



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

---

---

**EVALUACION DE UN INMUNOGENO PREPARADO CON  
AISLAMIENTOS DIVERGENTES DEL VIRUS DE INFLUEZA  
AVIAR H5N2 DE BAJA PATOGENICIDAD EN POLLOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**ELIA ARMAS BOJORQUEZ**

**TUTORES**

**DRA. ELIZABETH LOZA RUBIO**

**DR. GARY GARCÍA ESPINOSA**

**MÉXICO D.F. 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIA

A mi madre, por ser la razón de toda mi existencia, ya que por su esfuerzo y desvelos estoy con vida y por ser el mayor ejemplo de trabajo, amor y dedicación que conozco. Te amo.

A Héctor, por apoyarme y quererme a su manera. Bárbara por hacerme sentir un amor que no conocía.

A mis dos hermanas y cómplices Rox y Sonia, no sé qué haría sin ustedes.

A mi abuela Goya, por todas sus oraciones y su incondicional amor, sabes que eres lo más sagrado en mi vida.

A mis tíos Ana y Toño, y mis primas Adri y Clau por todo su enorme amor y su incondicional apoyo, los adoro. Al igual que toda mi familia, por su enorme cariño y porras.

A mis queridos amigos Bety, Peter, Luisito, Claudia Selene, Luis Manuel, Edith, Tere, Cindy, Stivalis, Ale, Encruzijado, Rodrigo, Ángeles, Javier, Daniella, Tania, Nahe, Tefas, Bicha, Caty, Nancy, Celene, Liz. Y a las personas que ya no están en mi vida pero tuvieron un impacto en ella y a los recién llegados.

A Tarsibio, que aunque no pueda leer esto no tiene idea lo que significa en mi vida, y a mis otros amores Alanis, Lorenzo y Marvin, por transformar mi vida día con día, igualmente a los que con su vida y muerte contribuyeron a mi formación.

A Adriana, por ayudarme a tratar de ser mejor cada día, y a las personas que con sus buenas o malas energías me motivan a seguir mi camino.

A la Clínica de Aves de la FMVZ por darme los mejores momentos de mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

A Mario, sin tu ayuda hubiera sido muy difícil llegar a éste punto de mi vida, muchas gracias por todo tu apoyo y tu paciencia.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Departamento de Producción Animal: Aves.

Al Dr. Gary García por su apoyo y enseñanzas durante casi 7 años, por el apoyo durante toda mi carrera y durante esta investigación, pero sobre todo por su amistad.

A la Dra. Elizabeth Loza Rubio por toda su ayuda, apoyo, disposición, consejos y afecto durante estos últimos años. Gracias.

Al CONACYT por el apoyo económico para realizar este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio Edith, Luisito, Celene, Marilú y Nancy, por toda su ayuda. Al Dr. Enrique por su apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Juan Carlos Morales por sus enseñanzas y paciencia.

# CONTENIDO

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Marco teórico.....	2
El virus .....	2
Replicación viral .....	3
Proteínas virales.....	3
Respuesta inmune.....	5
Antecedentes.....	6
Control y erradicación del subtipo H5N2 en México.....	6
Signos y lesiones .....	7
Diagnóstico.....	7
Uso de vacunas .....	7
Justificación.....	10
Hipótesis .....	11
Objetivos.....	11
Material y métodos.....	11
Material Biológico .....	11
Animales .....	11
Virus.....	12
Preparación del inóculo .....	12
Prueba de inocuidad .....	13
Prueba de esterilidad .....	13
Diseño experimental para inmunización .....	13
Inmunización.....	14
Muestras para serología.....	15
Muestras para aislamiento viral.....	15
Desafío.....	16
Serología .....	16
Observación de signos y lesiones.....	17
Aislamiento viral.....	17
Sacrificio de aves.....	18
Resultados.....	19
Pruebas de esterilidad e inocuidad .....	19
Signos clínicos.....	19
Serología.....	26
Aislamiento viral.....	28
Discusión.....	32
Conclusión.....	34
Bibliografía.....	35

## LISTA DE MAPAS, CUADROS Y FIGURAS

Mapa 1. Situación de la Campaña Nacional contra la Influenza Aviar en la República Mexicana al día 5 de enero de 2011.....	6
Cuadro 1. División de grupos vacunados con la vacuna experimental.....	14
Cuadro 2. División de los grupos testigos de infección de alta y baja patogenicidad.....	14
Figura 1. Cronograma para la colecta de suero a partir de pollos vacunados.....	15
Cuadro 3. Grados de severidad observados en los pollos posteriores al desafío.....	19
Cuadro 4. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-98.....	20
Cuadro 5. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-98 inmunizados con la vacuna experimental.....	20
Cuadro 6. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-2007.....	21
Cuadro 7. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-2007 inmunizados con la vacuna experimental.....	21
Cuadro 8. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-Hidalgo.....	22
Cuadro 9. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-Hidalgo inmunizados con la vacuna experimental.....	22
Cuadro 10. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-Michoacán.....	23
Cuadro 11. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-Michoacán inmunizados con la vacuna experimental.....	23
Cuadro 12. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-Veracruz.....	24
Cuadro 13. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-Veracruz inmunizados con la vacuna experimental.....	24
Cuadro 14. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-Querétaro.....	25

Cuadro 15. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-Querétaro inmunizados con la vacuna experimental.....	25
Cuadro 16. Títulos de anticuerpos expresados en media geométrica de los grupos de pollos que recibieron la vacuna experimental, separados de acuerdo al virus de desafío con distintas cepas del virus de Influenza Aviar de baja patogenicidad (VIABP) y alta patogenicidad (VIAAP) subtipo H5N2.....	27
Cuadro 17. Títulos de anticuerpos expresados en media geométrica de los grupos de pollos vacunados y no vacunados posterior al desafío y desafiados con distintas cepas del virus de Influenza Aviar de baja patogenicidad (VIABP) y alta patogenicidad (VIAAP) subtipo H5N2.....	27
Cuadro 18. Evolución de la excreción viral de los grupos desafiados con influenza aviar H5N2 cepa IABP-98 en pollos Leghorn de seis semanas de edad, evidenciada al inocular embriones de pollo y realizar la prueba de hemoaglutinación en placa.....	28
Cuadro 19. Evolución de la excreción viral de los grupos desafiados con influenza aviar H5N2 cepa IABP-2007 en pollos Leghorn de seis semanas de edad, evidenciada al inocular embriones de pollo y realizar la prueba de hemoaglutinación en placa.....	29
Cuadro 20. Evolución de la excreción viral de los grupos desafiados con influenza aviar H5N2 cepa IABP-Hidalgo en pollos Leghorn de seis semanas de edad, evidenciada al inocular embriones de pollo y realizar la prueba de hemoaglutinación en placa.....	29
Cuadro 21. Evolución de la excreción viral de los grupos desafiados con influenza aviar H5N2 cepa IABP-Michoacán en pollos Leghorn de seis semanas de edad, evidenciada al inocular embriones de pollo y realizar la prueba de hemoaglutinación en placa.....	29
Cuadro 22. Evolución de la excreción viral de los grupos desafiados con influenza aviar H5N2 cepa IABP-Veracruz en pollos Leghorn de seis semanas de edad, evidenciada al inocular embriones de pollo y realizar la prueba de hemoaglutinación en placa.....	29
Cuadro 23. Evolución de la excreción viral de los grupos desafiados con influenza aviar H5N2 cepa IAAP-Querétaro en pollos Leghorn de seis semanas de edad, evidenciada al inocular embriones de pollo y realizar la prueba de hemoaglutinación en placa.....	30
Cuadro 24. Ganancia diaria de peso obtenida durante el desafío con las distintas cepas de VIA.....	31

## RESUMEN

ARMAS BOJORQUEZ ELIA. Evaluación de un inmunógeno preparado con aislamientos divergentes de virus de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad en pollos Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Directores. Dra. Elizabeth Loza Rubio y Dr. Gary García Espinosa.

