivas o muertas, ya que éstos se replican típicamente en el tracto respiratorio o intestinal. Los casos de infecciones sistémicas producidas por virus altamente virulentos se caracterizan por altos niveles de viremia y replicación en la mayoría de los órganos (12).

Para el aislamiento comúnmente se inoculan por vía cavidad alantoidea, huevos embrionados de pollo de 10-11 días de edad, ya que los virus de influenza se replican muy bien en ellos (10).

Es importante determinar si la actividad hemaglutinante detectada en el fluido alantoideo es debido al virus de influenza u otros virus hemaglutinantes, como es el caso del paramixovirus de la enfermedad de Newcastle. Así, el aislamiento es probado a través de la inhibición de la hemaglutinación (IH) contra antisuero de la enfermedad de Newcastle. Si es negativo, se prueba para la presencia de la NP del tipo A para establecer que el virus de influenza A está presente (12, 17).

El siguiente paso en el procedimiento de identificación es determinar el subtipo antigénico de los antígenos superficiales, H y N. La H se identifica en la prueba de IH con el empleo de un panel de antisueros preparados contra las quince diferentes hemaglutininas. El subtipo N es usualmente identificado por pruebas de inhibición de la neuraminidasa (IN) con antisueros probados contra las nueve neuraminidasas (10).

Las pruebas serológicas se utilizan para demostrar la presencia de anticuerpos a partir de los 7 a 10 días después de la infección. Se usan varias técnicas para el diagnóstico y seroepidemiología. Las más comunes son la prueba de IH para detectar anticuerpos para la H y la inmunodifusión

doble para detectar anticuerpos para la NP. Otras pruebas serológicas para detectar anticuerpos incluye neutralización viral, fijación de complemento, inhibición de la neuraminidasa, hemólisis radial simple y ELISA (12).

Para diagnóstico serológico, es importante coleccionar sueros tanto en la fase aguda de la enfermedad como en los animales convalecientes. Las muestras de los sueros en fase aguda se coleccionan de aves afectadas tan pronto como sea posible después del brote de la enfermedad. Los sueros en fase convaleciente se coleccionan 14-28 días después del brote¹. Las muestras de suero pareadas (agudo y convaleciente) se usan para comparar los niveles de anticuerpos antes y después de la infección. Por ejemplo, el suero puede probarse por IH para anticuerpos a un virus sospechoso. Un aumento cuádruple seriado en título de anticuerpos en el suero de la fase convaleciente es indicativo de infección reciente con ese particular virus de influenza. Los sueros se mantienen congelados hasta probarse, y puede agregarse azida de sodio (0.01%) como un conservador (12).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

El método de amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN) por reacción en cadena de polimerasa (PCR, del inglés, polymerase chain reaction) es una técnica de biología molecular recientemente desarrollada (35) que permite amplificar significativamente ADN, o bien ARN a través de un paso previo de transcripción reversa (RT-PCR). El proceso consiste de ciclos repetidos de síntesis de ADN específico, definido por extensiones cortas de ADN preseleccionado. Dos oligonucleótidos se emplean como iniciadores para una serie de reacciones sintéticas que se catalizan por ADN polimerasa. La plantilla de ADN primero se desnaturaliza por calentamiento en presencia de un gran exceso molar de cada uno de los oligonucleótidos y los cuatro deoxinucleótidos trifosfatos (Adenina, Timina, Guanina y Citosina). La mezcla de la reacción se enfría a una temperatura que permite a los oligonucleótidos iniciadores fijarse a su secuencia blanco, después de lo cual los iniciadores fijados son extendidos con ADN polimerasa termoestable. El ciclo de desnaturalización, fijación y síntesis de ADN es repetido usualmente 25

a 30 ciclos. Ya que los productos de una vuelta de amplificación sirven como plantilla para la próxima, cada ciclo sucesivo esencialmente duplica la cantidad del producto del ADN descado. Esta técnica tiene aplicación en patología diagnóstica, microbiología, medicina forense, hematología y biología molecular, por su alta sensibilidad y especificidad, aunada a la rapidez de sus resultados (38, 58). Sin embargo, a la fecha, por su costo, solo puede ser considerada como prueba especial, para estudios complementarios o experimentales (55).

El principal interés para los patólogos sobre la técnica de PCR reside en el hecho de que la técnica permite analizar ADN, ó ARN si previamente se somete a transcripción reversa, de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina. Las aplicaciones son numerosas (41, 58), algunos antecedentes del empleo de la técnica de RT-PCR de muestras incluidas en parafina son: detección del virus del sarampión (27), detección del virus de la inmunodeficiencia en macaco rhesus (4), diferencias características de los virus respiratorio sincitial de ovino, bovino y humano (37), demostración del virus coxsackie de niños con miocarditis (19), detección del virus de la diarrea viral bovina (18), amplificación de ARNm del gene receptor de estrógeno en cáncer de mama (33), detección *in situ* del virus de la hepatitis C (30), detección del "virus sin nombre", un hantavirus causante de un síndrome pulmonar característico (44).

La RT-PCR ha sido recientemente empleada para detectar virus de influenza en órganos de patos (54), muestras de exudado faringeo o nasal colectados de humanos y cerdos (43, 59). Más recientemente para tipificar y subtipificar los virus de influenza A y B (57) así como para la detección del gen de la H del virus de Influenza en pollos (23).

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este estudio fue establecer la técnica de RT-PCR para el diagnóstico de influenza aviar en tejidos incluidos en parafina de aves infectadas experimentalmente, y correlacionarlo con las características histopatológicas de diversos órganos de las aves inoculadas.

¹ Lo cual no es aplicable a virus altamente virulentos cuando producen 100% de mortalidad.

JUSTIFICACIÓN

La importancia de este estudio reside en contar con una prueba aplicable a estudios retrospectivos para la identificación de influenzavirus en forma sensible, específica y rápida, y contribuir al estudio de la patogénesis de este virus al definir los cambios histopatológicos causados por una cepa altamente virulenta aislada en México. Además se crea la expectativa de una técnica prometedora para estudiar aspectos importantes de la patogenia viral; como la diferenciación de los tejidos en los que ocurre replicación viral de aquellos en los que hay daño debido a alguna otra causa. Así, esta técnica es una alternativa a la búsqueda de partículas virales por microscopía electrónica, la cual no siempre es exitosa. Por otro lado, la combinación de RT-PCR con histopatología es potencialmente aplicable a muchas otras situaciones en patología diagnóstica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS

1.- Establecer la prueba de transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de polimerasa para la identificación del virus de influenza aviar a partir de tejidos incluidos en parafina.

Al respecto existían suficientes evidencias para esperar que la prueba de RT-PCR funcionara bien en tejidos incluidos en parafina.

2.- Contribuir al estudio de la patogenia de influenza aviar en diferentes órganos al correlacionar la detección del virus por RT-PCR con el análisis histopatológico de los mismos.

En este sentido se esperaba que la dos técnicas no concordaran completamente, ya que los cambios histopatológicos podían deberse a la respuesta inmune e inflamatoria, más que por el efecto directo del virus, ante una limitada replicación viral.

3.- Evaluar la reacción hacia el virus en diferentes órganos y de manera indirecta el tropismo viral, por histopatología a diferentes dosis del inóculo viral.

Con esto se esperaba determinar el umbral o cantidad mínima necesaria de virus que resultara en cambios histopatológicos de los órganos bajo estudio.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Alta Seguridad de la Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la Fiebre Aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales (CPA), Km. 15.5 de la carretera libre México-Toluca, Palo Alto, Delegación Cuajimalpa, México, D.F. El estudio histopatológico se llevó a cabo en el Depto. de Patología de la FMVZ de la UNAM, Ciudad Universitaria. Los estudios de RT-PCR se llevaron a cabo en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon 90 pollos Arbor Acres sin sexar de 5 semanas de edad, provenientes de huevo fértil de granjas libres de *Salmonella*, Newcastle, Laringotraqueitis, Bronquitis Infecciosa e Influenza, incubados y criados en las instalaciones de la CPA (34).

VIRUS

Se empleó el virus de Influenza Aviar altamente virulento A/Ck/Querétaro/20/95 (H5N2) aislado en huevos embrionados de pollo de 9 a 11 días de edad, por personal de la CPA del brote en el estado de Querétaro en 1995.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se tomó una muestra sanguínea de todas las aves para garantizar la seronegatividad en la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) para Newcastle e Influenza. Se formaron 8 lotes con 10 animales, cada lote se inoculó por vía endovenosa con 0.2 ml de una dilución decuple seriada a partir de 10^{-1} a 10^{-8} de líquido alantoideo infeccioso con 540 unidades hemaglutinantes. Como resultado de este estudio se calculó la dosis letal 50% en pollos (DLP_{50}) por el método de Kärber (33). Diez aves permanecieron como controles no inoculados.

ESTUDIO CLÍNICO-PATOLÓGICO

Las aves se revisaron diariamente con el registro de los signos clínicos y número de muertes. Se realizó el estudio macroscópico a la necropsia tanto de los controles como de los sobrevivientes, los que se sacrificaron por electrocución a los 15 días postinoculación. Se tomaron muestras de hígado, bazo, pulmón, riñón, páncreas, bolsa de Fabricio, cerebro, cresta, tonsilas cecales e intestino delgado, las que se fijaron en formalina amortiguada al 10% (pH 7.2-7.4), se incluyeron en bloques de parafina y se cortaron a 4 μ de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E) de acuerdo a las técnicas descritas por Luna (32). Se cuantificó la existencia o no de lesión microscópica en los diferentes órganos bajo estudio, y se compararon con su correspondiente resultado en RT-PCR; en los casos con lesión microscópica; ésta se clasificó en discreta, moderada o grave en función de su extensión o abundancia para su relación con la dosis aplicada del inoculo viral.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

En la preparación de los reactivos para la extracción de ARN y RT-PCR se empleó agua destilada, desionizada² y esterilizada en autoclave. Así mismo los amortiguadores con sales autoclaveables también fueron esterilizados.

RT-PCR para muestras incluidas en parafina

Extracción de ARN viral de muestras incluidas en parafina

De los tejidos incluidos en parafina para RT-PCR: cerebro, pulmón y riñones, de un ave por dilución y sus correspondientes controles negativos, se tomaron de 3 a 4 secciones de 10 μ de espesor, de acuerdo a cantidades empleadas por otros autores (18, 46); previa limpieza

² Aparato MilliQ UF Plus, Millipore, Bedford, MA., EUA.

profunda con xilol al microtomo y navaja así como el uso de guantes con cambios frecuentes. Los cortes se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml con la ayuda de palillos estériles. Lo anterior a fin de evitar el contacto con RNAsas y la contaminación entre muestra y muestra (18, 29).

Las secciones se desparafinaron en base al protocolo de Gruber *et al.* (18) que consistió en: dos lavados con 500 µl xilol, mantenidas en agitación suave durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de dos lavados con 400 µl de etanol absoluto, mantenidas en agitación suave durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de cada lavado se centrifugaron³ a 14,000 rpm durante 3 minutos, con eliminación del sobrenadante por decantación, salvo en la última centrifugación en la que se retiró el sobrenadante por aspiración con una micropunta estéril diferente para cada muestra.

Para la extracción del ARN viral el material desparafinado se procedió como sigue: 1) Se suspendieron las muestras en 300-400 µl de amortiguador de digestión [Proteínasa K⁴ 500 µg/ml, Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), EDTA 20 mM, Sarcosil⁴ al 0.5%, mantenido en alícuotas a -70° C] y se incubaron a 50° C durante 14 a 18 horas. 2) Los tubos se colocaron en agua en ebullición durante 8 minutos para inactivar la proteínasa (18). 3) Se centrifugaron⁵ las muestras a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4° C y se recuperó el sobrenadante. 4) Se añadió 600 µl de solución de lisis GTC-Sarcosil (533 µl de agua, 40 µl de N-lauril sarcosina al 10%, 26.6 µl de citrato de sodio 0.75 M, pH 7, 3.792 µl de β-mercaptoetanol) a cada tubo y se mezcló en un vortex. 5) Se añadió a cada tubo 80 µl de acetato de sodio 2M, pH 4; 300 µl de fenol saturado en agua y 300 µl de cloroformo, y se mezcló manualmente durante 30 segundos. 6) Se incubó durante 15 minutos sobre hielo. 7) Se centrifugó a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4° C y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. 8) Se añadieron 500 µl de cloroformo y se mezcló manualmente durante 30 segundos. 9) Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4° C, se

³ Todos los procesos de centrifugado a temperatura ambiente se realizaron en una centrifuga Eppendorf, Molelo 5415C, Hamburgo, Alemania.

⁴ Sigma Chemical Company. St. Louis Missouri, EUA.

⁵ Todos las centrifugaciones a 4° se realizaron en una centrifuga Eppendorf, Modelo 5402, Hamburgo, Alemania.

colectó el sobrenadante y guardó en congelación a -70°C hasta su uso. Con el fin de precipitar ácidos nucleicos, a 250 μl de ARN se añadieron 25 μl de acetato de sodio 3M, pH 5.2 y 625 μl de etanol absoluto, se dejó a -20°C al menos 30 minutos, se centrifugó a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se eliminó cuidadosamente el sobrenadante por aspiración; con cuidado de no retirar un sedimento blanco, aunque en ocasiones el sedimento es invisible. Se resuspendió el sedimento en 200 μl de agua y se purificó el ARN con el juego de reactivos RNaid⁶ con el siguiente protocolo: 1) se añadieron 200 μl de sales RNaid, 10 μl de polvo de vidrio y agitó suavemente durante 5' a temperatura ambiente. 2) Se centrifugó a 3,250 rpm durante 30 segundos y se retiró el sobrenadante por decantación. 3) Se resuspendió el sedimento en 300 μl de solución de sales RNaid. 4) Se centrifugó durante 30 segundos a 3,250 rpm. 5) Se lavó dos veces con 500 μl de solución de lavado RNaid. 6) Se centrifugó durante 1 minuto a 11,250 rpm y eliminó el sobrenadante por decantación la primera vez, la segunda por aspiración. 7) El sedimento se resuspendió en 30 μl de agua e incubó en baño María durante 5' a 55°C . 8) Se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 minutos y se recuperó el sobrenadante, el que se conservó en congelación a -70°C hasta su uso.

Transcripción Reversa

A partir de aquí se tomaron en cuenta los protocolos de Ausubel *et al.* (3) y Sambrook *et al.* (42). Para la obtención del ADNc se siguió el siguiente protocolo: 1) En un tubo de microcentrífuga de 0.6 ml se mezcló lo siguiente: 5 μl de ARN purificado de cada muestra, 1.625 μl de agua, 0.625 μl de oligonucleótido Ex5 y 0.625 μl de oligonucleótido Ex3 (ver adelante, en selección de oligonucleótido). 2) Se incubó a 65°C durante 5'. 3) Se dejó enfriar durante 1 minuto a temperatura ambiente. 4) Se añadió 2.5 μl de amortiguador RT 5x⁷ (Tris-HCl 250 mM, MgCl₂ 40 mM, KCl 150 mM, ditioneitol 5 mM, pH 8.5), 1.6 μl de dNTPs⁷ 5 mM, 0.4 μl (12 U) de inhibidor de RNAsa de placenta⁸ y 0.125 μl de Transcriptasa Reversa

⁶ Bio-101, La Jolla, California, EUA.

⁷ Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, EUA.

⁸ RNAsin, Promega, Madison, Wi, EUA.

