

ARTÍCULO DE REVISIÓN

INFLUENZA AVIAR

Buscaglia, C.

RESUMEN

La influenza aviar (IA) de alta patogenicidad (IA AP) es extremadamente contagiosa, multisistémica, conduce a elevada mortandad y es causada por algunos H5 y H7 subtipos del tipo A del virus de influenza. Es una enfermedad de la lista A de la OIE (Office International des Epizoties) y no se conoce un reservorio del virus en aves silvestres como en los virus de baja patogenicidad. La prueba de inmunodifusión en agar gel se convirtió el standard internacional para el diagnóstico serológico y vigilancia. En 1972, se demostró que el principal reservorio y el huésped natural para virus de Influenza aviar moderadamente patógena o baja patogenicidad (IA MP) eran aves acuáticas silvestres del orden Anseriformes. En 1979, el clivaje de la hemaglutinina se identificó como el mayor determinante de la virulencia de virus de IAAP. La primera vez que se comprobó que la IA, produjo muertes humanas, fue en 1997 en Hong Kong lo que la convierte no solo en una amenaza para la economía y bienestar animal sino más importante aún, para la salud pública. En nuestro país la IA es considerada una enfermedad exótica. La manera que se manejan las explotaciones en Argentina alejadas de lagunas con aves silvestres y/o migratorias y de criaderos de pavos y la escasa presencia de mercados de aves vivas, hace casi imposible un brote de IA por lo que es imprescindible continuar con excelentes medidas de bioseguridad y el control por parte de las autoridades.

INTRODUCCIÓN

La Influenza Aviar (IA) también conocida como gripe de las aves es una enfermedad viral altamente contagiosa de carácter sistémico que afecta principalmente a pavos, pollos y otros tipos de aves de corral, atacando diversos órganos y provocando una elevada tasa de mortalidad. Fue en 1981 durante el primer Simposio Internacional en Influenza Aviar, presidido por el Dr. Raymond A. Bankowski, Investigador de la Universidad de California, Davis, que se adoptó la terminología “Influenza Aviar Altamente Patogénica o Patógena” (IA AP) como la designación oficial para las formas altamente virulentas de influenza de las aves (6). La Oficina Internacional de Epizootias

Investigador Adjunto S/D CIC,
Profesor Adjunto Cátedra de Zootecnia Especial III parte (Aves y Pilíferos)
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Calle 60 y118 – 1900 La Plata

(OIE) u Organización Mundial de Sanidad Animal, como también se la conoce, una organización que codifica standards sanitarios y de salud animal, especifica la Influenza Aviar Altamente Patogénica como una enfermedad de la lista A (2). La lista A de la OIE contiene enfermedades transmisibles que tienen la potencialidad de ser muy serias y de rápida difusión a pesar de las fronteras naturales, que son de serias consecuencias socio-económicas y/o de salud publica y que son de mayor importancia en el comercio internacional de animales y de productos animales (65).

En 1949 formas suaves de influenza de las aves fueron primeramente reconocidas en varias especies de aves domésticas y a mediados de los 60 se denominaron de baja patogenicidad, no altamente patogénicas, influenza aviar de tipo leve o moderadamente patógenas (MP). Su impacto en la producción ha sido mucho menos severo que las altamente patogénicas (1, 30, 53) y provocan infecciones subclínicas o enfermedades del aparato respiratorio y/o reproductivo en diversas especies de aves salvajes o domésticas. La influenza aviar moderadamente patógena (IA MP) no figura ni en la lista A ni en la lista B de la OIE. De todos modos está comprobado que los virus altamente patógenos provienen de sus congéneres moderadamente patógenos, mediando entre ambos una serie de mutaciones de una proteína de superficie llamada hemaglutinina (67).

HISTORIA

La IA fue comunicada por primera vez como altamente patógena (“fowl plague”: plaga de las aves o peste aviar) en 1878 por Perroncito en Italia (18,63). En 1955 el virus fue identificado y clasificado como un virus de IA. Desde ese año hasta el 2000 se han registrado dieciocho brotes de IA AP en pollos y pavos en diferentes países como Escocia (H5N1), Sud Africa (H5N3), Inglaterra (H7N3), (H7N7), (H5N1), Canadá (H5N9), Australia (H7N7), (H7N3), Estados Unidos (H5N2), Irlanda (H5N8), Méjico (H5N2), Pakistán (H7N3), Hong Kong (H5N1), Italia (H5N2), (H7N1) (16,20,22,25,31,43,44,56,67,75,76).

La prueba de inmunodifusión en agar gel se convirtió el standard internacional para el diagnóstico serológico y vigilancia al inicio de la década del 70 (7). En 1972, se demostró que el principal reservorio y el huésped natural para virus de IA MP eran aves acuáticas silvestres del orden Anseriformes (57) y en 1979, el clivaje de la hemaglutinina se identificó como el mayor determinante de la virulencia de virus de IAAP (10).