La influenza es una enfermedad contagiosa de origen viral de tipo respiratorio o sistémico y de curso agudo que puede ser fatal. En nuestro país, parte de la estrategia utilizada para el control del virus de influenza aviar (VIA) de baja patogenicidad (BP) subtipo H5N2, ha sido el empleo de inmunizaciones con una vacuna inactivada emulsionada que protege a las aves de la enfermedad, pero no detiene la excreción viral. Lo anterior ha permitido que la cepa vacunal utilizada este alejada filogenéticamente de las cepas aisladas en campo en los últimos años. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue elaborar un biológico polivalente, preparado con aislamientos genéticamente divergentes del VIA BP H5N2. Se formuló una vacuna a partir de cinco cepas del VIA BP que tuvieron la mayor distancia genética. Los pollos fueron vacunados con 0.5 ml de la vacuna sin adyuvante por vía subcutánea a los 10 días de edad seguidos de un refuerzo a los 14 días y desafiados con las cinco cepas del VIA BP utilizadas para elaborar la vacuna, así como con el VIA de alta patogenicidad (AP) subtipo H5N2 a los 28 días postvacunación. Se colectó suero a los 0, 7, 14, 21 y 28 días postvacunación, así como muestras de tráquea y cloaca a los 3, 5, 7 y 10 días postdesafío. Los resultados mostraron que la vacuna estimula la producción de anticuerpos en las aves vacunadas y que evitan la presencia de signos clínicos ante el desafío de VIA de BP con respecto a los pollos no vacunados. En el caso del desafío del VIA de AP la vacuna polivalente disminuyó los signos clínicos. En todos los casos, la vacuna disminuyó la excreción viral con respecto a los pollos no vacunados, pero no la evitó. También se observó que cada cepa del VIA BP utilizada en el ensayo tiene diferente grado de virulencia.

Palabras clave: Influenza aviar, pollos, vacuna, H5N2

## INTRODUCCION

La influenza es una enfermedad contagiosa de etiología viral, causante de una infección respiratoria o sistémica y de curso agudo que puede ser fatal. La infección se transmite de manera horizontal un individuo enfermo a un individuo susceptible, por medio de aerosoles que contienen partículas virales eliminadas a través de estornudos y por heces (Esterday *et al.* 1997).

## MARCO TEÓRICO

### El virus

El virus de la influenza aviar (VIA) pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y al género *influenzavirus tipo A*; el virus presenta un diámetro entre 80 y 120 nm y forma estructuras pleomórficas o esféricas. El genoma viral es de aproximadamente 13 600 nucleótidos (Lee *et al.* 2004) y está compuesto por ocho segmentos de cadena sencilla de ácido ribonucleico (ARN) en sentido negativo, que codifica para 11 proteínas, de las cuales nueve son estructurales (PB1, PB2, PB1-F2, PA, HA, NA, M1 y M2), y dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2). El género *influenzavirus*, se divide en tres grupos A, B y C, de acuerdo a la nucleoproteína (NP). Los *influenzavirus tipo A* son de importancia en Medicina Veterinaria debido a que causan enfermedad respiratoria o sistémica principalmente en aves y mamíferos, mientras que los tipos B y C afectan el aparato respiratorio de los humanos (Esterday *et al.* 1997, Causey *et al.* 2008). Los *influenzavirus A* se clasifican en subtipos con base a dos proteínas expresadas en la membrana fosfolipídica, la hemoaglutinina (HA) y la neuroaminidasa (NA). Existen actualmente 16 HA y 9 NA que pueden generar un total de 144 combinaciones posibles de subtipos, de estos, los subtipos más importantes son el tipo H1, H3, H5, H7 y H9 (Esterday *et al.* 1997, Ritchie 1997, Causey *et al.* 2008, Suarez 2008).

## Replicación viral

Los virus de influenza se adhieren al ácido siálico en la superficie de la célula huésped. Una vez adheridos, ingresan mediante endocitosis mediada por receptores y se forma un endosoma, donde el pH ácido favorece que la envoltura viral se fusiona con la membrana del endosoma mediada por la proteína HA del virus; ello permite la salida al citosol de los segmentos genómicos, que transitan hasta llegar al núcleo, en donde se lleva a cabo la transcripción que genera tanto el ARN mensajero (ARNm) como la replicación de los ARN's virales. Los ARNm se transportan al citoplasma para unirse a los ribosomas e iniciar la síntesis de las proteínas virales necesarias para la transcripción y producción de las proteínas integrales de la membrana, las cuales se procesan en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi para que finalmente se expresen en la membrana celular. Los segmentos del genoma viral se ubican en la membrana celular y se inicia el proceso de gemación, tras el cual los viriones se liberan de la célula infectada y así infectar nuevas células huésped (García, 2006).

## Proteínas virales

La HA es la proteína más estudiada en términos de patogenicidad e inmunidad (Esterday *et al.* 1997, Swayne *et al.* 2008, Doherty 2009). La molécula es un homotrímero en forma de bastón que se une a los receptores del ácido siálico (AS) de la célula blanco, estos receptores se encuentran en la porción terminal de los oligosacáridos de las células; siendo en aves el AS- $\alpha$ 2, 3-Galactosamina (Gal), en humanos AS- $\alpha$ 2, 6-Gal y ambas se pueden expresar en los cerdos; lo que ha sugerido que éstos últimos pueden infectarse con virus de aves y de humanos y por lo tanto podrían generar virus recombinantes con potencial zoonótico (Esterday *et al.* 1997, Swayne 2008).

La HA tiene dos funciones durante el ciclo de replicación del virus: primero se une al AS ubicado en los receptores sobre la superficie celular, uniendo la partícula viral a la célula; y segundo, es responsable de la internalización de los virus dentro

del citoplasma de la célula blanco mediante la fusión de la membrana (Esterday *et al.* 1997, Molina 2008).

De acuerdo a su patogenicidad, se pueden clasificar en virus de baja patogenicidad (BP) ó alta patogenicidad (AP). Los cambios moleculares que determinan la patogenicidad del virus se ubican en el gen HA que codifica para la proteína HA0. Por acción de enzimas tipo tripsina el precursor HA0 se divide en las subunidades HA1 y HA2, permitiendo que el virus infecte a la célula.

En el caso de los subtipos H5 y H7, la presencia de arginina (R) y lisina (K) en la región amino terminal de la HA1 está asociada al grado de patogenicidad, entre mayor número de aminoácidos básicos, más virulento es el virus. En este caso la actividad enzimática es asociada a proteasas endógenas tipo subtisilina (furina y PC6) (Molina 2008, García *et al.* 2006).

Además de la presencia de aminoácidos básicos y de proteasas extracelulares o intracelulares, el sitio de corte de la HA0 puede no efectuarse si hay carbohidratos presentes (glicosilación). Debido a que es una molécula que se expresa en la superficie del virus, ha sido el blanco del desarrollo de vacunas para evitar la infección celular.

La NA es un tetrámero glicoproteínico en forma de hongo que se encuentra en la envoltura del virus; tiene como función principal catalizar el rompimiento del ácido siálico (AS) para liberar los viriones de la célula infectada; también permite el transporte del virus a través de la capa de mucina del tracto respiratorio (García *et al.* 2006).

La proteína M2 es una proteína integral en la envoltura viral que forma un poro o canal iónico encargado de controlar el pH intracelular; esto lo logra al permitir la entrada de iones al virión durante la fase de desnudamiento en el ciclo de replicación. Ésta proteína es el blanco de agentes antivirales como la amantidina y la rimantidina, y las mutaciones que ocurren en el gen que codifica esta proteína determinan la resistencia a los fármacos antivirales. La proteína M1 o matriz interactúa con el genoma, apoyando el ensamble viral. La PB-1 es una subunidad

catalítica de la ARN polimerasa, proteína participante en la apoptosis, mientras que la PB-2 es la polimerasa, la cual favorece la formación del complejo de transcriptasas y funciona también como un factor de virulencia. La PA funciona como ARN polimerasa. La NP es la nucleoproteína o cápside, que participa en la replicación. Con respecto a las proteínas no estructurales NS1 Y NS2; la primera controla la postranscripción, siendo antagonista del interferón, mientras que la segunda exporta el ARN viral del núcleo, apoyando el ensamble vírico (García *et al.* 2006).