(AMV, 3 U)⁹. 5) Se incubó a 42° C durante 30 minutos. 6) Se guardó en congelación hasta su uso.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de un paso

Para el PCR se siguió el siguiente protocolo: 1) En un tubo Eppendorf de 0.6 ml se mezcló lo siguiente: 1 µl de ADNc, 7.375 µl de agua, 1.25 µl de amortiguador PCR 10x + Mg⁹ (Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 15 mM, KCl 500 mM, pH 8.3), 1 µl de dNTPs 2 mM, 0.5 µl de MgCl₂ 25 mM¹⁰, 0.625 µl, 20 µM de cada uno de los oligonucleótidos In5 e In3 (ver adelante pares de oligonucleótidos usados en PCR y tamaño del fragmento producido), 0.125 µl de DNA polimerasa Taq (0.625 U)¹¹. 2) Se añadieron 2 gotas de aceite mineral. 3) La reacción se llevó a cabo por 30 ciclos en un termociclador¹² con los siguientes tiempos y temperaturas: desnaturalización a 94° C durante 45" (1.5 minutos sólo para el primer ciclo), fijación (hibridación) a 50° C durante 60" y extensión a 72° C durante 90". Al final se empleó un paso de extensión final de 7 minutos a 72° C. 4) Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se guardó en congelación hasta su uso.

PCR doble semianidado

Para el PCR semianidado, en un primer paso de amplificación (primer PCR), se siguió el mismo protocolo que para el PCR de un paso, con las siguientes modificaciones: 1) se ensayó el juego de oligonucleótidos SupEx5/In3 ó In5/In3. 2) En el termociclado se empleó una temperatura de fijación de 45 ó 50° C durante 60 segundos y un tiempo de extensión de 90 segundos. Para el segundo paso de amplificación (segundo PCR) se procedió igual al primer PCR con las siguientes modificaciones: 1) Se empleó 1 µl del producto del primer PCR en lugar del ADNc,

⁹ Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, EUA.

¹⁰ La concentración final de Mg es 2.5 mM.

¹¹ Amplifacsa, Biotecnologías Universitarias, México, D.F.

¹² Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, EUA.

0.625 μ l de oligonucleótido In5, 20 mM, 0.625 μ l de oligonucleótido In3, 20 mM. 2) La reacción se termocicló con una temperatura de fijación de 50° C.

PCR doble anidado

Para el PCR anidado, en un primer paso de amplificación (primer PCR), se siguió el mismo protocolo que para el PCR de un paso, con las siguientes modificaciones: 1) se ensayaron 1 ó 2 μ l de ADNc. 2) se ensayó el juego de oligonucleótidos Ex5/Ex3 en concentraciones de 20 μ M ó 0.5 μ M (18). 3) En el termociclado se empleó una temperatura de fijación de 45 ó 50° C durante 60 segundos y un tiempo de extensión de 90 ó 50 segundos. Para el segundo paso de amplificación (segundo PCR) se procedió igual al primer PCR con las siguientes modificaciones: 1) Se empleó 1 μ l del producto del primer PCR en lugar del ADNc, 0.625 μ l de oligonucleótido In5, 20 μ M, 0.625 μ l de oligonucleótido In3, 20 μ M. 2) La reacción se termocicló con una temperatura de fijación de 50° C.

Análisis del ADN amplificado

Cuatro μ l de cada producto del RT-PCR anidado se corrió en geles de agarosa al 1.5% con un 1 μ l de amortiguador de muestra 6x (azul de bromofenol 0.25%, Xileno cianol FF 0.25%, glicerol en agua 30%) en amortiguador TAE 1x (Tris 0.04 M, Acetato de Sodio 0.02 M, EDTA 0.001 M, pH 8.2) y 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio, durante 1.5 horas a 95 Volts (42). El gel se fotografió en un transiluminador de luz ultravioleta¹³.

También 4 μ l del producto del PCR se corrió en geles de poliacrilamida de 15 cm al 12%, bajo la siguiente fórmula: 7.7 ml de agua, 3.8 ml de Tris 2M, pH 8.8, 7.92 ml de acrilamida-bis acrilamida 30:0.8, 450 μ l de persulfato de amonio al 10% y 11 μ l de Temed (N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina). Los geles se corrieron en amortiguador Tris-Glicina (tris 25 mM, glicina 0.192 M, pH 8.3), a 12 miliamperes durante aproximadamente 5 horas (33). Las bandas

¹³ Eagle Eye, Stratagene, La Jolla, California, EUA.

de ADN se detectaron con tinción de plata con el siguiente protocolo: 1) El gel se fijó durante 30 minutos con agitación constante en una solución de: 19.8 ml de etanol absoluto, 0.2 ml de ácido acético glacial y 180 ml de agua. 2) Se retiró la solución fijadora y se añadieron 200 ml de solución de nitrato de plata, 10.79 mM, durante 30 minutos en agitación constante. 3) Se retiró la solución de plata, se enjuagó dos veces brevemente con agua y se añadió la solución reveladora (14 ml de hidróxido de sodio 10 M, 1.6 ml de formaldehído al 38% y cbp 200 ml de agua) con agitación constante hasta la aparición de bandas. 4) Se retiró la solución reveladora y se añadió ácido acético glacial al 10% para detener la reacción.

Para fines de ilustración se corrieron 8 µl de una muestra de pulmón, SNC y riñón con sus controles negativos correspondientes, así como líquido alantoideo positivo y negativo.

Obtención del control positivo inicial de la RT-PCR a través de la detección de ARNm de β-actina murina con el método RNaid®¹⁴ (polvo de vidrio) con sales y sin sales.

Con el fin de contar con un control positivo inicial para la técnica de RT-PCR se siguió un protocolo para la detección de ARNm de β-actina murina en bazo. Con este ensayo se demostró que se tenían las condiciones necesarias para amplificar un ARNm muy abundante y se optimizó la cantidad de sales usada en un paso de extracción de ARN: 1) Se extrajo el bazo de un ratón BALB/c, hembra de aproximadamente 6 semanas de edad y congeló en hielo seco. 2) Se homogeneizó en un homogeneizador con brazo de teflón (capacidad para 10 ml) sobre hielo con 2 ml de amortiguador de lisis sin sarcosil (tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM, pH 7, β-mercaptoetanol 0.1 M). 3) Después de homogeneizar se añadió N-lauril sarcosina al 10% para una concentración final de 0.5%. A cada 500 µl del homogeneizado se le añadió: 50 µl de acetato de sodio 2 M, pH 4.0, 300 µl de fenol y 300 µl de cloroformo. 4) Se mezcló en un vortex durante 30", se incubó 15' sobre hielo y se centrifugó durante 20' a 4° C a 14,000 rpm. 5) El sobrenadante se transfirió a otro tubo, al que se le agregaron 500 µl de cloroformo, se

¹⁴ Bio-101, La Jolla, California 92038.

mezcló en un vortex durante 30" y se repitió proceso de centrifugado. 6) Se colectó el sobrenadante y se añadió:

	Sin sal	Con sal
Agua	-	250 µl
Sol. de sales RNaid	-	250 µl
Amortiguador de lisis	500 µl	-
Polvo de vidrio RNaid	10 µl	10 µl

7) Se agitó suavemente durante 5' a temperatura ambiente y se centrifugó 30" a 3,250 rpm a temperatura ambiente. 8) Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en:

	Sin sal	Con sal
Solución de sales RNAid	-	300 µl
Solución de lavado RNAid	500 µl	-

9) Se centrifugó 30" a 3,250 rpm a temperatura ambiente. 10) El proceso de lavado (paso 8) se repitió dos veces, con una centrifugación final de 1' a 11,250 rpm a temperatura ambiente. 11) El sedimento se resuspendió con 50 µl de agua, se incubó 5' a 55° C en baño María, se centrifugó durante 2' a 14,000 rpm y se recuperó el sobrenadante.

Transcripción Reversa

Para la obtención del ADNc se siguió el siguiente protocolo: 1) En un tubo Eppendorf de 0.6 ml se mezcló lo siguiente: 5 µl de ARN purificado de cada muestra, 1.625 µl de agua, 1.25 µl de oligo dT-16¹⁵, 0.5 µg/µl. 2) Se incubó a 65° C durante 5 minutos. 3) Se dejó enfriar durante 1 minuto a temperatura ambiente 4) Se añadió 2.5 µl de amortiguador RT 5x, 1.6 µl de dNTPs 5 mM, 0.4 µl (12 U) de inhibidor de RNAsa de placenta, 0.125 µl de Transcriptasa Reversa

¹⁵ Sintetizado en la Unidad de Síntesis Química de Macromoléculas del IBT, UNAM, Cuernavaca, Morelos.

(AMV, 3 U). 5) Se incubó a 42° C durante 30 minutos. 6) Se guardó en congelación hasta su uso.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para el PCR se siguió el siguiente protocolo: 1) En un tubo Eppendorf de 0.6 ml se mezcló lo siguiente: 1 µl de ADNc; 7.375 µl de agua; 1.25 µl de amortiguador PCR 10x + Mg; 1 µl de dNTPs, 2 mM; 0.5 µl de MgCl₂, 25 mM; 0.625 µl de oligonucleótido 5', 20 µM; 0.625 µl de oligonucleótido 3', 20 µM¹⁶; 0.125 µl de DNA polimerasa Taq (0.625 U). 2) Se añadieron dos gotas de aceite mineral. 3) La reacción se llevó a cabo por 30 ciclos en un termociclador con los siguientes tiempos y temperaturas: desnaturalización a 94° C durante 45 segundos (1.5 minutos únicamente en el primer ciclo), fijación a 60° C durante 60 segundos, extensión a 72° C durante 90 segundos. Un paso de extensión final de 7 minutos a 72° C. 4) Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se guardó en congelación hasta su uso.

Análisis del ADN amplificado

Cinco µl de cada producto del RT-PCR se corrió en un gel de agarosa al 1.0% durante 1 hora, como se describió para los tejidos incluidos en parafina.

Obtención de control positivo y negativo para RT-PCR a partir de líquido alantoideo

Se inocularon vía cavidad alantoidea, 0.2 ml de la cepa altamente virulenta A/Ck/Querétaro/20/95 y 0.2 ml de la cepa apatógena A/Ck/México/294/94 en embriones de pollo libres de patógenos específicos (SPF), se cosechó el líquido alantoideo a las 48 y 72 horas respectivamente. A 0.2 ml del líquido alantoideo de embrión de pollo sin inocular y a un volumen igual para los embriones inoculados, se les añadió: 1) 0.5 ml de solución de lisis tiocianato de guanidina-sarcosil (4 ml de tiocianato de guanidina (GCT) 6 M, 1.5 ml de agua, 0.3 ml de sarcosil

¹⁶ 5' ATG GAT GAC GAT ATC GCT y 3' ATG AGG TAG TCT GTC AGG T. Sintetizados en la Unidad de Síntesis Química de Macromoléculas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos.

al 10%, 0.2 ml de citrato de sodio 0.75 M, pH 7 y 38 μ l de β -mercaptoetanol) y se pipeteó de 7 a 10 veces. 2) Se añadió a cada tubo 50 μ l de acetato de sodio 2M, pH 7.4, 300 μ l de fenol y 300 μ l de cloroformo, se mezcló en un vortex durante 30", se incubó 15' sobre hielo, se centrifugó durante 20' a 14,000 rpm a 4° C y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. 3) Se añadió 500 μ l de cloroformo, se mezcló en un vortex durante 30", se centrifugó durante 10' a 14,000 rpm a 4° C, se colectó el sobrenadante y se congeló a -70° C hasta su uso.

Purificación de ARN del líquido alantoideo con el método del RNaid

Para la purificación del ARN de líquido alantoideo con el método del RNaid se siguió el protocolo empleado para los tejidos incluidos en parafina, con un volumen de 250 μ l de ARN de líquido alantoideo para el control negativo, control positivo cepa apatógena y control positivo cepa virulenta.

Transcripción Reversa

Para la transcripción reversa se procedió igual que para los tejidos incluidos en parafina, con el ensayo de los oligonucleótidos SupEx5/In3 para los ensayos de optimización del PCR con líquido alantoideo y como control a lo largo de los experimentos con tejidos incluidos con parafina. Los oligonucleótidos Ex3 ó Ex5/Ex3 se emplearon paralelamente cuando se ensayaron en muestras incluidas en parafina.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para el PCR se procedió de igual manera que para β -actina, con el empleo del juego de oligonucleótidos SupEx5/In3 para el ensayo de diferentes temperaturas de hibridación (42°, 50° y 60° C) y diferentes concentraciones de MgCl₂ (1.5, 3.0, 4.5 y 6.0 mM) y como control en los ensayos iniciales de las muestras incluidas en parafina. El juego de oligonucleótidos In5/In3 se probó a diferentes concentraciones de MgCl₂ (1.5, 3.0, 4.5 y 6.0 mM) y en PCR doble. El juego de oligonucleótidos Ex5/Ex3 se empleó a una concentración de 0.25 mM en el primer PCR y el

In5/In3 a una concentración 20 mM para el segundo PCR como control en las muestras definitivas de los tejidos incluidos en parafina.

Análisis del ADN amplificado

Para el análisis del ADN amplificado se llevó a cabo en geles de agarosa al 1.5% en las mismas condiciones descritas para muestras incluidas en parafina. Algunas de las muestras analizadas se seleccionaron para elaborar ilustraciones, y con este fin se aplicaron a geles de poliacrilamida de 15 cm al 12% como se describió anteriormente.

Selección de los oligonucleótidos iniciadores

Se confrontaron las 18 secuencias de la hemaglutinina H5 del virus de influenza aisladas en México, reportadas en el banco de genes, con algunas cepas extranjeras para obtener secuencias consenso y gráficas de similitud¹⁷, con esto se seleccionaron las siguientes secuencias como oligonucleótidos iniciadores¹⁸:

SupEx5: Oligonucleótido (sentido hacia adelante):

5' TGG GGA ATT CAT CAC CCT 3' (base 614-631)

Ex5: Oligonucleótido iniciador externo (sentido hacia adelante):

5' GGA GAC TCA GCA ATC ATG A 3' (base 866-883)

In5: Oligonucleótido iniciador interno (sentido hacia adelante):

5' GGG GAG TGC CCC AAG TAT GT 3' (base 986-1,004)

Int3: Oligonucleótido iniciador interno (sentido hacia atrás):

5' CCT GCT ATT GCT CCA AAT AGG CC 3' (base 1,081-1,101)

Ex3: Oligonucleótido iniciador externo (sentido hacia atrás):

5' CCA TTC CCT GCC ATC CCC C 3' (base 1,112-1,130)

¹⁷ Programa: GCG (Genetics Computer Group, Inc.), Madison, Wisconsin.

¹⁸ Sintetizados en la Unidad de Síntesis Química de Macromoléculas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos.

Pares de oligonucleótidos empleados en PCR y tamaño del fragmento producido¹⁹.

OLIGONUCLEÓTIDOS	tamaño del ADN amplificado (pb)	
	cepa virulenta	cepa apatógena
SupEx5, In3	488	476
Ex5, Ex3	265	253
In5, In3	116	104

Tratamiento estadístico

Se realizó una prueba de homogeneidad y una medida de concordancia (Kappa de Cohen) para comparar los resultados por histopatología y RT-PCR. Se definió la significancia como un valor p menor a 0.05.

¹⁹ La diferencia en el tamaño del producto esperado entre la cepa virulenta y apatógena se explica porque dentro de las cepas mexicanas secuenciadas disponibles en el banco de genes, todas las cepas virulentas presentan la inserción de dos aminoácidos, lisina en la posición -5 y arginina en la posición -6 de la HA1, y la cepa virulenta empleada A/Ck/Oro./20/95 presenta la inserción adicional de lisina en la posición -7 y arginina en la posición -8 (Dr. M. Fraire, comunicación personal).