### Respuesta inmune

La resistencia natural a la infección por virus de influenza, que no depende de una previa exposición al virus, se debe a la inducción de interferón alfa (IFN $\alpha$ ), que tiene la propiedad de interferir con la replicación viral. Durante la fase aguda de la infección el IFN $\alpha$  se detecta en las secreciones respiratorias y en el suero de los animales infectados. La respuesta inmune que se genera después de una infección conduce a la formación de anticuerpos que se localizan en las secreciones mucosas y en el suero, los cuales desempeñan dos funciones principales: neutralización de la infección e interferencia en la liberación de nuevas partículas virales. El sistema inmune produce anticuerpos hacia todas las proteínas del virus siendo la más relevante aquellos anticuerpos con afinidad por la HA. En las secreciones respiratorias y en el suero se detectan los anticuerpos IgA e IgG, respectivamente. La concentración de anticuerpos contra la HA en el suero se correlaciona con la protección. Es importante hacer notar que los patos desarrollan una pobre o inexistente respuesta de anticuerpos, lo que tiene implicaciones en la vigilancia serológica de la infección en las aves silvestres. Los estudios de la respuesta celular en infecciones por el virus de influenza han sido limitados; algunos trabajos sugieren la participación de las células T citotóxicas CD8+, que aparecen de tres a cuatro días después de la infección y se dirigen contra las proteínas HA, NP, PB2 y M2 (Esterday *et al.* 1997, García *et al.* 2006, Swayne *et al.* 2008).

## Antecedentes

### Control y erradicación del subtipo H5N2 en México.

En 1995 se presentó un brote de IA de baja patogenicidad (BP) por el subtipo H5N2 en aves comerciales en el centro de la República Mexicana, en los estados de Querétaro y Puebla, que provocó un cuadro respiratorio, baja producción de huevo y una mortalidad de baja a moderada (Swayne, 1998). En el invierno de 1995 en el estado de Puebla y posteriormente en el estado de Querétaro, se presentó un brote de IA de alta patogenicidad (AP) por el subtipo H5N2 que causó mortalidad de moderada a alta y que fue erradicado sacrificando a las aves infectadas (Villarreal 1997). Sin embargo, el virus H5N2 de BP persiste todavía a pesar de los programas de control y erradicación establecidos en la campaña gubernamental contra la influenza aviar (NOM-044-ZOO-1995). A la fecha se tienen clasificadas como libre a quince entidades del país, los estados de Coahuila y Durango, así como la región lagunera se encuentran suspendidos en su reconocimiento de fase libre, las diecisiete entidades restantes se encuentran en fase de erradicación de esta campaña. (SENASICA 2011) (Mapa 1).



Mapa 1. Situación de la Campaña nacional contra la Influenza Aviar en la República Mexicana al día 5 de enero de 2011.

## Signos y lesiones

Los signos frecuentes presentes en la enfermedad causada por el virus de la IA son: blefaroconjuntivitis, depresión, epifora, plumaje erizado, estertores, secreciones nasales, fiebre, necrosis de miembros pélvicos, edema en cresta y barbillas, heces color verde esmeralda, disminución de la actividad, postración y muerte. Las lesiones incluyen nefritis, depósitos de uratos en uréteres, moco en senos nasales y faringe, inflamación del bazo, atrofia de bolsa de Fabricio y timo, hemorragias petequiales en proventrículo, intestino, ventrículo, cerebro y otros órganos. (Swayne, 1997).

## Diagnóstico

Existen diversas pruebas diagnósticas para la identificación del virus de IA, entre las más frecuentes se encuentra la serología, con la prueba de inmunodifusión en gel de agar (AGID) y prueba de ELISA; para detectar anticuerpos dirigidos en contra de la proteína matriz y nucleoproteína del virus y prueba de inhibición de la hemaglutinación. Detección de antígenos con ELISA de captura, prueba rápida en inmunotira y el aislamiento del virus en embriones de pollo (SPF o libres de anticuerpos contra Influenza Aviar), identificación de los aislamientos del virus de influenza del tipo "A", así como tipificación de la hemaglutinina y neuraminidasa, y otras más específicas como la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detección rápida de segmentos del genoma viral y secuenciación de bases (OIE, 2002).

## Uso de vacunas

Las vacunas son biológicos que contienen virus y son capaces de inducir una respuesta inmunológica humoral, celular, activa y específica. La inoculación inicial del preparado viral genera una respuesta primaria que dejará memoria y que al ser reactivada por una segunda vacunación o por el virus de campo tendrá una respuesta secundaria más rápida y de mayor duración.

Los tipos de vacunas utilizadas con más frecuencia para influenza aviar son las vacunas recombinantes y las vacunas inactivadas.

Las vacunas recombinantes consisten en la introducción de un gen en el genoma de un microorganismo infeccioso, que puede ser una bacteria o un virus, para hacer que este vector exprese la proteína en su superficie y sea capaz de estimular la producción de anticuerpos protectores (Swayne *et al.* 2001, Ellis *et al.* 2004, Van der Goot *et al.* 2008).

Las vacunas inactivadas con virus completo, fueron originalmente preparadas como 'autógenas', es decir, vacunas que contienen la misma cepa de virus de IA que está causando problemas en campo, pero es tratada con inactivantes para así perder su capacidad de replicación o infección. Estos inactivantes pueden ser físicos, por ejemplo: el calor, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes y ultrasonido; o químicos como el cristal violeta,  $\beta$ -propiolactona, formalina y la acetil-etilenamina binaria. En este caso, el líquido alantoideo obtenido es inactivado y posteriormente emulsificado en adyuvantes oleosos como son el hidróxido de aluminio, Tween 80, Span 80 y el aceite mineral por mencionar algunos. (Stone HD 1987, Swayne *et al.* 2001, Marangon *et al.* 2008, Mendoza *et al.* 2005, NOM-055-ZOO-1995).

En nuestro país, la estrategia utilizada para el control del VIA ha sido el empleo de inmunizaciones con una vacuna inactivada emulsionada (H5N2) que protegen a las aves de la enfermedad, pero no detienen la excreción viral. Además no se puede diferenciar si los anticuerpos fueron inducidos por la vacuna o por el virus de campo. En los últimos años se ha incorporado la vacuna recombinante de viruela-H5 y el virus de la enfermedad de Newcastle (ENC)-H5 que estimula inmunidad local y disminuye la excreción viral y permite diferenciar los anticuerpos vacunales y los de infección con virus de campo (Capua *et al.* 2003, Poland 2001, Marangon *et al.* 2008, Lozano-Dubernand *et al.* 2010). La vacuna recombinante de viruela aviar-influenza aviar (*Poxvirus*-H5) se recomienda utilizar una vez por la sólida inmunidad que induce *per se* el poxvirus, mientras la recombinante ENC-IA (Lasota-H5) se puede aplicar nuevamente. En todos los casos el esquema de

vacunación solo se aplica en áreas donde hay evidencia serológica del virus (zonas de control y de erradicación).

Las vacunas inactivadas también han sido utilizadas en epizootias del VIA en Pakistán (Naeem *et al.* 2006) y en Italia (OIE 2002, Capua *et al.* 2003).

Los tres tipos de vacunas otorgan protección principalmente contra el subtipo H5 porque generan anticuerpos que neutralizan la H y evitan la infección del virus (Esterday *et al.* 1997, García *et al.* 2006).

## JUSTIFICACION

Se ha evidenciado que la HA del virus de campo ha tenido cambios en su secuencia de aminoácidos hasta del 14%, por lo que algunos autores han propuesto que la vacuna con cepa de 1995 no protege completamente a las aves ante el desafío de una cepa filogenéticamente y geográficamente distante, lo que podría originar la aparición de brotes con graves consecuencias económicas (Lee *et al.* 2004, Molina 2008, Dugan *et al.* 2008).

Este supuesto tiene como fundamento que estos virus presentan mutaciones por la derivación antigénica y cambio antigénico. La derivación antigénica, implica mutaciones de base en los genes (Esterday *et al.* 1997, García *et al.* 2006, Mumford 2007, Molina 2008). Este tipo de mutación es la más frecuente debido a que la ARN polimerasa tiene una alta tasa de error durante la replicación del genoma de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  (Lee *et al.* 2004).

Los cambios antigénicos también pueden presentarse debido a alteraciones genéticas de orden mayor en el genoma, esto es debido a la naturaleza segmentada del genoma viral, que permite que los segmentos se segreguen cuando dos virus diferentes de influenza co-infectan una misma célula, pudiendo generar 256 posibles virus recombinantes genéticamente distintos (Molina 2008, Lee *et al.* 2004, Vázquez 2007).

Sin embargo, no se ha demostrado científicamente que la vacuna ya no confiera protección adecuada con aislamientos filogenéticamente y geográficamente distantes, y de ser así, ¿una vacuna polivalente con base a distintas cepas del subtipo H5N2 protegerá? Es por ello que en este estudio se evaluará la protección conferida con una vacuna polivalente conformado por cinco cepas del virus de la influenza aviar H5N2 de BP aisladas a partir de pollos en los últimos 12 años en México ante el desafío de cada una de las mismas utilizadas para elaborar la vacuna.