III. RESULTADOS

La mortalidad de las aves inoculadas dentro de los primeros diez días se presenta en el cuadro 1, la cual correspondió a un título de $10^{8.7}$ dosis letales de pollo al 50% (DLP₅₀)/ml.

SIGNOS CLÍNICOS

El lote control no presentó mortalidad ni signología clínica.

En los lotes experimentales, a las 24 horas postinoculación, se encontró una mortalidad del 12.5% con las DLP₅₀ 10^8 , 10^7 y 10^6 . La mayoría de las sobrevivientes en estos lotes presentaban depresión, con la cabeza apoyada sobre el pecho, postración, pluma erizada, ojos cerrados o semicerrados con hiperemia periorbital, fiebre (42 °C) en las aves deprimidas pero de pie (fig. 1), seguida de hipotermia (40.4-40.6) en las postradas, y una reacción violenta e incoordinada muy breve a los estímulos sonoros.

Para las 48 horas todos los lotes presentaban mortalidad y signos clínicos. A la signología descrita previamente se agregó congestión de la piel, cresta y barbillas, manchado equimótico de patas, heces de color verde esmeralda y una reacción de intolerancia (probablemente dolorosa) a estímulos táctiles. Se pudo apreciar por la revisión diaria de los comederos disminución del consumo, gradual por lotes, de prácticamente vacíos en las aves inoculadas con la más baja dosis del virus a casi llenos en aves inoculadas con la más alta dosis del virus.

A las 72 horas de la inoculación existía una mortalidad acumulada del 51.25%. Se apreció hinchazón de cabeza y patas, algunas con un tono cianótico de piel, cresta, barbillas, orejuelas y párpados, un manchado equimótico mucho más evidente en patas, cambio de voz en una ave y otra con signos nerviosos consistente en un movimiento lento de la cabeza hacia atrás y su retorno a su posición normal de un solo golpe, a manera de opistótono.

Para el cuarto día fue evidente una signología nerviosa en varias aves, marcha incoordinada con caída de ala, ataques convulsivos terminales con torticolis. Las heces cambiaron a un color café-amarillento en líquido mucoso transparente. En cresta y barbillas empezó a notarse un color oscuro (necrótico) en áreas focales en las puntas o en la base y en algunos casos en toda la cabeza: cresta y/o barbillas, orejuelas, párpados y cara (fig. 2).

En los siguientes días se presentaron combinaciones de la signología antes descrita en diferentes grados, en general más afectadas las inoculadas con altas dosis de virus.

HALLAZGOS MACROSCÓPICOS

En el lote control dos aves presentaron ascitis moderada y en las demás no se encontraron lesiones macroscópicas evidentes.

Las aves que murieron dentro de las primeras 24 horas se encontró a la necropsia una congestión generalizada en especial en pulmones, seguido de riñones, bazo, hígado, piel y masas musculares. Así como hemorragias petequiales en corazón, en especial en el surco coronario (fig. 3) y serosas. Algunas aves presentaron ascitis moderada.

Para el segundo día los hallazgos fueron semejantes al primer día, con la diferencia que para las aves de las primeras tres diluciones, la congestión en piel fue mucho más evidente junto con cianosis en cresta y barbillas. Algunas presentaron vasos sanguíneos muy evidentes (hiperemia) en sistema nervioso central (fig. 4) e intestino; úlceras y hemorragias petequiales en proventrículo (fig. 5) y bajo la cutícula del ventrículo, así como ascitis moderada. Para las diluciones restantes los pulmones se apreciaban de un color normal, un rojo brillante o un rojo oscuro.

Los días restantes se observaron combinaciones de lo anterior, en diferentes grados de afección, con casos de edema subcutáneo en cabeza, quilla, pierna y muslo (fig. 6); hígados con una coloración no uniforme, tonos rojos más claros, café y amarillo, bazo pálido y/o con hemorragias

subcapsulares y algunos casos con hemorragias en ciegos, opacidad en sacos aéreos y dos casos con áreas hemorragias en mucosa esofágica.

HALLAZGOS MICROSCÓPICOS

Los únicos hallazgos microscópicos de las aves control fueron: En hígado escaso infiltrado mononuclear perivascular y en triada porta de un espesor máximo de 3 capas de células.

La clasificación de los hallazgos histológicos de las aves inoculadas se encuentran tabuladas en el cuadro No. 2, donde las observaciones perdidas incluyen cambios autolíticos y problemas técnicos de sobrecalentamiento en el histoquinete. A continuación se da una descripción resumida de los hallazgos histopatológicos de cada órgano, con las características que se tomaron en cuenta para incluirlas dentro de los criterios de clasificación fijados.

Secciones pulmonares

Se observaron congestionados y con edema perivascular e intersticial, al que se suma un infiltrado inflamatorio mononuclear perivascular e intersticial, acompañado de un infiltrado heterofílico discreto en algunos casos, disminución de la población linfóide o destrucción del tejido linfóide en casos más graves (fig. 7) y un caso de bronconeumonía piogranulomatosa. En 8 casos de 66 cortes que se valoraron se encontraron trombos en arterias y venas de pequeño y mediano calibre (fig. 8). En algunos casos el epitelio ciliado bronquial presentó infiltrado mononuclear discreto, núcleos con cariorrexis y vacuolización del citoplasma. El cuadro histopatológico de las sobrevivientes se caracterizó por congestión, edema, tejido linfóide reactivo e hiperplásico. Para el grado de lesión discreta se consideró la presencia de congestión, edema, ligero infiltrado mononuclear, incluso algunos heterófilos y disminución de la población linfóide; lesión moderada, cuando la caracterización previa se acompaña de picnosis moderada del tejido linfóide; y lesión grave, con destrucción extensa de la población linfóide.

Secciones renales

Se observó congestión, con necrosis tubular aguda (fig. 9), más frecuente y severa en los túbulos contorneados proximales. Algunos casos con infiltrado inflamatorio mononuclear intersticial, infiltrado inflamatorio mononuclear multifocal y en ocasiones un infiltrado discreto de heterófilos (nefritis intersticial) y necrosis multifocal. Se detectó un trombo venoso en una ave inoculada con 10^5 DLP₅₀, fallecida 5 días postinoculación. El riñón de las sobrevivientes presentan un infiltrado intersticial y/o acúmulos linfoides nodulares abundantes. Para el grado de lesión discreta se incluyó la presencia de congestión y escasa picnosis en el epitelio de los túbulos contorneados proximales; lesión moderada, con infiltrado inflamatorio mononuclear intersticial, presencia de heterófilos y picnosis moderada en epitelios de los túbulos; lesión grave, con necrosis epitelial extensa de los túbulos.

Secciones de Sistema Nervioso Central (SNC)

Se apreció congestión, hiperemia, gliosis multifocal, necrosis con gliosis reactiva multifocal, vacuolización de la sustancia blanca, infiltrado inflamatorio mononuclear perivascular, característico de encefalitis no supurativa (fig. 10), meningitis no supurativa, degeneración y necrosis neuronal, y focos mínimos de neurofagia. En los encéfalos de las aves sobrevivientes se aprecia una disminución gradual de las lesiones, en función de la dosis empleada; de infiltrado perivascular, focos gliales, cambios neuronales y vacuolización leve con 10^3 DLP₅₀ a prácticamente normal en un caso con 10 DLP₅₀. Se incluyó como lesión discreta aquellos casos que presentaron escasos focos gliales; lesión moderada, focos gliales multifocales con necrosis; y como lesión grave, la infiltración de células mononucleares perivasculares.

Secciones hepáticas

Se apreció congestión, esteatosis de gota pequeña, dilatación de sinusoides con presencia de eritrocitos, pérdida de la arquitectura, infiltrado inflamatorio mononuclear perivascular y en triada porta, áreas multifocales de necrosis hepatocelular que incluye acúmulos de células

inflamatorias presentes (fig. 11). Se detectó vasculitis en una arteria de mediano calibre en un ave inoculada con 100 DLP₅₀, sacrificada a los 15 días postinoculación. Los criterios de inclusión dentro de la clasificación fueron: lesión discreta; esteatosis, pérdida de la arquitectura, presencia de eritrocitos en sinusoides e infiltrado perivascular de más de tres capas de células; lesión moderada, infiltrado mononuclear perivascular amplio y/o áreas multifocales de necrosis coagulativa pequeñas y escasas; lesión grave, linfo necrosis del infiltrado inflamatorio mononuclear perivascular y/o áreas amplias de necrosis coagulativa.

Secciones esplénicas

Se aprecian congestivos y/o anémicas con acúmulos subcapsulares de eritrocitos (hemorragias), pigmento ocre (hemosiderina), proliferación de células plasmáticas, necrosis de tejido linfoide y de células reticulares (fig. 12), y la presencia de trombos venosos en una ave inoculada con 10⁴ DLP₅₀ fallecida a las 48 horas postinfección. A partir de los 4 días postinoculación, en el 20% de las aves, fue evidente la presencia de células plasmáticas con cuerpos de Russell (fig. 13). Los criterios de inclusión fueron: lesión discreta, la proliferación de células plasmáticas, disminución de la población linfoide y muy escasos núcleos en picnosis y cariorrexis; lesión moderada, con linfo necrosis; lesión grave, linfo necrosis extensa sin centros germinales discernibles.

Secciones pancreáticas

Se observaron vacuolas acinares (fig. 14), infiltrado inflamatorio mononuclear perivascular, pérdida de la arquitectura, necrosis coagulativa focal o multifocal y picnosis de islotes de Langerhans (fig. 15). Las aves sobrevivientes sacrificadas mostraron un infiltrado inflamatorio mononuclear de tipo nodular. Los criterios de inclusión fueron: lesión discreta, con pequeñas vacuolas acinares incluso distribuidas en todo el corte y/o un infiltrado inflamatorio mononuclear o heterófilo focal o multifocal escaso; lesión moderada, vacuolización moderada e infiltrado inflamatorio multifocal; lesión grave, células acinares con vacuolización densa, necrosis coagulativa extensa y picnosis de células insulares.

Secciones de bolsa de Fabricio

Degeneración vacuolar en células epiteliales, disminución de la población linfoide en la zona medular y en casos más graves en zona cortical, congestión, hiperemia, formación de quistes tanto en epitelio (fig. 16) como en el folículo (fig. 17), necrosis linfoide y epitelial. Los criterios de inclusión fueron: lesión discreta, disminución de la población linfoide en zona medular, congestión o hiperemia, pequeñas formaciones quísticas; lesión moderada, picnosis y fragmentación nuclear epitelial y/o linfoide; lesión grave, linfonecrosis extensa.

Secciones de cresta

Se apreció congestión, hiperemia, infiltrado inflamatorio perivascular en dermis profunda, paniculitis, infiltrado inflamatorio mononuclear y heterófilos en dermis superficial (fig. 18), necrosis multifocal en dermis superficial con implicación de epidermis, 34 casos de necrosis fibrinoide y trombosis de arterias y venas de pequeño calibre de la capa central, próximos a la capa intermedia de la dermis, sobre todo en los casos de necrosis epitelial extensa. Los criterios de inclusión fueron: lesión discreta, con hiperemia, algo de infiltrado inflamatorio mononuclear o heterófilo; lesión moderada, con picnosis o cariorrexis moderada del epitelio, infiltrado inflamatorio mononuclear o heterófilo; lesión grave, con necrosis epitelial extensa.

Secciones de intestino delgado

Se observó hiperemia en punta de vellosidades, necrosis del epitelio de las vellosidades y criptas intestinales, degeneración vacuolar en lámina propia, necrosis de punta de vellosidades y erosión. Los criterios de inclusión fueron: lesión discreta, hiperemia en punta de vellosidades, fusión de vellosidades, algo de erosión, vacuolización en lámina propia; lesión moderada, cariorrexis moderada de epitelio de las vellosidades y criptas de Lieberkühn; lesión grave, con necrosis epitelial extensa en vellosidades y criptas intestinales.

Secciones de tonsilas cecales

Se detectó proliferación de células plasmáticas, disminución de la población linfoide y linfocrosis (fig. 19). En esta área, en cinco casos se observaron abscesos crípticos intestinales. Los criterios de inclusión fueron: lesión discreta, disminución de la población linfoide, proliferación de células plasmáticas e incluso picnosis ligera; lesión moderada, linfocrosis en los centros germinales; lesión grave, linfocrosis sin centros germinales discernibles.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La prueba de RT-PCR se hizo inicialmente para RNAm de β -actina de ratón debido a que este es muy abundante, y se disponía de los oligonucleótidos necesarios. El ensayo consistió de extracción de RNAm con tiocianato de guanidina, purificación por adsorción a polvo de vidrio con el sistema RNAid (Bio-101), transcripción reversa usando oligo dT como cebador, y PCR en presencia de oligonucleótidos específicos. Con este sistema se optimizó la cantidad de sales a usar en la purificación de RNA, ya que el proveedor indica que el rendimiento de RNAm pequeño es mayor en presencia de sales mientras que RNAm grandes se recuperan mejor sin sales. Como resultado de este experimento se obtuvo mayor rendimiento tanto de RNAm como del producto de PCR específico, de aproximadamente 550 pb, en presencia de sales (fig. 20), por lo que en ensayos posteriores se usaron sales para purificar RNA.

Como segundo paso para montar el método se amplificó por RT-PCR RNAm de la hemaglutinina del virus de influenza usando material no incluido en parafina. Se empleó líquido alantoideo procedente de huevos embrionados inoculados con virus virulento cepa A/Ck/Qro./20/95, cepa apatógena A/Méx./294/94, y como control se utilizó líquido alantoideo de huevos embrionados SPF sin inocular.

En los experimentos iniciales se usaron los oligonucleótidos SupEx5 e In3 tanto para la transcripción reversa como para el PCR, y se optimizaron las temperaturas de fijación y la concentración de Mg^{++} en el PCR.

Al probar las temperaturas de fijación de 45° C, 50° C y 60° C, se obtuvo rendimiento similar de cDNA del peso molecular esperado, 488 pb para la cepa virulenta y 476 pb para la cepa apatógena, a 45 y 50° C, observándose una mayor cantidad de material de peso molecular bajo (barrido) a 45° C, mientras que a 60° C no se recuperó la banda del cDNA esperado.

Para las cuatro concentraciones probadas de MgCl₂ se apreció una disminución en la intensidad de las bandas con las concentraciones de 4.5 y 6.0 mM y muy semejante para las concentraciones para 1.5 y 3.0 mM (fig. 21).

En experimentos posteriores, se usó un segundo juego de oligonucleótidos, In5 e In3 en el PCR, usando como plantilla el cDNA producto de la transcripción reversa con los oligonucleótidos SupEx5 e In3. Con la cepa virulenta se obtuvo la banda esperada de 116 pb, producida a partir de los oligonucleótidos In5 e In3, y una banda adicional de 488 pb producto de los oligonucleótidos SupEx5 e In3. La presencia en este ensayo del oligonucleótido SupEx5 es por acarreo con el producto de la transcripción reversa, ya que este no se purifica antes de hacer el PCR. En contraste con este resultado, a partir de la cepa apatógena se obtuvo la banda esperada de 104 pb, pero no la banda adicional de 476 pb que se esperaba por el acarreo del oligonucleótido SupEx5. Así mismo, el control negativo de líquido alantoideo SPF no produjo banda (fig. 21).

Al aplicar el RT-PCR a tejidos incluidos en parafina, almacenados 6 meses después de la inclusión, procedentes de aves infectadas con virus virulento, no hubo formación de bandas con el PCR normal, por lo que se ensayó un PCR doble semianidado con el empleo del juego de oligonucleótidos SupEx5/In3 en el primer PCR e In5/In3 en el segundo PCR. Con este sistema se obtuvieron bandas débiles o no hubo banda en algunas muestras, por lo que se decidió diseñar el juego de oligonucleótidos Ex5/Ex que permitieron realizar PCR anidado. En el diseño del PCR anidado se escogió que ambos productos, de 265 y 116 pb para el primer y segundo PCR, respectivamente, fueran de un tamaño pequeño con lo que se esperaba que sea capaz de detectar ácidos nucleicos del virus Influenza que hayan sufrido degradación por el almacenaje, como se

espera que ocurra en cierta medida en tejidos incluidos en parafina y almacenados por muchos años. Sin embargo, la sensibilidad del PCR anidado no fue mejor que la del semianidado, quizá debido a que las muestras no fueron almacenadas muchos años.

Se optimizó el PCR anidado usando una mayor cantidad de cDNA en el primer PCR, 2 μ l, con lo que aumentó la intensidad de las bandas ligeramente, pero con un mayor trasfondo (barrido), y con el empleo de oligonucleótidos diluidos 1/40 (0.5 μ M) en el primer PCR el trasfondo disminuyó ligeramente. Otras condiciones que se ensayaron durante la optimización, concentración de Mg^{++} y disminución del tiempo de extensión de 90" a 50", no tuvieron efecto, quedando la concentración de Mg^{++} fijada a 2.5 mM y el tiempo de extensión en 50".

Una vez que se fijaron las condiciones del PCR anidado, se aplicó el ensayo de RT-PCR a 24 muestras de pulmón, SNC y riñón de aves inoculadas con 10^8 DLP₅₀ del virus influenza A/Ck/Qro./20/95. Se amplificó cDNA del tamaño esperado, 116 pb, en 8/8 casos de pulmón, en 7/8 casos de sistema nervioso central y en 7/8 casos de riñón. Los resultados vistos en geles de poliacrilamida y agarosa se presentan en el cuadro 3 y el ejemplo ilustrativo en la figura 22.

En la comparación de los resultados por histopatología con la detección del virus por RT-PCR, se probó estadísticamente ($p < 0.05$) que las dos técnicas concuerdan (Anexo 1), esto con una alta concordancia ($\kappa = 0.911$) (Anexo 2).

IV. DISCUSIÓN

Los signos clínicos de este estudio no difieren a las descripciones generales dadas para la enfermedad (8, 12). Los hallazgos en este estudio revelan que la cepa A/Ck/Querétaro/20/95 (H5N2) empleada difiere en algunos aspectos de lo reportado para otras cepas altamente virulentas, que podemos resumir en que esta cepa conjuga el daño producido por diferentes cepas en una presentación más grave, quizá con mayor similitud a los hallazgos reportados por Jungherr *et al.* para la peste aviar (28).

Es muy probable que el grado de ascitis que presentaban las aves se exacerbó por el daño vascular, de hecho se señala que en el diagnóstico diferencial de ascitis en aves de corral se debe considerar la ascitis secundaria al daño hepático o vascular más que a falla cardíaca derecha (12); sin embargo, para corroborarlo se tendría que llevar a cabo un trabajo al respecto.

Es pertinente señalar que la presencia de las pequeñas acumulaciones de células linfoides en el hígado de las aves control, alrededor de triadas porta y menos comúnmente en cualquier parte del parénquima se consideran normales (39).

La destrucción extensa y grave del tejido linfoide sólo se ha reportado con el virus Ty/Ontario/7732/66 (H5N9) (53), pero a diferencia de éste, aquí si hubo lesiones significativas en otros órganos. Aquí cobra sentido la afirmación que “las cepas más virulentas tienen una afinidad por macrófagos y linfocitos y causa una enfermedad sistémica mucho más grave” (39). Sin embargo, van Campen *et al.* (52) encontraron que los linfocitos y macrófagos infectados no producen virus infeccioso. Al parecer el mecanismo implicado en la destrucción del tejido linfoide es la inducción de apoptosis por el virus de influenza (20). Otra característica que comparte el virus estudiado con la cepa de Ontario mencionada, es la relativa inocuidad para el epitelio de las vías aéreas, a pesar de los altas dosis letales empleadas.

Los 34 casos de vasculitis en cresta aunado a los 8 casos en pulmón, casos únicos en riñón, hígado y bazo, denotan un tropismo marcado de este virus hacia endotelios vasculares. En este

estudio la vasculitis se asocia a la infección viral, sea esta por daño directo o hipersensibilidad tipo III. Estos daños vasculares ya han sido señalados en otros trabajos, pero notablemente con una presentación más rara: La cepa A/Ckicken/Pennsylvania/1370/1983 (H5N2) reveló, en estudios por inmunohistoquímica, gran afinidad por el endotelio capilar (5). Acland y col. (1) quienes al estudiar las lesiones en 5 pollos y 10 gallinas ponedoras con esta cepa de Pennsylvania, encontraron necrosis fibrinoide en pequeños vasos del párpado en una gallina y en otra trombos. En un estudio retrospectivo (22) con cepas altamente virulentas y de baja virulencia encontraron trombosis en riñones y en algunos casos en hígado. En un trabajo sobre peste de las aves (28) reportan trombosis fibrinosa ocasional en la vecindad de focos necróticos de riñón. En un trabajo experimental (45) con gallinas de postura inoculadas con la cepa A/pollo/Alabama/7395/75 (H4N8) se menciona trombosis de capilares sanguíneos de pulmón en 1 de 5 aves.

Se ha señalado que los pollos afectados con virus de influenza aviar de baja virulencia aislados de aves acuáticas producen lesiones significativas confinadas a los riñones, y confirmada por datos de química clínica, histopatología, aislamiento viral e inmunohistoquímica (22, 44, 47, 49) mientras que los de alta virulencia pueden o no tener propiedades de nefrotropismo y nefropatogenicidad (1, 28). En este estudio, el grave daño renal encontrado, es indicio claro del nefrotropismo y nefropatogenicidad, incluso imputable como causa de muerte en muchas de las aves por insuficiencia renal aguda, que por sí sólo ya se ha señalado como causa de muerte (48). Sin embargo, las lesiones renales también pueden asociarse a colapso circulatorio como parte de la respuesta inflamatoria sistémica ante una viremia grave, a pesar de la detección viral por RT-PCR, pues su presencia no excluye la posibilidad de un mecanismo secundario.

Los hallazgos en sistema nervioso central concuerdan con lo citado para los virus altamente virulentos (1, 8, 12, 39). La espongirosis de la sustancia blanca ya ha sido reportada (1), sin embargo, en este estudio es difícil valorarla, ya que se sabe que los cambios postmortem en sistema nervioso incluyen: separación de la capa molecular de la capa granular del cerebelo, espacios alrededor de vasos sanguíneos y espacios claros en sustancia blanca con apariencia de agujeros de sacabocados (39).

En hígado, salvo por la linfo necrosis, junto con el pulmón son los órganos menos afectados (ver cuadro 2). La esteatosis hepática bien puede ser reflejo de la anorexia, la cual ocasiona una movilización de las grasas del tejido adiposo, al pasar mayores cantidades de ácidos grasos al hígado, los que son dirigidos para la síntesis de triglicéridos, o bien, como parte de las alteraciones producidas en el colapso circulatorio (9).

En bazo además de la marcada linfo necrosis se contó con la presencia de grupos de células plasmáticas con cuerpos de Russell, las cuales representan células plasmáticas reactivas que poseen una activa síntesis de inmunoglobulinas (9).

En páncreas a diferencia de lo referido por otros autores (1, 12, 39, 49) también se encontró daño en los islotes pancreáticos.

Por el tropismo antes señalado de este virus para el sistema inmune, la bolsa de Fabricio también se vio gravemente afectada (ver cuadro 2), la cual presentó además formaciones quísticas intraepiteliales, ya informadas por otros autores (49), y necrosis del epitelio.

En cresta no se encontró la formación de las grandes vesículas señaladas por varios autores (1, 39) y con la diferencia de la presencia de vasculitis, que explica la cianosis y necrosis en cresta y barbillas.

El daño intestinal, en este caso la porción terminal de intestino delgado (íleon) al parecer es más grave que lo mencionado por otros autores (1, 12, 21, 22, 28, 45, 52).

Las lesiones en tonsilas cecales refuerzan lo mencionado en torno a la grave destrucción linfoide que es capaz de producir esta cepa viral. La presencia de "abscesos crípticos" intestinales ya ha sido mencionada (49), pero no se asoció al virus de influenza, aunque se podría considerar que en el daño al sistema inmune favorece la entrada de algún germen oportunista.

En resumen, podemos decir que las principales lesiones histopatológicas causadas por el virus de influenza A/Ck/Qro./20/95 incluyeron: destrucción del tejido linfoide, vasculitis, necrosis tubular aguda, encefalitis no supurativa y en general áreas focales o multifocales de necrosis en los órganos estudiados. Las principales diferencias con otras cepas altamente virulentas Peste de las aves (H7N7), Ck/Scot/59 (H5N1), Tern/S.A./61 (H5N3), Ty/Ont/66 (H5N9) y Ck/Penn/83 (H5N2) son: notable alta frecuencia de daño vascular, nefropatogenicidad, necrosis en islotes pancreáticos, y destrucción extensa y grave del tejido linfoide. El conjunto de éstos hallazgos le confieren a la cepa bajo estudio características propias distintivas.

Por otra parte, contrariamente a lo que se esperaba, al usar el par de oligonucleótidos SupEx5 e In3 en RT-PCR, no se obtuvo la banda de 476 pb con la cepa apatógena A/Ck/México/294/94²⁰, pero si la banda que corresponde a la cepa virulenta (A/Ck/Qro./20/95) de 488 pb. El oligonucleótido responsable de las diferencias observadas entre la cepa apatógena y la virulenta es SupEx5 (base 614-631), ya que el otro oligonucleótido, In3, funciona bien como cebador de la reacción junto con el oligonucleótido In5 sobre la cepa apatógena. En la región reconocida por el oligonucleótido SupEx5, la cepa apatógena difiere en una base: TGG-GGA-ATC-CAT-CAC-CCT. Una diferencia de un nucleótido en el extremo 3', podría ser suficiente para justificar la incapacidad del oligonucleótido seleccionado para hibridizar, pero no una diferencia de un nucleótido interno, como en este caso, por lo que habría que volver a secuenciar esta región.

Los resultados de RT-PCR prueban el uso potencial de esta técnica para estudios retrospectivos con material fijado en formalina e incluido en parafina, uso que se reafirma con el trabajo de Taubenberger *et al.*, quienes caracterizaron el virus de la influenza "española" de 1918, de muestras de pulmón incluidas en parafina (51). Asimismo se comprobó, por RT-PCR, la presencia del virus influenza altamente virulento en pulmón, SNC y riñón de las aves inoculadas con casi todas las dosis del inoculo viral que se emplearon, entre 10 a 10⁸ DLP₅₀, lo cual es indicativo de que el virus se replica en estos tejidos y así los cambios patológicos observados pueden ser atribuidos a la replicación del virus, sin excluir la posible participación de otros

²⁰ Esta cepa con el número 294 de la CPA corresponde a la cepa A/Ck/México/31381-7/94, con número de acceso U37181 (MVZ Pedro Paz, comunicación personal).

mecanismos indirectos. El resultado negativo en S.N.C. del lote 8 (10 DLP₅₀) sin lesión histopatológica, sugiere que efectivamente el virus no está presente. Mientras que el resultado negativo en riñón comparado con los hallazgos histopatológicos sugieren que el virus bien podría estar aunque en muy pequeñas cantidades, por lo que se podría estar trabajando en el límite de sensibilidad de la prueba. Esto no quiere decir que no se considere a la técnica de RT-PCR muy sensible, sino que se está considerando una pérdida de sensibilidad por tratarse de tejido incluido en parafina, donde el material genético sufre degradación (18, 44).

Por otra parte, los altos títulos virales empleados en este estudio no permitieron determinar la cantidad mínima necesaria de inóculo viral que resultara en cambios histopatológicos en los diferentes órganos.

La demostración de que la técnica de RT-PCR es aplicable a la detección del virus de influenza en tejidos incluidos en parafina abre la posibilidad de hacer estudios retrospectivos, en los que potencialmente se podría inclusive identificar a la cepa infectante por secuenciación de ácidos nucleicos. Asimismo, esta capacidad de detección de virus resulta atractiva para el estudio de la patogenia de la enfermedad, sobre todo con material fresco que garantiza mayor sensibilidad.

V. LITERATURA CITADA

1. Acland, H.M., Silverman, B.L.A. and Eckriadem R.J.: Lesions in broiler and layer in an outbreak of highly pathogenic avian influenza virus infection. *Vet. Pathol.*, 21: 564-569 (1984).
2. Alexander, D.J., Parsons, G. and Manvell, R.J.: Experimental assessment of the pathogenicity of eight avian influenza A viruses of H5 subtype for chickens, turkeys, ducks, and quail. *Avian Pathol.*, 15: 647-662 (1986).
3. Ausubel, F.M. et al. (eds.): Current protocols in molecular biology. Chapter 14. *John Wiley & Sons, Inc.* 1994.
4. Blackbourn, D.V., Chuang, L.F., Sutjipto, S., Killam, K.F., McCready, P.M., Doi, R.H., Li, Y. and Chuang, R.Y.: Detection of simian immunodeficiency virus RNA from infected rhesus macaques by the polymerase chain reaction. *J. Viral. Methods*, 37: 109-118 (1992).
5. Brown, C.C., Olander, H.J. and Semme, D.A.: A pathogenesis study of highly pathogenic avian influenza virus H2N2 in chickens, using immunohistochemistry. *J. comp. Path.*, 107: 341-348 (1992).
6. Camacho, F.E., González, J. y Soto, P.E.: Análisis de la presentación de la IA de baja patogenicidad en pollo de engorda en el Valle de México. Memorias de la XX Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Acapulco, Guerrero. 1995. 8-11. *ANECA*. Acapulco, Guerrero, México. (1995).
7. Casaubon, M.T., Hernández, M.A., García, G.J. y Rosales, M.M.L.: Estudio morfológico y consideraciones sobre la evolución de las lesiones cutáneas por 5 aislamientos de virus de influenza aviar (I.A.) en México. Memorias de la XXI convención anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas & Proceeding of the forty-fifth Western Poultry Disease Conference. Cancún, México. 1996. 48-50. *ANECA & WPDC*. Cancún, México. (1996).

8. Comité de Enfermedades Exóticas de la Asociación de Sanidad de los Estados Unidos: Enfermedades exóticas de los animales su prevención, diagnóstico y control. *Comisión México-Americana para la Prevención de la Fiebre Aftosa*. México, D.F. 1986. pp. 242-251.
9. Cotran, R.S., Kumar, V. and Robbins, S.L.: Patología estructural y funcional. 4ta. ed. *Interamericana/McGraw-Hill*. México, D.F. 1990.
10. CPA-SAGAR. Diagnóstico Serológico de Influenza Aviar. *CPA-SAGAR*. México, marzo 08, 1995.
11. DINESA, Boletín No. 10: Influenza aviar. *Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Dirección General de Salud Animal*. 1995.
12. Easterday, B.C. and Hinshaw, V.S.: Influenza. In: *Diseases of Poultry*. 9th ed. Edited by: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., Reid, W.M., Yorder, H.W., 532-551. *Iowa State University Press*, Ames, Iowa, 1991.
13. Eckroade, R.J. y Davison, S.A.: Influenza: Epidemiología e impacto sobre la industria avícola mundial. *Memorias del VI Seminario Internacional de Patología Aviar AMEVEA*. Athens, Georgia. 1986. 261-274. *Universidad de Georgia*, Athens, Georgia, (1986).
14. Fenner, F.J., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Rott, R., Studden, M.J. and White, D.O.: *Veterinary virology*. 2nd. ed., 511-522. *Academic Press, Inc*. New York, 1993.
15. Fraire, C.M. y Paz, R.P.: Aislamientos en México del virus de influenza aviar. *Memorias de la XX convención anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas*. Acapulco, Guerrero. 1995. 97-99. *ANECA*. Acapulco, Guerrero, México. (1995).