## HIPOTESIS

La administración de una vacuna polivalente elaborado con cinco cepas de virus de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad, filogenéticamente y geográficamente distantes conferirá protección ante la enfermedad causada por la infección de cada una de las cepas de baja patogenicidad con las que fueron inmunizadas y una cepa de alta patogenicidad.

## OBJETIVO

Formular y evaluar una vacuna pentavalente del virus de influenza aviar subtipo H5N2 de BP ante el desafío de cinco cepas de baja patogenicidad y una de alta patogenicidad.

## MATERIAL Y METODOS

El estudio fue desarrollado en las instalaciones del CENID-Microbiología animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), mediante el financiamiento del proyecto 4216804P del CONACYT otorgado a esta institución.

### *Material Biológico*

#### Animales

Se utilizó un total de 88 pollos Leghorn ALPES II de diez días de edad que fueron alojados en unidades de aislamiento con medidas de bioseguridad nivel II y temperatura ambiental controlada (26 a 28° C). Se les administró agua y alimento de iniciación y crecimiento *ad libitum*.

## Virus

Los virus utilizados para el desarrollo de la vacuna experimental fueron aislados en el territorio nacional y clasificados antigénicamente como BP subtipo H5N2 de influenza aviar:

- Influenza aviar de baja patogenicidad-98
- Influenza aviar de baja patogenicidad -2007
- Influenza aviar A/Pollo/Hidalgo/7637-06/H5N2
- Influenza aviar A/Pollo/Michoacán/4260-06/H5N2
- Influenza aviar A/Pollo/Veracruz/2579-06/H5N2

El material biológico fue proporcionado por la CPA-SENASICA.

## Preparación del inóculo

La preparación de la vacuna se llevó a cabo de acuerdo a la NOM-055-ZOO-1995 y a experimentos previos, como los realizados por Stone (1986). La vacuna experimental desarrollada para este estudio se formuló a partir de los cinco virus de baja patogenicidad H5N2 incluidos en parte iguales y ajustado a una concentración de  $10^6$  DIEP<sub>50%</sub>. Fue inactivado mediante un tratamiento con  $\beta$ -propiolactona y preparado sin adyuvante.

Para la preparación de la vacuna experimental se tomaron partes iguales de los líquidos alantoideos, previamente centrifugados (Centrifuga Hermile Z 300K) de las cinco cepas mencionadas con anterioridad y se colocaron en un matraz de vidrio, se les agregó  $\beta$ -propiolactona a razón de 1:3,000 y se les colocó en un agitador magnético para inactivar el virus. Posteriormente se le adicionó timerosal (Lilly®) como conservador a razón de 1:10,000 y se colocó en un agitador metálico (Magnestir, W.H Curtis Co.) durante dos horas a temperatura ambiente para posteriormente refrigerarlo a 4° C toda la noche (EMEA 2006).

Después se dividió en dos partes iguales de 35 ml, para ser envasado en frascos de vidrio estériles y se etiquetó para su posterior uso. Se almacenó a 4° C.

Se tomaron dos alícuotas de 1 ml de la vacuna experimental para realizar las pruebas de esterilidad e inocuidad.

### Prueba de inocuidad.

Se inocularon 15 embriones de pollo de nueve días de edad con 0.2 ml de la vacuna por vía alantoidea. Se registró la mortalidad diariamente durante siete días, eliminando los embriones muertos en las primeras 24 horas. El líquido alantoideo se colectó transcurrido los seis días para realizar la prueba de hemoaglutinación en placa.

La prueba de hemoaglutinación en placa sirvió para evidenciar la actividad hemaglutinante de los fluidos cosechados en presencia del virus de IA. Consiste en colocar una gota del fluido cosechado más una gota de eritrocitos de pollo a una concentración del 2%, si los fluidos no muestran hemoaglutinación pueden ser consideradas como negativas. Los casos positivos hemaglutinan en un minuto o menos (NOM-044-ZOO-1995).

### Prueba de esterilidad.

Consiste en realizar un cultivo bacteriológico de la vacuna en agar sangre esperando no observar crecimiento de bacterias u hongos durante siete días posteriores.

### Diseño experimental para inmunización

Las aves fueron agrupadas al azar en doce grupos. Seis grupos de nueve pollos fueron inoculados con la vacuna experimental (cuadros 1) y otros seis grupos de cinco pollos fueron utilizados como testigo (Cuadro 2). Cada grupo fue desafiado con una cepa diferente del virus H5N2 BP

Cuadro 1. División de grupos vacunados con la vacuna experimental

<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento</b>
1	9 Pollos vacunados. Desafío con IAAP-Querétaro.
2	9 Pollos vacunados. Desafío con cepa IABP-1998.
4	9 Pollos vacunados. Desafío con cepa IABP-2007.
5	9 Pollos vacunados. Desafío con cepa IABP- Hidalgo.
6	9 Pollos vacunados. Desafío con cepa IABP- Veracruz.
7	9 Pollos vacunados. Desafío con cepa IABP- Michoacán.

Cuadro 2. División de los grupos testigos de infección de alta y baja patogenicidad

<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento</b>
3	9 Pollos sin vacunar. Desafío con IAAP- Querétaro
T1	5 pollos sin vacunar. Desafío con cepa IABP-98.
T2	5 pollos sin vacunar. Desafío con cepa IABP-2007.
T3	5 pollos sin vacunar. Desafío con cepa IABP-Hidalgo.
T4	5 pollos sin vacunar. Desafío con cepa IABP-Michoacán.
T5	5 pollos sin vacunar. Desafío con cepa IABP-Veracruz.

### Inmunización

Los pollos fueron vacunados con 0.5 ml de la vacuna experimental por la vía subcutánea en el tercio medio de la región dorsal del cuello a los diez días de edad, posteriormente recibieron un refuerzo a los catorce días. Con excepción de los animales testigos (sin inmunizar).

## Muestreo para serología

La presencia de anticuerpos contra el virus de influenza aviar se detectó en el suero de los pollos vacunados a través de la recolección de los mismos, para obtenerlos se tomaron muestras de sangre por la vena radial del ave. Posteriormente, se dejaron reposar las muestras a temperatura ambiente hasta observar separados el coágulo de sangre y el suero.

Se llevaron a cabo diversos muestreos sanguíneos siendo el primero previo a la inmunización para descartar la presencia de anticuerpos contra IA. El segundo y tercer sangrado se realizó a los siete y catorce días posteriores a la primera inmunización respectivamente; el cuarto y quinto a los siete y catorce días posteriores al refuerzo con la segunda inmunización y el sexto y último posterior al periodo de diez días de observación del desafío (Figura 1).

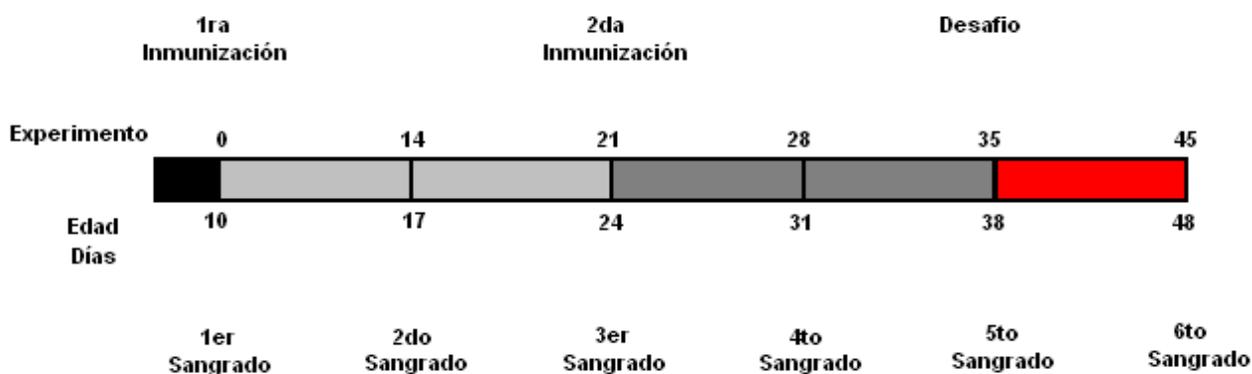


Figura 1. Cronograma para la colecta de suero a partir de pollos vacunados.

## Muestreo para aislamiento viral

Para evaluar la excreción viral se llevaron a cabo muestreos traqueales y cloacales de los distintos grupos experimentales. Se tomaron muestras de tráquea abriendo el pico e introduciendo suavemente el hisopo en la tráquea y realizando

movimientos giratorios para obtener la muestra; así mismo, se obtuvieron hisopos cloacales mediante la misma técnica. Los muestreos se llevaron a cabo a los tres, cinco, siete y diez días posteriores al desafío mediante la inoculación de las muestras en embrión de pollo. Los hisopos obtenidos se introdujeron en medio de transporte MEM.

## Desafío

Todas las aves fueron desafiadas a las dos semanas posteriores a la segunda inmunización con virus de alta patogenicidad A/Chicken/Querétaro/20/95 y con cinco cepas distintas de campo de baja patogenicidad:

- Influenza aviar de baja patogenicidad-98
- Influenza aviar de baja patogenicidad -2007
- Influenza aviar A/Pollo/Hidalgo/7637-06/H5N2
- Influenza aviar A/Pollo/Michoacán/4260-06/H5N2
- Influenza aviar A/Pollo/Veracruz/2579-06/H5N2

Estas cepas fueron aisladas en los últimos años en nuestro país de IA de baja patogenicidad, y fueron administrados a una dosis de  $10^6$  DIEP<sub>50%</sub> en 0.2 ml. por vía nasal y ocular.

## Serología

Para evaluar el título de anticuerpos de las aves inmunizadas, se tomó hasta 1 ml de sangre de cada ave en los diversos muestreos sanguíneos. De éstas muestras se obtuvieron los sueros y se sometieron a la prueba de inhibición a la hemoaglutinación (IH) con el antígeno IA para IH (H5) proporcionado por CPA.

La prueba de IH consiste en la interacción de anticuerpos específicos con la hemaglutinina homóloga del virus de la influenza aviar evitando la aglutinación de los eritrocitos de pollo. La detección de anticuerpos contra el virus de la IA en las aves, es un indicador confiable de que las aves han sido expuestas a antígenos propios del virus, ya sea mediante el proceso de infección natural o por medios artificiales como de la vacunación. La técnica de inhibición de la hemaglutinación

permite detectar la presencia de anticuerpos contra el virus de IA en el suero de las aves expuestas (NOM-044-ZOO-1995).

Los resultados de IH obtenidos fueron analizados con media geométrica (MG).

### Observación de signos y lesiones

Diariamente durante diez días se realizó la evaluación de la parvada por grupos con el fin de observar la manifestación de signos clínicos, lesiones macroscópicas, evaluar el peso de las aves, consumo de alimento y la tasa de mortalidad, los cuales fueron indicadores para evaluar la protección que confirió la vacuna ante las cepas de desafío además de las IH. Un ave se consideró positiva si presentó signos clínicos provocados por el VIA.

Los signos de la enfermedad de Influenza aviar incluyen: blefaroconjuntivitis, depresión, epifora, plumaje erizado, estertores, secreciones nasales, fiebre, cianosis de miembros, edema de cresta, heces color verde esmeralda, disminución de la actividad, postración y muerte.

Los signos clínicos que sean observados, de un ave o de todas las del grupo, durante el periodo de diez días posterior al desafío, se registraron tomando en cuenta los siguientes parámetros de intensidad:

En función de evaluar la eficacia de la vacuna por la comparación de los resultados obtenidos de los diferentes grupos desafiados con el mismo virus (aves vacunadas y las no vacunadas), un ave será considerada infectada si muestra signos de IA de baja patogenicidad y de alta patogenicidad o si muere, por esto se considerará positivo al grupo con una sola ave que presente signos.

### Aislamiento viral

Las muestras traqueales y cloacales obtenidas los días tres, cinco, siete y diez posteriores al desafío se procesaron de la siguiente manera: se agitó el tubo en vortex (Genic 2, Scientific Industries) durante 10 segundos y se retiraron los hisopos, se centrifugó la muestra a 2500xg para recuperar el sobrenadante y se

filtró en membranas de 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro para ser embotellados en tubos estériles.

Del líquido filtrado obtenido se tomó 0.2 ml y se inoculó en embrión de pollo, el resto se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Los embriones de pollo infectados con los filtrados de las muestras se observaron diariamente para determinar la mortalidad, los embriones muertos infectados con cepas de baja patogenicidad a las 24 horas fueron descartados. Los embriones infectados con virus de alta patogenicidad muertos a las 24 horas o posterior a este periodo y los embriones de pollo infectados con los virus de baja patogenicidad muertos y/o vivos posteriores a las 24 horas eran sometidos a la prueba de hemoaglutinación en placa con glóbulos rojos de pollo lavados al 2%.

Para determinar si existía excreción viral de las aves desafiadas, se obtuvieron un total de seis muestras por grupo, tres de la vía traqueal y tres de la vía cloacal.

Se realizaron cuatro muestreos, por lo que se obtuvieron 24 muestras por grupo, con un total de 312. Con base a la NOM-044-ZOO-1994 para influenza aviar se deben utilizar de cinco a ocho embriones, sin embargo, consideramos que este estudio se pueden obtener resultados confiables con tres embriones de pollo por muestra para la replicación del virus, debido a que al ser acumulados se obtiene un total de nueve embriones por grupo, además de que las condiciones de la toma de muestras, su transporte al laboratorio y su proceso para ser inoculados evitaron contaminaciones con otros agentes.

A lo largo del proyecto se requirieron mil quinientos sesenta embriones de pollo de nueve a once días para así poder evaluar la excreción viral.

### Sacrificio de aves

Se siguió el protocolo aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de Experimentación de la FMVZ. Las aves fueron sacrificadas con bióxido de carbono y los cadáveres fueron incinerados.

## RESULTADOS

### Pruebas de esterilidad e inocuidad

La prueba de inocuidad no presentó mortalidad embrionaria, contaminación o hemoaglutinación, resultando negativo. Por otra parte, en la prueba de esterilidad los medios de cultivo no presentaron ningún tipo de crecimiento durante el tiempo de observación.

### Signos clínicos

Las aves vacunadas y no vacunadas se mantuvieron en unidades de aislamiento con bioseguridad nivel tres con una temperatura promedio de 26° C durante diez días posteriores al desafío. Los signos de la enfermedad y la intensidad de los mismos con base a los criterios del cuadro tres, así como la ganancia de peso se registraron diariamente (cuadro 4-15).

Cuadro 3. Grados de severidad observados en los pollos posteriores al desafío.

<b>Severidad</b>	<b>Símbolos</b>	<b>Definición</b>
Sin signos clínicos aparentes	-	No se muestran signos a simple vista
Muy ligero	+	Apenas visible
Ligero	++	Perceptible a simple vista
Moderado	+++	Signos notables de enfermedad
Severo	++++	Signos evidentes de enfermedad
Grave	+++++	Signos exacerbados de enfermedad

Cuadro 4. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-98

Signos \ horas p.i.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h
Blefarconjuntivitis	+	+	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
Depresión	-	-	++	+++	+++	++	++	++	++	+
Epifora	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Plumaje erizado	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Estertores	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Secreciones nasales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fiebre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis de miembros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Edema en cresta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heces color verde esmeralda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Disminución de la actividad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postración	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 5. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-98 inmunizados con la vacuna experimental

Signos \ horas p.i.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h
Blefarconjuntivitis	+	+	++	+	+	-	-	-	-	-
Depresión	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epifora	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Plumaje erizado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estertores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Secreciones nasales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fiebre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis de miembros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Edema en cresta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heces color verde esmeralda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Disminución de la actividad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postración	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 6. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-2007

Signos \ horas p.i.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h
Blefarconjuntivitis	+	++	+++	++++	+++	+++	++	+	+	-
Depresión	-	-	++	+++	++	+	+	-	-	-
Epifora	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Plumaje erizado	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Estertores	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Secreciones nasales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fiebre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis de miembros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Edema en cresta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heces color verde esmeralda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Disminución de la actividad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postración	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 7. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-2007 vacunados con la vacuna experimental

Signos \ horas p.i.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h
Blefarconjuntivitis	-	+	+	++	+	-	-	-	-	-
Depresión	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epifora	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Plumaje erizado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estertores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Secreciones nasales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fiebre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis de miembros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Edema en cresta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heces color verde esmeralda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Disminución de la actividad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postración	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 8. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-Hidalgo

Signos \ horas p.i.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h
Blefarconjuntivitis	-	+	++	++	+++	+++	++	+	+	+
Depresión	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Epifora	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Plumaje erizado	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Estertores	-	+	++	++	+++	+++	++	+	+	+
Secreciones nasales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fiebre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis de miembros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Edema en cresta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heces color verde esmeralda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Disminución de la actividad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postración	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 9. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-Hidalgo vacunados con la vacuna experimental.