16. García, G.J. y Méndez, O.M.: Estudio sobre algunas características de los virus de influenza aviar de baja patogenicidad aislados en México, de enero a septiembre de 1994. Memorias de la XXI convención anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas & Proceeding of the forty-fifth Western Poultry Disease Conference. Cancún, México. 1996. 295-296. ANECA & WPDC. Cancún, México. (1996).
17. Gay, G.M., Soto, P.E. y Merino, B.J.: Aislamiento e Identificación del Virus de la Influenza Aviar en México. Sexto curso de actualización Avi-Mex. Ciudad de México. 1994. 77-83. Laboratorio Avimex, S.A. México, D.F. (1994).
18. Gruber, A.D., Greiser-Wilke, I.M., Haas, L., Hewicker-Trauwein, M. and Moennig, V.: Detection of bovine viral diarrhoea virus RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue by nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 43: 309-320 (1993).
19. Hilton, D.A., Variend, S. and Pringle, J.H.: Demonstration of coxsackie virus RNA in formalin-fixed tissue sections from childhood myocarditis cases by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *J. Pathol.*, 170: 45-51 (1993).
20. Hinshaw, V.S., Olsen, C.W., Dybdahls, S.N. and Evans, D.: Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J. Virol.*, 68 (6): 3667-3673 (1994).
21. Hooper, P.T.: Lesions in chickens experimentally infected with 1985 H7N7 avian influenza virus. *Aust. Vet. J.*, 66 (5): 155-156 (1989).
22. Hooper, P.T., Russell, G.W., Selleck, P.W. and Stanislawek, W.L.: Observations on the relationship in Chickens between the virulence of some Avian Influenza Viruses and their pathogenicity for various organs. *Avian Dis.*, 39: 458-464 (1995).
23. Horimoto, T. and Kawoka, Y.: Direct reverse transcriptase PCR to determine virulence potential of influenza A viruses in birds. *J. Clin. Microbiol.*, 33 (3): 748-751 (1995).

24. Horimoto, T., Ito, T., Alexander, D.J. and Kawaoka, Y.: Cleavability of hemagglutinin from an extremely virulent strain of avian influenza virus containing a unique cleavage site sequence. *J. Vet. Med. Sci.*, 57 (5): 927-930 (1995).
25. Horimoto, T., Nakayama, K., Smeekens, S.P. and Kawaoka, Y.: Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *J. Virol.*, 68 (9): 6074-6078 (1994).
26. Horimoto, T., Rivera, E., Pearson, J., Senne, D., Krauss, S., Kawaoka, Y. and Webster, G.: Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in México. *Virol.*, 213: 223-230 (1995).
27. Jackson, D.P., Quirke, P., Lewis, F., Boylston, A.W., Sloan, J.M., Robertson, D. and Taylor, G.R.: Detection of measles virus RNA in paraffin-embedded tissue. *Lancet*, 1: 1391 (1989).
28. Jungherr, E.L., Tyzzer, E.E., Brandly, C.A. and Moses, H.E.: The comparative pathology of fowl plague and newcastle disease. *Am. J. Vet. Res.*, 7: 250-288 (1946).
29. Kwok., S. and Kiguchi, R.: Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339: 237-238 (1989).
30. Lau, G.K.K., Fang, J.W.S., Wu, P.C., Davis, G.L. and Lai, Y.N.: Detection of hepatitis C virus genome in formalin-fixed paraffin-embedded liver tissue by in situ reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.*, 44: 406-409 (1994).
31. López, C.R.: Efecto de un virus de I.A. de baja patogenicidad (VIABP) sobre parámetros productivos de aves reproductoras pesadas. Memorias de la XXI convención anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas & Proceeding of the forty-fifth

Western Poultry Disease Conference. Cancún, México. 1996. 44-46. *ANECA & WPDC*. Cancún, México. (1996).

32. Luna, L.G.: Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. *Mc-Graw-Hill*, New York, 1968.

33. Mies, C.: A simple, rapid method for isolation RNA from paraffin-embedded tissues for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *J. Histochem. Cytochem.*, 42 (6): 811-813 (1994).

34. Mohanty, S.B. y Dutta, S.K.: *Virología Veterinaria*. Ed. *Interamericana*, México, D.F. 1983.

35. Mullis, K.B., Faloona, F., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T. and Erlich, H.A.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273 (1986).

36. Murphy, B. R. and Webster, R.G.: Orthomyxoviruses. In: *Fields Virology*. Edited by Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., *et al.*, 1397-1445. *Lippincott - Raven Publishers*, Philadelphia, 1996.

37. Oberst, D.R., Hays, P.M., Evermann, F.J. and Kelling, L.C.: Characteristic differences in reverse transcription-polymerase chain reaction products of ovine, bovine, and human respiratory syncytial viruses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5: 322-328 (1993).

38. Remick, D.G., Kunkel, S.L., Holbrook, E.A. and Hanson, C.A.: Theory and Applications of the Polymerase Chain Reaction. *Am. J. Clin. Pathol.*, 93 (4): S49-S54 (1990).

39. Riddell, C.: Avian histopathology. American Association of Avian Pathologists. *Allen Press Inc.* Lawrence, Kansas. 1987.

40. Röhm, C., Zhou, N., Süß, J., Mackenzie, J. and Webster, R.G.: Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: Criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology*, 217: 508-516 (1996).
41. Rosai, J.: Ackerman's surgical pathology. *Mosby*. New York. 1996.
42. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd. ed. Chapter 6, 14. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989.
43. Schorr, E., Wentworth, D. and Hinshaw, S.V.: Use of polymerase chain reaction to detect swine influenza virus in nasal swap specimens. *Am. J. Vet. Res.*, 55 (7): 952-956 (1994).
44. Schwarz, T.F., Zaki, S.R., Morzunov, S., Peters, C.J. and Nichol, S.T.: Detection and sequence confirmation of sin nombre virus RNA in paraffin-embedded human tissues using one-step RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 51: 349-356 (1995).
45. Shalaby, A.A., Slemons, D.R. and Swayne, E.D.: Pathological studies of A/Chickens/Alabama/7395/75 (H4N8) influenza virus in specific-pathogen-free laying hens. *Avian Dis.*, 38: 22-32 (1994).
46. Shibata, D.: Identification of mismatched fixed specimens with a commercially available kit based on the polymerase chain reaction. *Anat. Pathol.*, 100 (6): 666-670 (1993).
47. Slemons, R.D. and Swayne, D.E.: Replication of a waterfowl-origin influenza virus in the kidney and intestine of chickens. *Avian Dis.*, 34: 277-284 (1990).
48. Swayne, D.E., Radin, M.J., Hoepf, T.M. and Slemons, R.D.: Acute renal failure as the cause of death in chickens following intravenous inoculation with avian influenza virus A/Chickens/Alabama/7395/75 (H4N8). *Avian Dis.*, 38: 151-157 (1994).

49. Swayne, D.E. and Slemons, R.D.: Renal pathology in specific-pathogen-free chickens inoculated with a waterfowl-origin type A influenza virus. *Avian Dis.*, 34: 285-294 (1990).
50. Tashiro, M., Ciborowski, P., Klenk, H.D., Pulverer, G. and Rott, R.: Role of staphylococcus protease in the development of influenza pneumonia. *Nature*, 325: 536-537 (1987).
51. Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Krafft, A.E., Bijwaard, K. E. and Fanning, T. G.: Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science*, 275: 1793-1796 (1997).
52. Van Campen, H., Easterday, B. C. and Hinshaw, V.S.: Destruction of lymphocytes by a virulent avian influenza A virus. *J. gen. Virol.*, 70: 467-472 (1989).
53. Van Campen, H., Easterday, B. C. and Hinshaw, V.S.: Virulent avian influenza A virus: Their effect on avian lymphocytes and macrophages in vivo and in vitro. *J. gen. Virol.*, 70: 2887-2895 (1989).
54. Wang, M., Webster, R.G.: Lack of persistence of influenza virus genetic information in ducks. *Arch. Virol.*, 11: 263-267 (1990).
55. Westbury, H.A.: Avian Influenza. *Aust. Vet. J.*, 66 (12): 427-428 (1989).
56. WHO memorandum: A revision of the system of nomenclature for influenza viruses. *Bull WHO*, 58: 585-591 (1980).
57. Wright, K.E., Wilson, G.A.R., Novosad, D., Domick, C., Tan, D. and Weber, J.M.: Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 33 (5): 1180-1184 (1995).

58. Wright, P.A. and Wynford-Thomas, D.: The Polymerase Chain Reaction: Miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *J. Pathol.*, 162: 99-117 (1990).

59. Yamada, A., Imanishi, J., Nakajima, E., Nakajima, K. and Nakajima S.: Detection of influenza viruses in throat swab by using polymerase chain reaction. *Microbiol., Immunol.*, 35: 259-265 (1991).

Cuadro No. 1. Mortalidad en pollos Arbor Acres de 5 semanas de edad tras la aplicación de 0.2 ml de líquido alantoideo infeccioso, virus de influenza aviar A/Ck/Querétaro/20/95 (H5N2) por vía endovenosa.

Dilución								
d.p.	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
1	7	2	1	0	0	0	0	0
2	3	4	2	2	6	3	3	1
3		2	1	0	1	1	0	2
4		1	1	1	1	0	0	0
5		1	4	7	0	4	1	0
6			0		2	1	3	3
7			0				1	1
8			1					0
9								0
10								1
total	10	10	10	10	10	9	8	8

d.p. = días postinoculación.

$$\text{Log}_{10} \text{ de DLP}_{50} = L - d (s - 0.5)$$

donde L = Log₁₀ de la dilución de virus más concentrada sometida a prueba

d = Log de factor de dilución

s = suma de las proporciones de mortalidad

$$= -1 - 1 (7.5 - 0.5)$$

$$= -8.0$$

El título del virus es 10⁸ DLP₅₀/0.2 ml o 10^{8.7}/ml.

Cuadro 2. Clasificación de lesiones histopatológicas dependiendo de su extensión o abundancia en normal (1), discreta (2), moderada (3) o grave (4) de 80 aves, en ocho lotes, inoculadas con diluciones decuples de líquido alantoideo infeccioso con el virus de influenza aviar.

Órganos ¹													
DLP ₅₀	d.p.	Pulmón	Riñón	S.N.C.	Hígado	Bazo	Páncreas	B.F.	Cresta	I.D.	T.C.		
1.00E+08	1	o.p.	3	2	2	3	3	3	2	3	3	3	3
1.00E+08	1	3	2	2	2	3	o.p.	3	3	2	3	3	3
1.00E+08	1	3	3	2	2	3	2	3	3	3	3	3	3
1.00E+08	1	2	2	2	2	3	2	3	2	2	2	2	2
1.00E+08	1	3	o.p.	2	2	3	2	3	2	2	2	2	2
1.00E+08	1	o.p.	3	2	2	3	2	3	2	2	2	2	3
1.00E+08	1	3	2	2	2	3	2	3	2	2	2	2	3
1.00E+08	2	2	3	3	2	3	3	4	3	3	3	3	3
1.00E+08	2	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3
1.00E+08	2	2	3	3	2	3	3	3	3	3	4	4	4
1.00E+07	1	2	2	2	2	3	2	3	2	2	2	2	3
1.00E+07	1	2	3	2	2	3	2	3	2	2	2	2	2
1.00E+07	2	3	3	2	2	3	2	3	2	2	2	2	3
1.00E+07	2	2	3	2	2	3	3	3	2	2	3	3	3
1.00E+07	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2
1.00E+07	2	2	3	2	2	o.p.	2	3	3	3	3	3	3
1.00E+07	3	2	3	3	3	2	o.p.	3	3	4	3	o.p.	3
1.00E+07	3	2	2	4	2	3	3	2	4	2	2	2	2
1.00E+07	4	2	2	4	3	3	o.p.	3	3	3	3	3	3
1.00E+07	5	2	3	4	3	4	2	o.p.	4	2	2	2	2
1.00E+06	1	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2
1.00E+06	2	2	3	2	2	4	3	2	3	3	3	3	3
1.00E+06	2	o.p.	o.p.	2	2	3	o.p.	3	2	2	2	o.p.	3
1.00E+06	3	3	3	3	3	4	2	4	4	4	2	3	3
1.00E+06	4	3	4	4	2	3	3	o.p.	4	2	2	2	2
1.00E+06	5	3	4	4	2	4	4	4	4	4	3	4	4
1.00E+06	5	3	4	4	2	3	3	3	4	2	2	2	2
1.00E+06	5	2	3	4	2	3	2	3	3	3	3	2	2
1.00E+06	5	3	4	4	2	4	4	4	4	4	4	3	3
1.00E+06	8	2	3	4	2	3	2	2	3	2	2	2	2
1.00E+05	2	2	2	2	3	3	2	3	3	3	3	3	3
1.00E+05	2	o.p.	o.p.	o.p.	o.p.	o.p.	o.p.	o.p.	o.p.	o.p.	o.p.	o.p.	3
1.00E+05	4	o.p.	o.p.	3	2	4	2	2	4	o.p.	3	3	3
1.00E+05	6	2	3	4	2	4	2	2	4	2	2	2	2
1.00E+05	6	3	3	4	2	3	2	2	4	2	2	2	2
1.00E+05	6	2	2	4	2	3	2	2	3	2	2	1	1
1.00E+05	6	2	o.p.	4	2	3	2	3	3	3	2	2	2
1.00E+05	6	2	3	4	2	3	3	3	4	2	2	1	1
1.00E+05	6	3	2	4	2	3	4	2	4	2	2	2	2
1.00E+05	6	2	3	4	3	3	2	3	4	2	2	2	2
1.00E+04	2	o.p.	2	3	2	3	o.p.	3	2	2	2	2	2

continua ...