Signos \ horas p.i.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h
Blefarconjuntivitis	+	+	++	+	+	+	-	-	-	-
Depresión	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epifora	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Plumaje erizado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estertores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Secreciones nasales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fiebre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis de miembros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Edema en cresta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heces color verde esmeralda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Disminución de la actividad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postración	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 10. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-Michoacán.

Signos \ horas p.i.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h
Blefarconjuntivitis	+	+	+	++	++	++	++	+	+	+
Depresión	-	-	+	++	++	+++	++	+	+	+
Epifora	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Plumaje erizado	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Estertores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Secreciones nasales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fiebre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis de miembros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Edema en cresta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heces color verde esmeralda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Disminución de la actividad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postración	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 11. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-Michoacán vacunados con la vacuna experimental.

Signos \ horas p.i.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h
Blefarconjuntivitis	-	+	+	++	+	-	-	-	-	-
Depresión	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epifora	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Plumaje erizado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estertores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Secreciones nasales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fiebre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis de miembros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Edema en cresta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heces color verde esmeralda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Disminución de la actividad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postración	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 12. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP-Veracruz

Signos \ horas p.i.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h
Blefarconjuntivitis	+	+	+	+	++	++	+	+	-	-
Depresión	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Epifora	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Plumaje erizado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estertores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Secreciones nasales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fiebre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis de miembros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Edema en cresta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heces color verde esmeralda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Disminución de la actividad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postración	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 13. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IABP- Veracruz vacunados con la vacuna experimental.

Signos \ horas p.i.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h
Blefarconjuntivitis	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Depresión	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Epifora	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Plumaje erizado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estertores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Secreciones nasales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fiebre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis de miembros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Edema en cresta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heces color verde esmeralda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Disminución de la actividad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postración	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 14. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IAAP-Querétaro.

Signos \ horas p.i.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h
Blefarconjuntivitis	+	++	++++	+++++	+++++	Muerte de todos los individuos del grupo				
Depresión	-	++	++++	+++++	+++++					
Epifora	-	-	+	+	+					
Plumaje erizado	-	-	+	+	+					
Estertores	-	-	-	-	-					
Secreciones nasales	-	-	-	-	-					
Fiebre	-	-	+	+	+					
Cianosis/ necrosis de miembros	-	-	+	+	+					
Edema en cresta	-	-	+	+	+					
Heces color verde esmeralda	-	-	+	+	+					
Disminución de la actividad	-	-	+	+	+					
Postración	-	-	+	+	+					
Mortalidad	-	-	2/9	3/7	4/4					

Cuadro 15. Presentación de la enfermedad en pollos Leghorn de seis semanas de edad desafiados con el virus de influenza aviar H5N2 cepa IAAP-Querétaro vacunados con la vacuna experimental.

Signos \ horas p.i.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h
Blefarconjuntivitis	+	++	++	++	+++	++	+	+	-	-
Depresión	-	-	++	++	+++	++	+	-	-	-
Epifora	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Plumaje erizado	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Estertores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Secreciones nasales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fiebre	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Necrosis de miembros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Edema en cresta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heces color verde esmeralda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Disminución de la actividad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postración	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Las aves inoculadas con la vacuna experimental mostraron signos muy ligeros de enfermedad y cero mortalidad, con excepción de los pollos desafiados con el virus de alta patogenicidad que mostraron signos ligeros de enfermedad (cuadro 15). Los grupos vacunados y desafiados con las cinco cepas de baja patogenicidad (cuadros 5, 7, 9, 11, 13, 15) no mostraron signos clínicos después de las 144 hrs de observación, mientras que el grupo desafiado con IAAP-Qro (cuadro 15) presentó blefaroconjuntivitis de ligera a moderada, depresión de ligera a moderada, epifora, plumaje erizado y fiebre ligera; cesando la presencia de éstos signos al octavo día de observación.

Los grupos testigo de enfermedad nos sirvieron como referencia para medir la intensidad de los signos presentados en cada cepa de desafío y así poder evaluar la eficacia de la vacuna.

Con los resultados obtenidos a la observación clínica en el estudio podemos determinar lo siguiente:

- Los seis virus utilizados para el desafío se comportan de distinta manera entre sí.
- La vacuna experimental protegió a los pollos de la enfermedad ante el desafío con cepas de baja patogenicidad; mientras que para el virus de alta patogenicidad se evidenciaron algunos signos en un grado ligero, en comparación con los grupos testigo. Sin embargo, en todos los pollos se manifestó una reacción local en el sitio de aplicación del virus de desafío (blefaroconjuntivitis).

## Serología

Los sueros obtenidos a partir de la colecta de sangre de los pollos inmunizados presentaron anticuerpos hacia el virus por la prueba de inhibición a la hemoaglutinación (cuadro 19), en su mayoría éstos incrementaron el título de anticuerpos después del desafío (cuadro 20).

Cuadro 16. Títulos de anticuerpos expresados en media geométrica de los grupos de pollos que recibieron la vacuna experimental, separados de acuerdo al virus de desafío con distintas cepas del virus de Influenza Aviar de baja patogenicidad (VIABP) y alta patogenicidad (VIAAP) subtipo H5N2.

Días post-primera vacunación	VIABP-1998	VIABP-2007	VIABP-Hidalgo	VIABP-Michoacán	VIABP-Veracruz	VIABP-Querétaro
0	0	0	0	0	0	0
7	3.73	3.03	2.46	3.73	2.72	2.82
14	2.82	2.64	2.46	3.73	4	4
Días post-segunda vacunación	VIABP-1998	VIABP-2007	VIABP-Hidalgo	VIABP-Michoacán	VIABP-Veracruz	VIABP-Querétaro
7	2.63	3.24	2.46	3.73	6.49	5.65
14	3.73	4.28	10.55	7.46	5.27	6.96

Cuadro 17. Títulos de anticuerpos expresados en media geométrica de los grupos de pollos vacunados y no vacunados posterior al desafío y desafiados con distintas cepas del virus de Influenza Aviar de baja patogenicidad (VIABP) y alta patogenicidad (VIAAP) subtipo H5N2.

	VIABP-1998	VIABP-2007	VIABP-Hidalgo	VIABP-Michoacán	VIABP-Veracruz	VIABP-Querétaro
<b>Vacunados</b>	25.4	228.07	322.54	322.54	32	776.05
<b>No vacunados</b>	27.86	36.76	84.45	42.22	64	50.8

Todas las aves que no fueron inmunizadas obtuvieron un resultado negativo a la prueba de IH previo al desafío. Los resultados observados en la prueba de IH mostraron que la vacuna experimental estimuló un nivel bajo de anticuerpos con una MG de cero hasta 10.55, probablemente porque el antígeno utilizado para realizar la prueba está elaborado con el antígeno de IA H5 de 1994 que está alejado filogenéticamente de las cepas utilizadas para la preparación de la vacuna

experimental. Sin embargo mostró una curva ascendente de anticuerpos lo que evidencia su naturaleza antigénica.

Por otro lado, las aves vacunadas y desafiadas con los VIABP-2007, VIABP-Michoacán, VIABP-Hidalgo y VIAAP-Querétaro mostraron un mayor TMG mayor que los VIABP-1998 y VIABP-Veracruz, lo que sugiere que hay dominancia antigénica entre las cepas a pesar de ser del mismo subtipo y linaje.

### Aislamiento viral

Se obtuvieron seis muestras por cada grupo inmunizado divididas en tres muestras de hisopado traqueal y tres muestras de hisopado cloacal, utilizando nueve embriones por grupo para evidenciar la excreción viral. De los grupos testigo se obtuvo una sola muestra.

Las muestras obtenidas en las cuatro tomas realizadas durante los diez días de desafío fueron procesadas e inoculadas en embriones de pollo de nueve días. Los resultados mostraron que el virus puede ser aislado indistintamente de pollos inmunizados o sin inmunizar (cuadros 21-27).

Cuadro 18. Evolución de la excreción viral de los grupos desafiados con influenza aviar H5N2 cepa IABP-98 en pollos Leghorn de seis semanas de edad, evidenciada al inocular embriones de pollo y realizar la prueba de hemoaglutinación en placa.

	72 h post-desafío		120 h post-desafío		168 h post-desafío		240 h post-desafío	
	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca
Vacuna	+	+	+	+	+	+	-	-
Sin vacuna	+	+	+	+	+	+	+	+

Cuadro 19. Evolución de la excreción viral de los grupos desafiados con influenza avar H5N2 cepa IABP-2007 en pollos Leghorn de seis semanas de edad, evidenciada al inocular embriones de pollo y realizar la prueba de hemoaglutinación en placa.

	72 h post-desafío		120 h post-desafío		168 h post-desafío		240 h post-desafío	
	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca
Vacuna	+	+	+	+	+	+	+	+
Sin vacuna	+	+	+	+	+	+	+	-

Cuadro 20. Evolución de la excreción viral de los grupos desafiados con influenza avar H5N2 cepa IABP-Hidalgo en pollos Leghorn de seis semanas de edad, evidenciada al inocular embriones de pollo y realizar la prueba de hemoaglutinación en placa.

	72 h post-desafío		120 h post-desafío		168 h post-desafío		240 h post-desafío	
	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca
Vacuna	+	+	+	+	+	+	+	+
Sin vacuna	+	+	+	+	+	+	+	+

Cuadro 21. Evolución de la excreción viral de los grupos desafiados con influenza avar H5N2 cepa IABP-Michoacán en pollos Leghorn de seis semanas de edad, evidenciada al inocular embriones de pollo y realizar la prueba de hemoaglutinación en placa.

	72 h post-desafío		120 h post-desafío		168 h post-desafío		240 h post-desafío	
	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca
Vacuna	+	+	+	+	+	+	-	-
Sin vacuna	+	+	+	+	+	+	+	+

Cuadro 22. Evolución de la excreción viral de los grupos desafiados con influenza avar H5N2 cepa IABP-Veracruz en pollos Leghorn de seis semanas de edad, evidenciada al inocular embriones de pollo y realizar la prueba de hemoaglutinación en placa.

	72 h post-desafío		120 h post-desafío		168 h post-desafío		240 h post-desafío	
	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca
Vacuna	+	+	+	+	+	+	+	-
Sin vacuna	+	+	+	+	+	+	+	+

Cuadro 23. Evolución de la excreción viral de los grupos desafiados con influenza aviar H5N2 cepa IAAP-Querétaro en pollos Leghorn de seis semanas de edad, evidenciada al inocular embriones de pollo y realizar la prueba de hemoaglutinación en placa.

	72 h post-desafío		120 h post-desafío		168 h post-desafío		240 h post-desafío	
	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca
Vacuna	+	+	+	+	+	+	+	-
Sin vacuna	+	+	Muerte del resto de las aves del grupo					

Todos los grupos presentaron excreción viral de los virus del desafío, a excepción de los grupos vacunados y desafiados con IABP-98 e IABP-Michoacán a las 240 horas post-desafío por ambas vías, y los inmunizados y desafiados con las cepas IABP-Veracruz e IAAP-Qro por vía cloacal a las 240 horas post-desafío. Únicamente el grupo no inmunizado y desafiado con IABP-2007 no mostró excreción viral por vía cloacal a las 240 horas.

Estudios posteriores al aislamiento viral en embrión de pollo, muestran que la vacuna experimental tuvo una menor excreción viral posterior al desafío, que los valores obtenidos en los grupos testigo (datos no publicados del CENID-Microbiología INIFAP, proyecto de CONACYT).

La ganancia de peso obtenida entre los 95 y 173 g en los grupos vacunados desafiados con los virus de baja patogenicidad, mientras que el grupo vacunado desafiado con el virus de alta patogenicidad, obtuvo una ganancia de 82 g. Los grupos testigo mostraron una ganancia de peso de 64 a 87 g para los grupos desafiados con las cepas de baja patogenicidad, respecto al grupo testigo desafiado con el virus de AP que presentaron pérdida de peso (cuadro 24).

Cuadro 24. Ganancia diaria de peso obtenida durante el desafío con las distintas cepas de VIA.

	<b>Con vacuna</b>	<b>Sin vacuna</b>
IABP-98	173 g	85 g
IABP-2007	125 g	87 g
IABP-Hidalgo	104 g	68 g
IABP-Michoacán	95 g	86 g
IABP-Veracruz	161 g	64 g
IAAP-Querétaro	82 g	-271 g

## DISCUSION

Las vacunas inactivadas contra la influenza aviar H5N2 en México han demostrado tener protección en pollos y gallinas contra morbilidad, mortalidad y la baja de la producción de huevo. La vacuna utilizada en nuestro país es monovalente y contiene la cepa A/CHICKEN/MEXICO/232/94/CPA, como semilla maestra. Sin embargo, como una demanda de la industria avícola se planteó la necesidad de obtener un nuevo biológico, debido a que observaciones en campo sugerían que la vacuna producida en 1995 no estaba protegiendo adecuadamente. Por lo que algunos grupos comenzaron a inferir que esto se debía a diferencias en el genoma del virus, debido a ello se iniciaron estudios de secuenciación, utilizando el gen H de diferentes aislamientos de la República Mexicana, con lo que se confirmó que efectivamente éstas existen (Lee *et al.* 2004, Escorcía *et al.* 2008, Molina 2008, Vázquez 2007). Es por ello que era importante elaborar una vacuna polivalente que incluyera las cinco principales variantes nacionales del virus H5N2 de baja patogenicidad, así como evaluarla en la especie blanco (pollos). El uso de vacunas polivalentes se ha estudiado con anterioridad en países como Italia (Zinella *et al.* 1981).

En este estudio se demostró que los signos clínicos presentados en los pollos desafiados son los mismos que los descritos para el virus de influenza de BP por Lee *et al.* 2004, Terregino *et al.* 2010, Swayne *et al.* 1998, Poetri *et al.* 2009. Sin embargo, los signos provocados por la infección de las distintas cepas de IABP durante el experimento, mostraron diferencias entre una cepa de BP y otra en cuanto a la intensidad comparado con cepas de AP como H5N2 (Swayne *et al.* 1998) y H5N1 (Terregino *et al.* 2010, Poetri *et al.* 2009, Ellis *et al.* 2004, Swayne *et al.* 2008), por lo que este es el primer estudio que documenta los grados de patogenicidad entre diferentes cepas nacionales.

La presencia de anticuerpos detectados en suero inducidos por la vacuna pentavalente fue baja debido a que no se utilizó adyuvante y que la cantidad de virus para elaborar la vacuna fue con base al título de la hemoaglutinación no a la cantidad de miligramos de masa antigénica. Terregino (2010) mostró que una

vacuna inactivada del VIA BP H5N2 con adyuvante puede estimular la presencia de anticuerpos séricos con títulos de 8.9 y 10.9. Aún con estos títulos bajos, al desafío de la vacuna experimental mostró una buena protección contra signos clínicos y evitó la mortalidad. Algunos trabajos que realizaron la prueba de IH, como los de Swayne *et al.* 2006, únicamente mencionan resultados nominales como positivo o negativo y no la cantidad de anticuerpos presentes. La variación en el título medio geométrico para cada grupo experimental pudo deberse a una dominancia antigénica entre las cepas o bien a la variación antigénica entre las mismas y la cepa empleada para elaborar el antisuero con el cual se evaluó la IHA en este estudio, ya que se ha observado que el antisuero dirigido al VIA H5N2 detecta varias cepas homólogas al H5N2, pero con distinta avidéz (Escorcía *et al.* 2010). Por otro lado, también se observó que el TMG en los pollos no inmunizados, pero infectados fue diferente entre las cepas utilizadas desde un TMG de 27 hasta 84. Esta diferencia entre el TMG de las cepas, también se observó en los pollos inmunizados y desafiados donde se observaron tres rangos de TMG (25-32, 228-322 y 776) lo que sugiere que hay una diferencia en el grado de infecciosidad entre las cepas del mismo subtipo. Otra posible causa para estas diferencias es que al ser cepas distintas, no tienen el mismo grado de virulencia, tasa de replicación y por esto no va a estimular suficiente al sistema inmunológico, sugiriendo que también tal vez algunas no están tan bien adaptadas al pollo, ya que podrían contar con distintas vías de evolución.