INFLUENZA AVIAR: DIAGNÓSTICO POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR) E HISTOPATOLOGÍA EN AVES INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE

... continuación

DLP ₅₀	d.p.	Pulmón	Riñón	S.N.C.	Higado	Bazo	Páncreas	B.F.	Cresta	I.D.	T.C.
1.00E+04	2 o.p.		4	2	3	3 o.p.		3	2	3	3
1.00E+04	2 o.p.		3	2	2	3	2	2	2	2	4
1.00E+04	2	2	2	2	2	3 o.p.		3	2	2	4
1.00E+04	2	2	2	2	2	3	3	3	2 o.p.	o.p.	
1.00E+04	2 o.p.	o.p.		2	2 o.p.	o.p.		3	2	2	3
1.00E+04	3	3	4	2	2	4	3	3	4	3 o.p.	
1.00E+04	4	3	4	2	3	4	3	3	4	3 o.p.	
1.00E+04	6	2	3	4	3	4	3	2	4	2	2
1.00E+04	6	3	3	4	3	3	2	3	4	3	2
1.00E+03	2 o.p.	o.p.		2	2 o.p.	o.p.		2	2	2 o.p.	o.p.
1.00E+03	2	2	3	2	3 o.p.		2	4	2 o.p.	o.p.	
1.00E+03	2	2	2	2	3 o.p.	o.p.		2	2	2	2
1.00E+03	3	2	3	2	3	3	3	4	3	3	3
1.00E+03	5	2 o.p.		4	3	3	3	3	4	2	2
1.00E+03	5	2	2	4	2	3	3	3	4	2	1
1.00E+03	5	2	3	4	3	3 o.p.		4	4	3	2
1.00E+03	5	2	3	4	2	3	3	3	4	2	1
1.00E+03	6	2	2	4	3	3	3	3	4	2	2
1.00E+03	15	2	2	4	2	1	2	2	3	2	1
1.00E+02	2	2	3	2	3	3	3	3	2	2	2
1.00E+02	2	2	2	2	2	4 o.p.		2	2	2	3
1.00E+02	2	2	2	2	2	4 o.p.		3	2	2	2
1.00E+02	5	2	2	4	2	3	4	3	3	2	2
1.00E+02	6	2	3	4	2	2	2	3	4	2	2
1.00E+02	6 o.p.		3	4	2	3	4 o.p.		4	2 o.p.	
1.00E+02	6	2	3	4	3	3	3	3	3	2	2
1.00E+02	7 o.p.		4	4	3	3	2	3	4	3	3
1.00E+02	15	2	2	4	2	1	2	2	2	2	1
1.00E+02	15	2	3	4	3	1	2	2	2	2 o.p.	
1.00E+01	2 o.p.		3	2	3	3	2	3	2	4	3
1.00E+01	3	3	3	2	2	3	2	3	2	3	3
1.00E+01	3	3	3	2	2	4	4	4	2	3	3
1.00E+01	6	2	2	4	2	3	3	3	3	2	2
1.00E+01	6	3	3	4	2	3	3	3	3	3	2
1.00E+01	6	2	2	4	3	3	2 o.p.		4	2	1
1.00E+01	7 o.p.		3	4	3	4	4	3	4	4	2
1.00E+01	10	4	3	4	2	3	3	2	2	4	3
1.00E+01	15	2	2	3	3	2 o.p.		1	2	2	1
1.00E+01	15	2	2	1	2	2	2	1	2 o.p.	o.p.	
		2.3182	2.75	3	2.3038	3.0685	2.575758	2.8	2.9494	2.4267	2.3768

¹ Órganos: S.N.C., sistema nervioso central; B.F., bolsa de Fabricio; I.D., intestino delgado; T.C., tonsilas cecales.

d.p. = días postinfección

o.p. = observación perdida

Cuadro No. 3. Resultados en gel de poliacrilamida de los productos de RT-PCR para una muestra para cada una de las ocho diluciones empleadas de pulmón, sistema nervioso central y riñón.

Dosis Letales en Pollo 50%								
Órgano	10 ⁸ D	10 ⁷ E	10 ⁶ I	10 ⁵ E	10 ⁴ E	10 ³ G	10 ² E	10 ¹ J
Pulmón	+	+	+	+	+	+	+	+
S.N.C.	+	+	+	+	+	+	+	-
Riñón	+	+	+	+	-	+	+	+

D, E, I, E, E, G, E y J = identificación de las aves.

S.N.C. = sistema nervioso central.

+ = banda de peso molecular esperado en el gel de poliacrilamida o agarosa

- = sin banda en el gel de poliacrilamida o agarosa

* = banda débil



Fig. 1. Ave Arbor Acres inoculada con el virus influenza A/Ck/Querétaro/20/95 (H5N2) donde se aprecia depresión, pluma erizada, ojos semicerrados e hiperemia periorbital, la cual presentó fiebre incipiente (42° C).



Fig. 2. Ave Arbor Acres inoculada con la cepa A/Ck/Querétaro/20/95 (H5N2) de las más afectadas en su apariencia externa, nótese la cara hinchada, cianótico-necrótica, piel congestionada y patas con manchado equimótico intenso.



Fig. 3. Corazón de ave inoculada con virus de influenza aviar altamente virulento. Nótese el puntilleo hemorrágico presente en la grasa pericárdica.



Fig. 4. Hiperemia del Sistema Nervioso Central presente en algunas aves inoculadas con el virus de influenza aviar cepa A/Ck/ Querétaro/20/95.

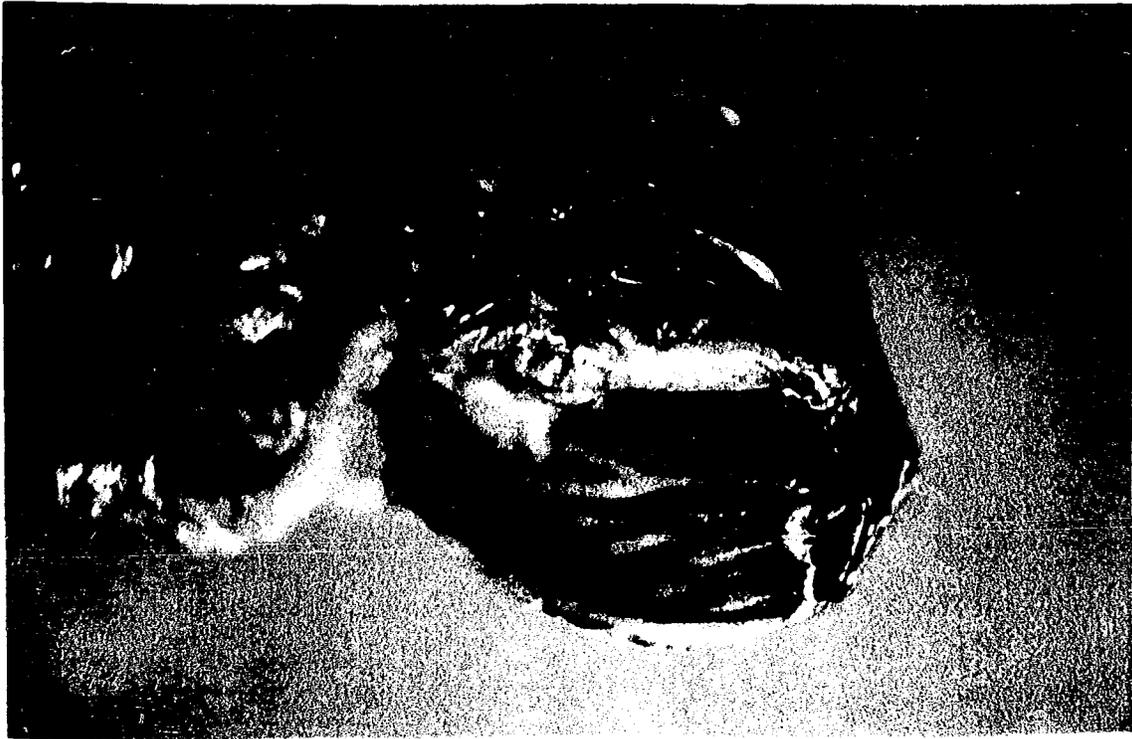


Fig. 5. Influenza aviar. Ventrículo (molleja o estómago muscular) desprovisto de la cutícula donde se aprecian úlceras y hemorragias petequiales y equimóticas.



Fig. 6. Edema subcutáneo en la región tibiotarsal de un ave muerta por influenza aviar.



Fig. 7. Tejido linfático pulmonar (1B). Linfocitosis, algunos heterófilos y un área celular alterna con área hipocelular que exhibe edema. Nótese que las células epiteliales del extremo inferior izquierdo tienen una apariencia normal aunque se aprecia cierto grado de infiltrado. HE x 400.

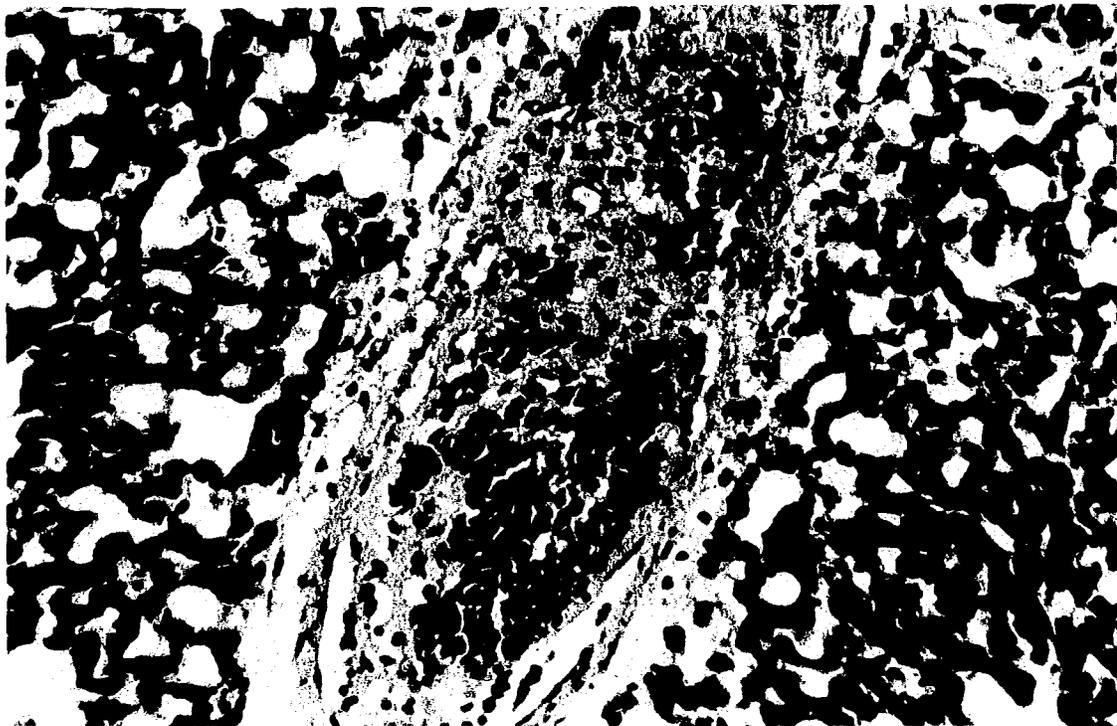


Fig. 8. Sección de pulmón (7G). Trombo fijado a la pared lesionada (necrosis fibrinoide). Nótese la presencia de células mononucleares en la pared (vasculitis) y la acumulación de eritrocitos en los capilares aéreos. HE x 400.

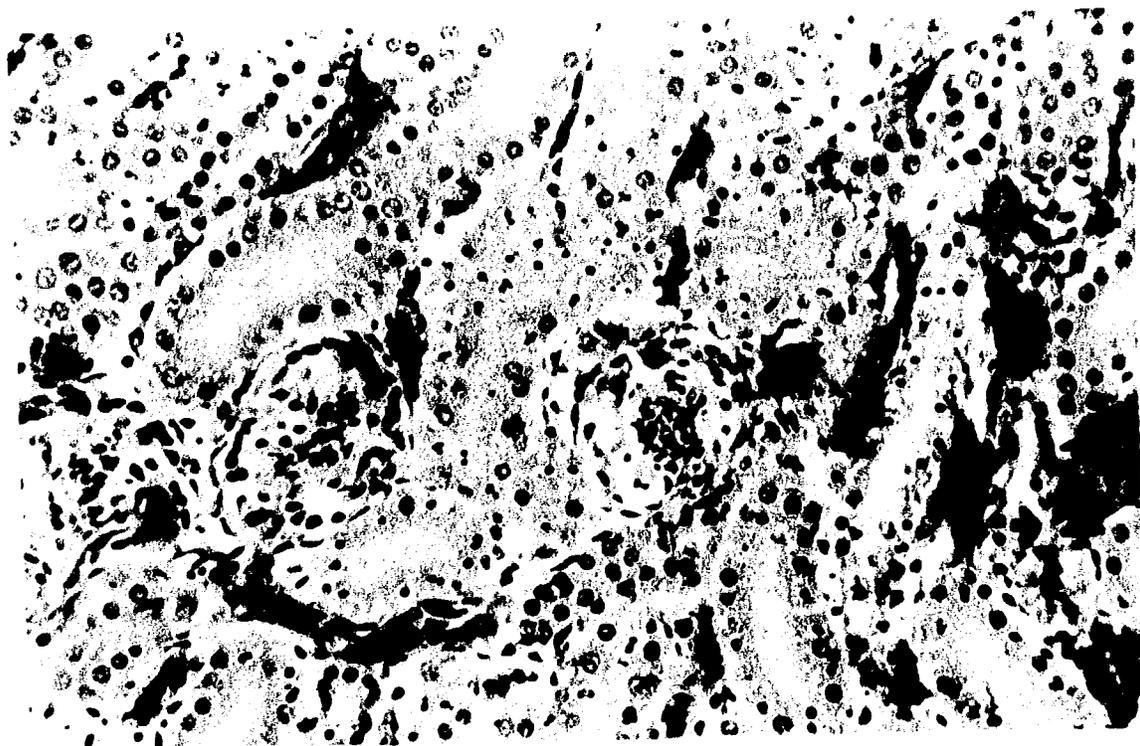


Fig. 9. Corteza renal (4D). Congestión y necrosis tubular. Se aprecia piconosis y cariorrexis en las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales. HE x 400.

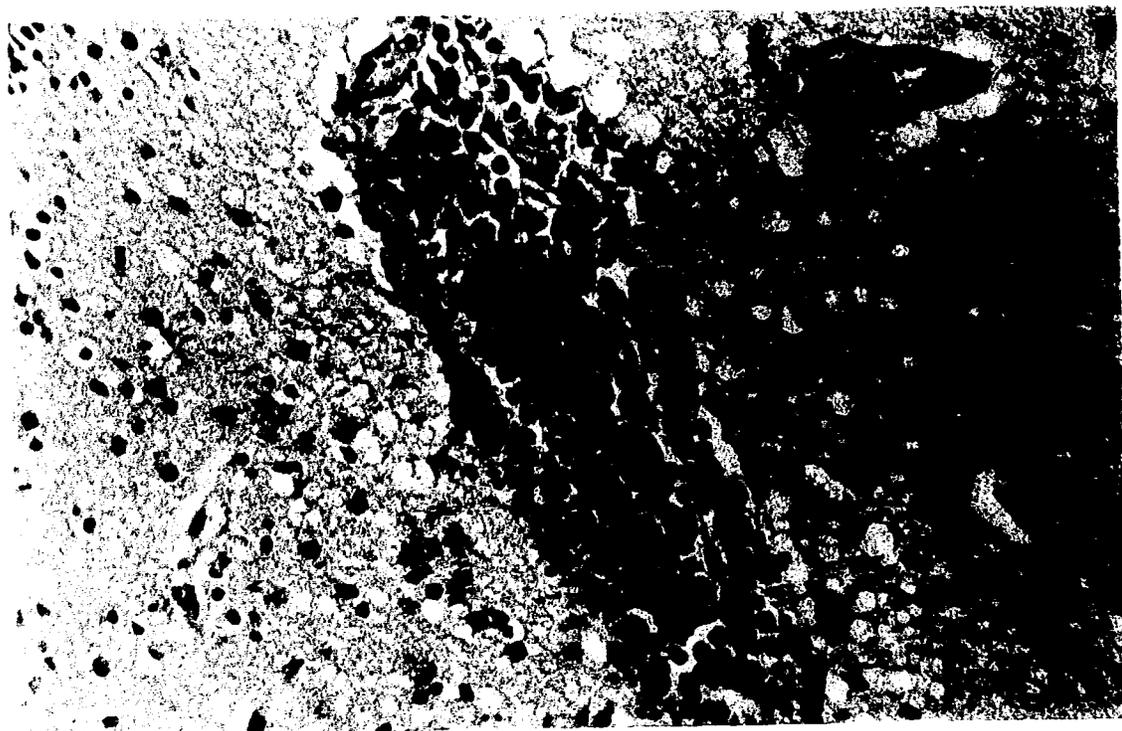


Fig. 10. Sección de SNC (51). Infiltrado inflamatorio mononuclear perivascular (encefalitis no supurativa) y espongiosis de la sustancia blanca. HE x 400.