Por otro lado, la vacuna pentavalente protegió contra la presentación de signos de enfermedad en los animales desafiados con virus de BP, únicamente presentando signos muy leves de blefaroconjuntivitis en el sitio de inoculación. En cuanto a los animales desafiados con virus de AP, la vacuna evitó la mortalidad, pero permitió la presentación de signos leves. Esta característica se ha observado con el uso de vacunas inactivadas contra virus de AP, como el H5N1 y se ha sugerido que es necesario un mayor umbral de la respuesta inmune a través del uso de adyuvantes, el uso de vacunas en aspersión para que haya una replicación viral en el sitio de entrada del virus; aumentar la cantidad de antígeno y que el antígeno presente una similitud en la secuencia de aminoácidos igual o mayor al 89% con el

objetivo de inducir anticuerpos con alta afinidad por los epitopes del VIAAP (García *et al.* 2006, Terregino *et al.* 2010, Poetri *et al.* 2009, Ellis *et al.* 2004, Swayne *et al.* 2008). En este estudio, sin embargo, cabe resaltar que la similitud entre la H5 de las cinco cepas utilizadas y la H5 IAAP-Qro utilizada en el desafío, es del 89 a 90% con las cepas IABP-2007, IABP-Hgo, IABP-Mich e IABP-Ver y un 99% con la cepa IABP-98 en la HA. Lo que evidencia que es poco probable que la presencia de signos leves se asocie exclusivamente a diferencias entre la secuencia del gen H de las cepas utilizadas en este estudio (datos no publicados). El aumento de peso en las aves inmunizadas fue entre el 9 al 39% con respecto a los pollos no inmunizados, lo que es otro valor que indica que los pollos pueden continuar su desarrollo.

La vacuna experimental demostró conferir una protección adecuada contra signos clínicos y mortalidad, aunque es necesario considerar que en un desafío de campo, este candidato a vacuna podría enmascarar un brote de un VIA de AP, el cual podría ser confundido con un VIA de BP provocando un retraso de las acciones pertinentes para el control del brote por las autoridades competentes. Si bien, este candidato a vacuna permitiría la excreción viral, en un estudio se mostró mediante PCR cuantitativo en tiempo real que ésta resultó menor (datos no mostrados). Esto es lo usual en vacunas inactivadas, ya que al administrarse por vía parenteral no evita la infección, ni la replicación viral en el sitio de entrada (mucosa conjuntival y nasal).

## CONCLUSIÓN

La vacuna pentavalente formulada y evaluada para este estudio muestra que confirió una protección adecuada contra signos clínicos y mortalidad, sin embargo no evitó la excreción viral por completo, aunque si la disminuyó.

## BIBLIOGRAFIA

1. Easterday BC, et al. Influenza. En: Editores asociados Barnes HJ ... [et al.]. Diseases of Poultry, USA. 1997. P 583-605.
2. Lee CW, et al. Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2. J Virol 2004; 78(15): 8372-8381
3. Causey D, et al. Ecology of avian influenza virus in birds. J Infect Dis. 2008; 197: S29–S33.
4. Ritchie, BW. Avian viruses: Function and control. Wingers Publishers. Lake Worth, Fla. 1999 (EUA).
5. Suarez DL, Influenza A Virus. En: Swayne DE, Avian Influenza, USA. 2008. P 3-21.
6. García GJ, et al. La influenza un problema vigente de salud pública. Salud Pública Mex 2006; 48: 244-267.
7. Swayne DE, et al. Strategies and challenges for eliciting immunity against avian influenza virus in birds. Immunol Rev 2008; 225(1): 314-331(18).
8. Doherty PC, et al. Immunity to avian influenza A viruses. Rev sci tech off int epiz. 2009, 28 (1), 175-185.
9. Molina HJA. Caracterización molecular de virus de influenza aviar aislados en México (Tesis de Maestría). Distrito Federal 2008. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
10. Swayne DE, et al. Vaccines, vaccination and immunology for avian influenza viruses in poultry. En: Swayne DE, Avian Influenza, USA. 2008. pp. 407-451.
11. Swayne DE. Pathobiology of H5N2 Mexican avian influenza virus infections of chickens. Vet Path, 1998. Vol. 34, No. 6; pp. 557-567.
12. Villarreal CL, et al. The mexican avian influenza (H5N2) outbreak. Proceedings of the Fourth International Symposium on avian influenza. May 29-31. 1997. pp. 18- 22.
13. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar. D. O. F. 30 de enero de 2006.
14. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. México. Sanidad Animal. 2008. En: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=265>
15. Organización Internacional de Epizootias (O. I. E.). 2002. En: [http://www.oie.int/esp/maladies/fiches/e\\_a150.htm](http://www.oie.int/esp/maladies/fiches/e_a150.htm)

16. Swayne DE, et al. Efficacy of vaccines in chickens against highly pathogenic Hong Kong H5N1 avian influenza. *Avian Dis.* 2001. 45 (2): 355-65.
17. Ellis TM, et al. Vaccination of chickens against H5N1 avian influenza in the face of an outbreak interrupts virus transmission. *Avian Pathol* 2004; 33: 4, 405-412.
18. Van der Goot JA, et al. Transmission of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in Pekin ducks is significantly reduced by a genetically distant H5N2 vaccine. *Virology* (2008), doi:10.1016/j.virol.2008.08.037
19. Stone HD. Efficacy of avian influenza oil-emulsion vaccines in chickens of various ages. *Avian Dis.* 1987; 31: 483-490.
20. Marangon S, et al. Use of vaccination in avian influenza control and eradication. *Zoonoses Public Health.* 55(2008) 65-72.
21. Mendoza SE, et al. *Vaccinología veterinaria.* México: UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, 2005.
22. Norma Oficial Mexicana NOM-055-ZOO-1995, Requisitos mínimos para la elaboración de vacunas emulsionadas inactivadas contra la influenza aviar subtipo H5N2.
23. Capua I; et al. The use of vaccination as an option for the control of avian influenza. *Avian Pathol* 2003, vol. 32, no. 4, pp. 335-343 (9).
24. Poland GA, et al. Influenza vaccines: a review and rationale for use in developed and underdeveloped countries. *Vaccine* 2001; 19:2216-2220.
25. Lozano-Dubernard B, et al. Protective Dose of a Recombinant Newcastle Disease LaSota–Avian Influenza Virus H5 Vaccine Against H5N2 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus and Velogenic Viscerotropic Newcastle Disease Virus in Broilers with High Maternal Antibody Levels. David Sarfati-Mizrahi. *Avian Dis* 2010; 54, s1:239–241.
26. Naeem K, et al. Use of strategic vaccination for the control of the avian influenza in Pakistan. *Dev Biol (Basel).* 2006; 124:145-50.
27. Capua I; et al. Avian Influenza in Italy 1997–2001. *Avian Dis* 2003; 47 (3 suppl): 839–843.
28. Dugan VG, et al. The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. *PLoS Pathog* 2008; 4 (5): 1-9.
29. Mumford JA. Vaccines and viral antigenic diversity. *Rev. sci. tech. int. Epiz.* 2007; 26(1): 69-90.

30. Vázquez HML. Evolución entre las cepas del virus de influenza aviar tipo A H5N2 aisladas de aves vacunadas que presentaron la enfermedad en México (Tesis de Licenciatura). Distrito Federal 2007. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
31. EMEA 2006. Guideline on requirements for vaccines for use in birds against avian influenza. Doc. Ref. EMEA/CVMP/IWP/222624/2006. Londres 2006.
32. Escorcía M, et al. Avian influenza: genetic evolution under vaccination pressure. *Virology* 2008; 5: 15.
33. Zinella, A., et al. Avian Influenza: approaches in the control of disease with inactivated vaccines in oil emulsion. First international symposium on avian influenza US Animal Health association Richmond VA, 1981. 180-183.
34. Terregino C, et al. Evaluación de la eficacia de una vacuna de influenza que contienen la cepa H5N2 mexicana de baja patogenicidad ante un desafío con un virus de alta patogenicidad H5N1 de Egipto contemporáneo. XXXV Convención Anual ANECA 2010: 72-78.
35. Poetri ON, et al. An inactivated vaccine reduces transmission of highly pathogenic H5N1 avian influenza among native chickens. *Vaccine*. 2009; 27: 2864-2869.
36. Escorcía M, et al. Impact of antigenic and genetic drift on the serologic surveillance of H5N2 avian influenza viruses. *BMC Veterinary Research* 2010; 6:57.