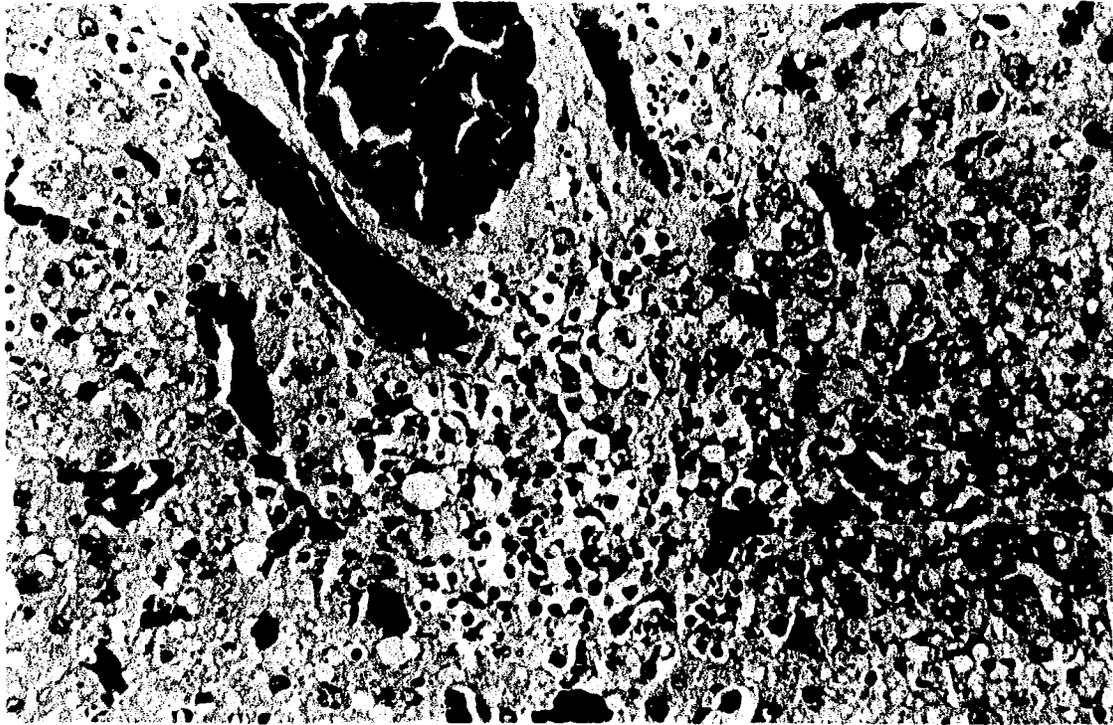


Fig. 11. Hígado (3D). Se observa congestión, esteatosis y un foco de necrosis evidenciada por la presencia de vacuolas, piconosis y cariorexis en hepatocitos y en las células linfoides presentes. HE x 400.

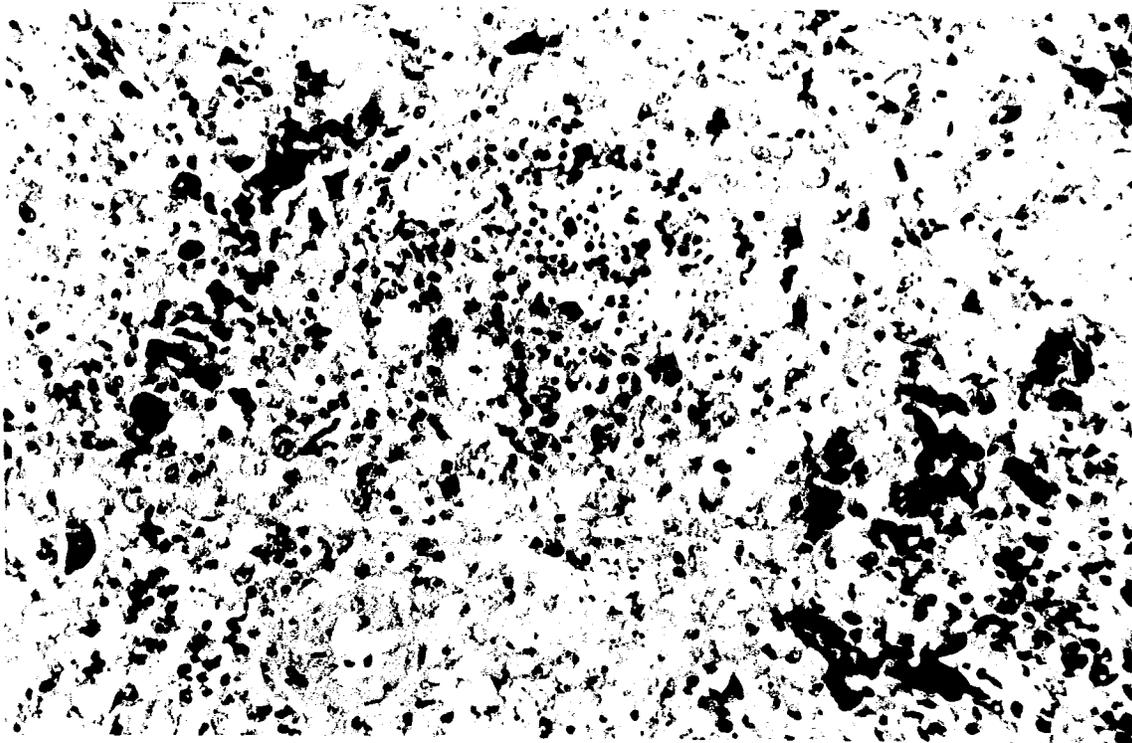


Fig. 12. Linfocitopenia en bazo anémico (2B). HE x 400.

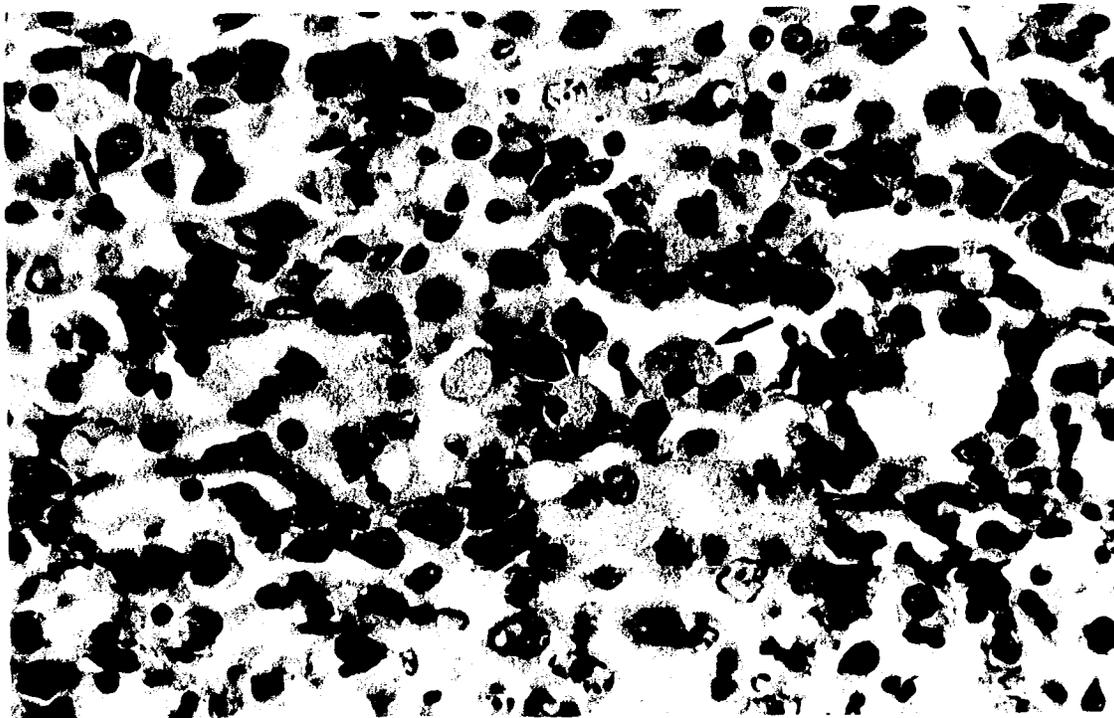


Fig. 13. Sección de bazo (311). Población linfoplasmocitaria, con presencia de células plasmáticas con cuerpos de Russell (flechas) con disminución de la población linfoide. HE x 1000.

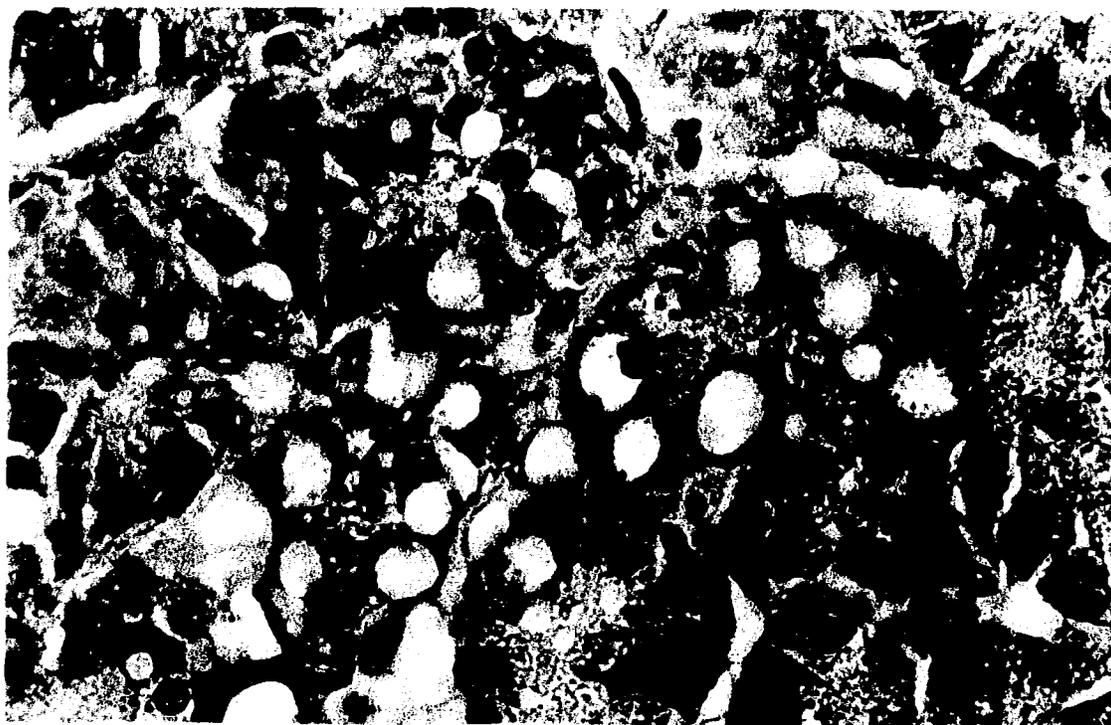


Fig. 14. Páncreas (511). Vacuolización y cariorrhexis en células acinares. HE x 1000.

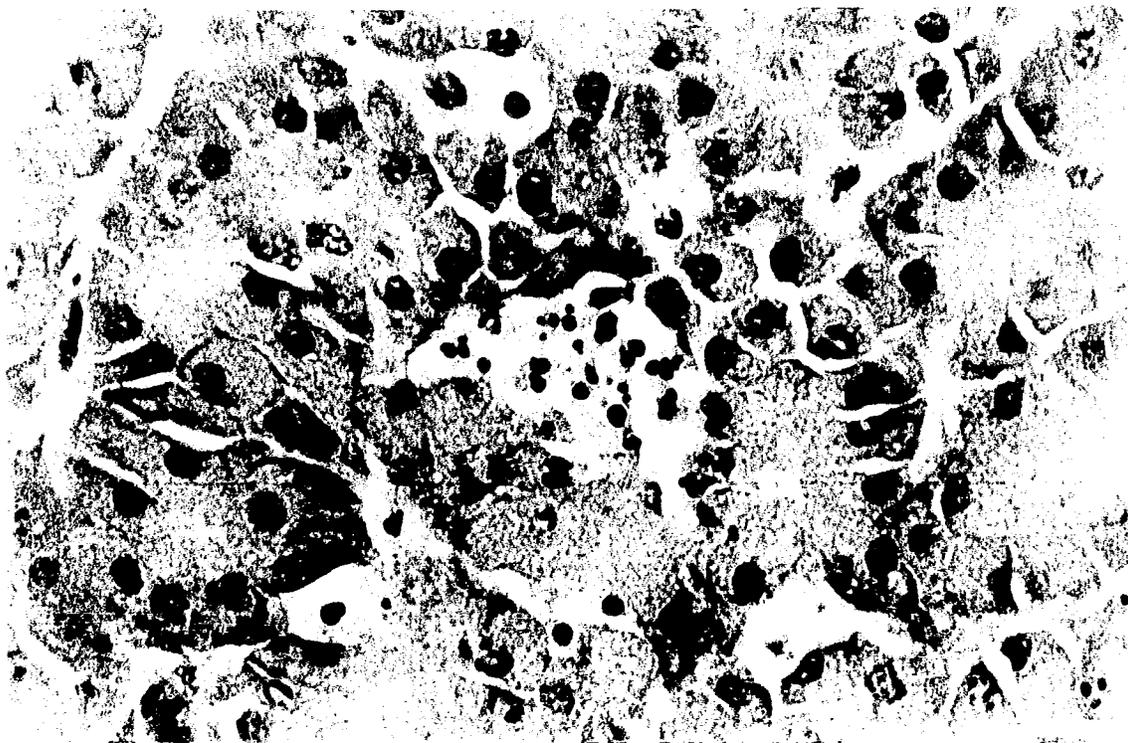


Fig. 15. Islote pancreático beta (511). Pícnosis de células insulares. HE x 1000.



Fig. 16. Bolsa de Fabricio (511). Formación quística en el epitelio pseudo-estratificado, con pícnosis y edema en la lámina propia. HE x 1000.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

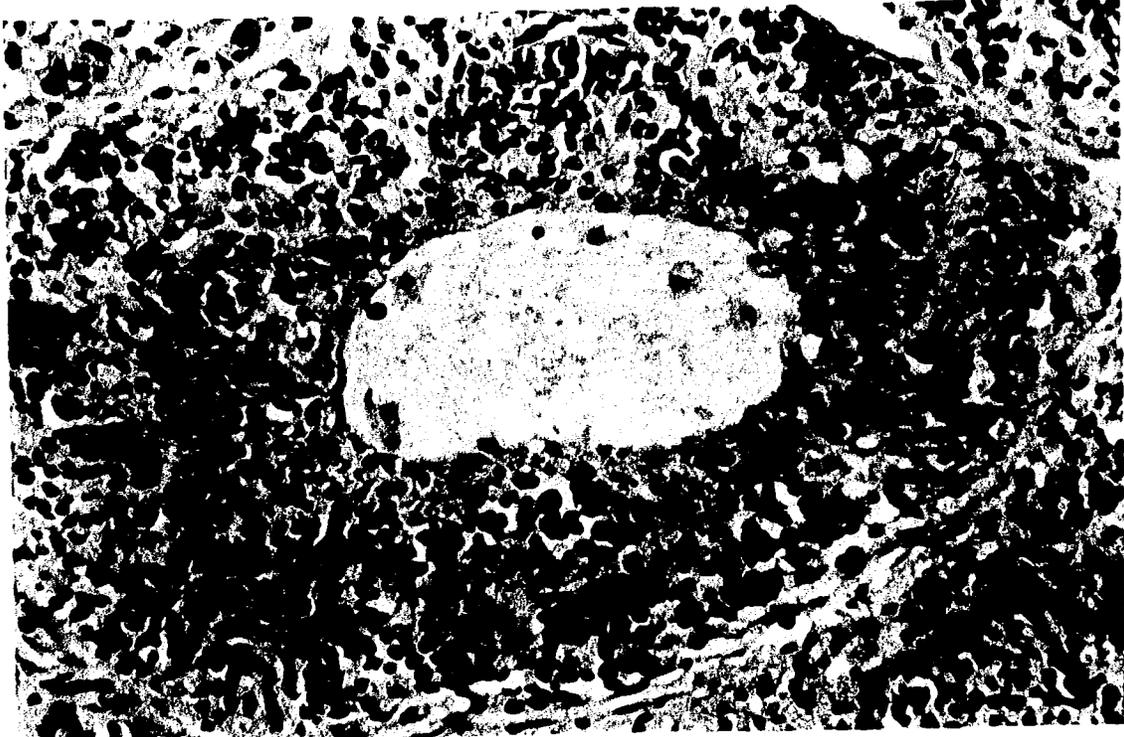


Fig. 17. Bolsa de Fabricio (2G). Formación quística en zona medular con disminución y picnosis linfocitaria. HE x 400.

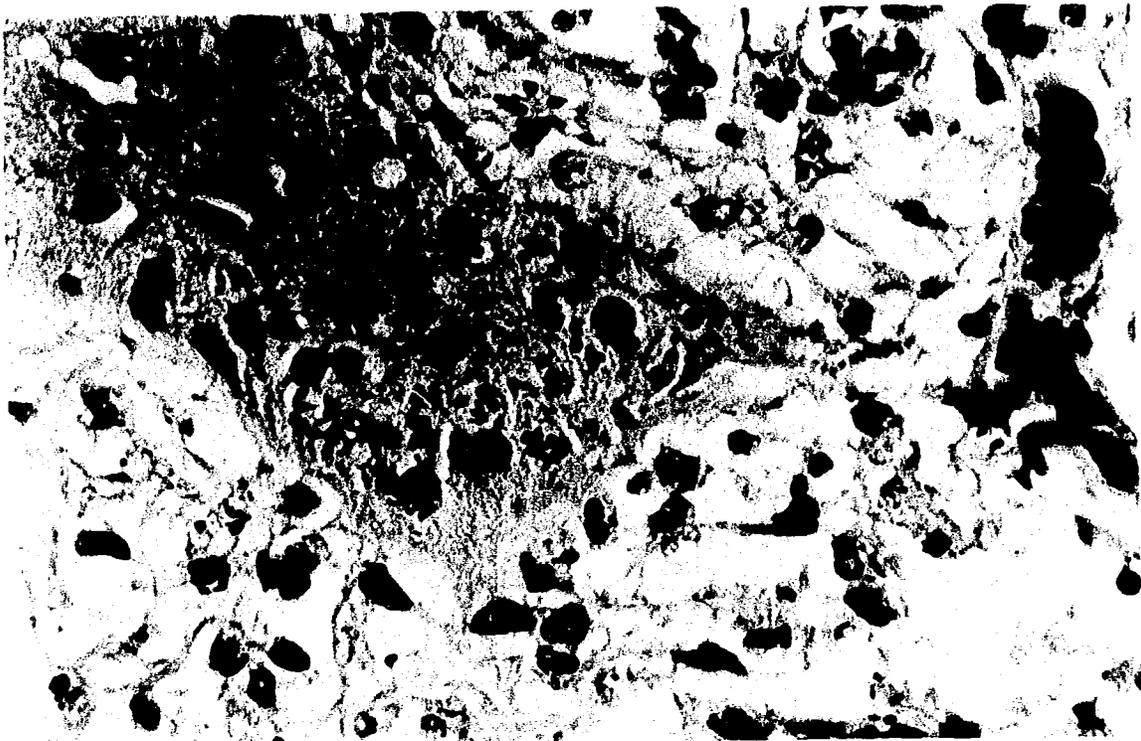


Fig. 18. Sección de cresta (5D). Necrosis incipiente en estrato basal de epidermis, edema e infiltrado heterofílico en capa superficial de dermis. HE x 1000.



Fig. 19. Sección de tonsilas cecales (6D). Aspecto vacuolado con población linfoide escasa y necrótica, así como necrosis de las criptas intestinales. HE x 400.

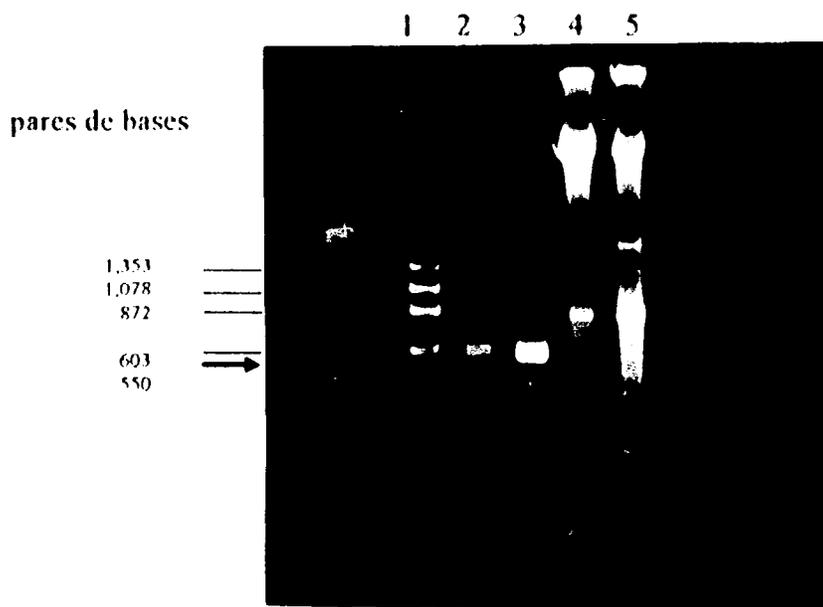


Fig. 20. Gel de agarosa del producto de RT-PCR y ARN de β -actina extraídos con el método de polvo de vidrio con y sin el empleo de solución de sales. Carril (1) ϕ x 174 Hac III (control de peso molecular), (2) RT-PCR sin sal, (3) RT-PCR con sal, (4) ARN sin sal y (5) ARN con sal.

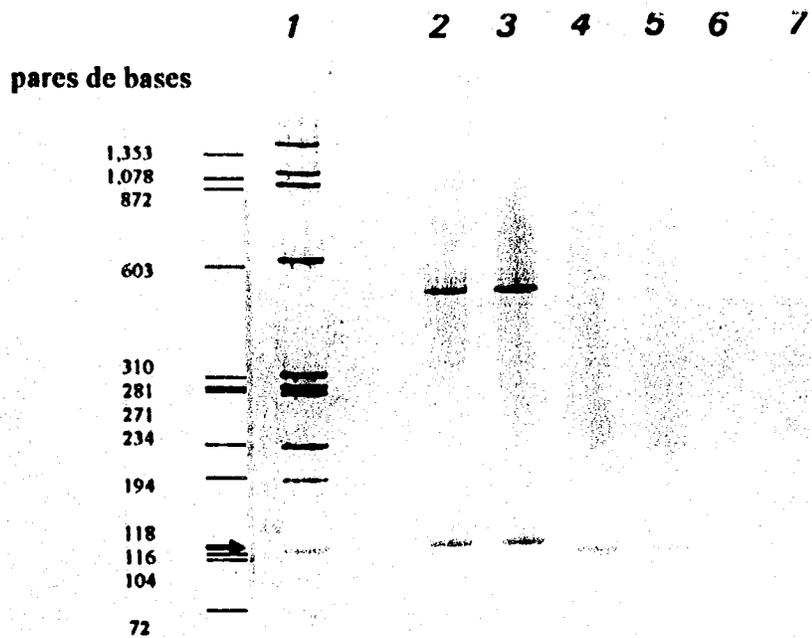


Fig. 21. Resultados de la amplificación RT-PCR de líquido alantoideo infectado con influenza aviar. Carril (1) control de peso molecular (ϕ x 174 Hac III), (2 y 3) líquido alantoideo infeccioso (A/Ck/Qro./20/95), (4 y 5) líquido alantoideo cepa apatógena (A/Ck/México/294/94) y (6 y 7) líquido alantoideo SPF, pares ensayados con 1.5 y 3.0 mM de $MgCl_2$ respectivamente.

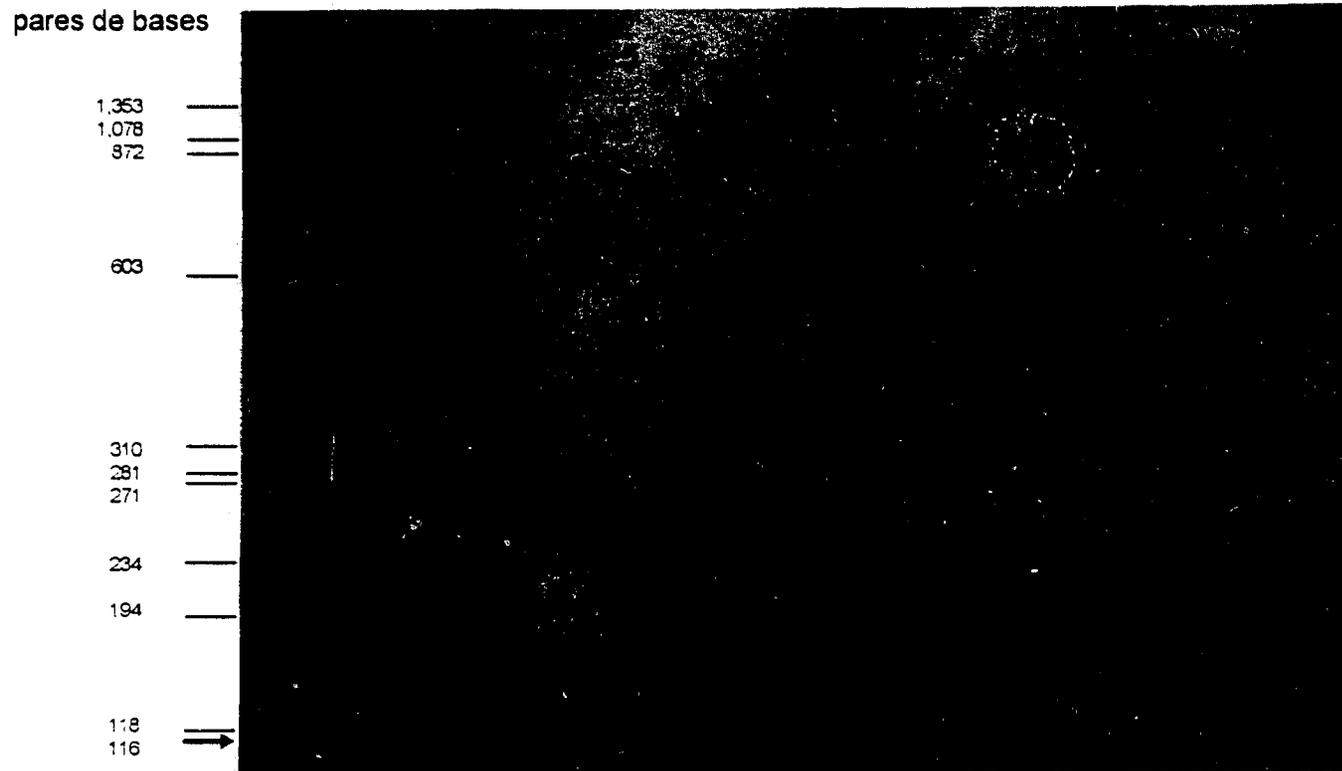


Fig. 22. Gel de poliacrilamida de productos de RT-PCR de muestras incluidas en parafina de aves inoculadas con el virus de influenza aviar. Carril (1) y (13) ϕ x 174 Hac III (control de peso molecular), (2) pulmón 2E, (3) pulmón 7E, (4) control negativo de pulmón, (5) S.N.C. 2E, (6) S.N.C. 7E, (7) control negativo de S.N.C., (8) riñón 1D, (9) riñón 2E, (10) control negativo de riñón. (11) líquido alantoideo infeccioso, (12) líquido alantoideo control negativo.

ANEXO I

Con los siguientes resultados: 22 casos con lesión histopatológica y RT-PCR positivo, un caso con lesión histopatológica pero RT-PCR negativo y un caso sin lesión histopatológica y RT-PCR negativo, aunado a 6 controles negativos, se realizó una prueba estadística de homogeneidad con la prueba exacta de Fisher, a fin de definir si los resultados histopatológicos con lesión y sin lesión son iguales o diferentes en cuanto a la clasificación de positivo y negativo con la técnica de RT-PCR. Los anteriores resultados se separaron por órganos para garantizar la independencia entre las variables, como se muestra a continuación:

Pulmón			Sistema Nervioso Central			Riñón		
H \ RT-PCR	(+)	(-)	H \ RT-PCR	(+)	(-)	H \ RT-PCR	(+)	(-)
con lesión	8	0	con lesión	7	0	con lesión	7	1
sin lesión	0	2	sin lesión	0	3	sin lesión	0	2

H = Histopatología

(+) positivo, detección viral por RT-PCR

(-) negativo, sin detección viral por RT-PCR

Jgo. de hipótesis:

Ho: Los resultados por histopatología y RT-PCR son homogéneos

Ha: Los resultados por histopatología y RT-PCR son heterogéneos

$$\text{Estadístico de prueba: } P = \frac{(a + b)! (c + d)! (a + c)! (b + d)!}{a! b! c! d! N!}$$

donde P = probabilidad de obtener cualquier arreglo particular de las frecuencias a, b, c, y d, y N = número de observaciones en la muestra.

las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0.05$.

P = 0.022, para las muestras de pulmón

P = 0.004, para las muestras de sistema nervioso central

P = 0.033, para las muestras de riñón

Se probó estadísticamente ($p < 0.05$) que las lesiones histopatológicas y los resultados de RT-PCR son heterogéneos; es decir, hay diferencias entre las muestras con lesión y sin lesión por RT-PCR.

ANEXO 2

Con los siguientes resultados: 22 casos con lesión histopatológica y RT-PCR positivo, un caso con lesión histopatológica pero RT-PCR negativo y un caso sin lesión histopatológica y RT-PCR negativo, aunado a 6 controles negativos, se buscó que tanto concuerdan el examen histopatológico y los resultados con la técnica de RT-PCR, aplicando la medida de concordancia Kappa de Cohen.

Histopatología \ RT-PCR	positivo (+)	negativo (-)
con lesión	22	1
sin lesión	0	7

$$\text{Fórmula: } \kappa = \frac{nD - \sum t_i u_i}{n^2 - \sum t_i u_i}$$

donde t_i , u_i son los totales marginales, n es el número total de observaciones y D es la suma de las frecuencias de las casillas de la diagonal.

$$\kappa = 0.91124$$

Lo que significa que existe una alta concordancia entre los resultados por histopatología y RT-PCR.