Históricamente el virus de IAAP más conocido es un subtipo H7, que ha causado pérdidas de aves desde fines de 1800 en muchas partes del mundo, pero las epizootias en el noreste de los Estados Unidos de Norteamérica durante 1983-84, Reino Unido durante 1991 y Méjico en 1994-95, fueron causados por un subtipo viral H5 (31,75,65).

En Argentina al igual que en la mayoría de los países de América del Sur, la IA es considerada una enfermedad exótica (49), por lo que el brote originado en Chile por el virus H7N3 durante el año 2002 (52), incrementó la preocupación del sector avícola y se establecieron estrictas medidas de control y bioseguridad (12). El brote en el país vecino fue manejado implementando diferentes formas de articulación publico-privadas, complementadas con políticas definidas para las diferentes áreas estratégicas que participan en la industria avícola. Este comportamiento al igual que el compromiso asumido determinó que se erradicara la enfermedad (33).

Recientemente se ha detectado en Corea, Vietnam, Japón, Taipei, Tailandia, Camboya, Hong Kong, Laos, China e Indonesia (47).

El interés global en IA ha resultado en la organización de simposios en 1981, 1986, 1992, 1997 y 2002 para tratar distintos aspectos de la enfermedad (6, 26,27,66). Si bien la IA se encuentra ausente en nuestro país, es un problema internacional y la solución requiere de esfuerzos de cooperación internacionales (28).

SIGNIFICADO EN LA SALUD PUBLICA

Mientras que algunas veces se ha visto que la IA causada por cepas virales altamente patógenas ha infectado al hombre, esta enfermedad no debe confundirse con la influenza humana, enfermedad muy común del ser humano. De todos modos la influenza aviar en determinadas circunstancias puede ser una seria amenaza para el hombre (14). La primera vez que se comprobó que la IA (H5N1), produjo muertes humanas, fue en 1997 en Hong Kong (56), repitiéndose en años sucesivos (15). Durante el último simposio de IA se presentaron los resultados obtenidos después de analizar muestras de cadáveres de personas fallecidas durante la pandemia de gripe española de 1918; se sugiere que la misma fue producida por un virus de origen aviar (72).

SIGNIFICADO ECONOMICO

Las pérdidas económicas por IA han variado dependiendo de la cepa viral, especie del ave infectada, número de granjas involucradas, métodos de control usados y rapidez de implementación del control o estrategias de erradicación. Las cifras, por ejemplo, varían desde 1 millón de dólares durante 1924-1925 en US a 63 millones en 1983-84 también en US y en el brote de Italia de 1999-2000 las pérdidas indirectas fueron de 500 millones de dólares (65).

AGENTE ETIOLOGICO

Los virus de Influenza son un grupo diverso de virus que pertenecen a la familia *Orthomixoviridae*. Son virus envueltos (sensibles al éter) y contienen una cadena sencilla de ácido nucleico (ARN) que es segmentada y tiene una polaridad negativa. Dos componentes internos importantes que son la proteína de la matriz (M) y la ribonucleoproteína (RNP) son proteínas grupo específicas que designan la especificidad del tipo (ej. A, B, o C). Hay dos glicoproteínas de superficie: la hemoaglutinina (H) y la neuraminidasa (N) que se proyectan de la membrana lipídica, participan del proceso de infección y definen la especificidad del subtipo (ej. H1-H15 y N1-N9). Hasta el momento se han descrito 15 antígenos de superficie H y 9 N (51,74).

Los viriones de Influenza pueden ser formas esféricas o varas cortas (80-120 nm) o formas filamentosas (400-800 nm de largo). Los virus de Influenza son relativamente estables a pH 7-8 pero son lábiles a un pH de bajo rango. La termoestabilidad es variable entre las cepas; algunas sobreviven por 6 horas a 56°C.

La Influenza Aviar (IA) es causada por un Ortomixovirus tipo A y reúne las características descritas en el párrafo anterior. Su simetría es helicoidal con

proyecciones glico-proteicas y su genoma segmentado tiene ocho genes que codifican 10 proteínas.

Existen múltiples serotipos del virus de IA y su clasificación se basa en los números relativos de antígenos de superficie hemaglutinantes (H) y neuraminidasa (N) (Ej. H7N2). Los antígenos H adhieren a los receptores celulares, tienen actividad hemaglutinante con glóbulos rojos y generan anticuerpos protectores.

Los virus de IA pueden ser de baja patogenicidad o de alta patogenicidad. La mayoría de las cepas de virus son de baja patogenicidad y típicamente causan pocos o ningún signo clínico en aves infectadas. Los virus de IA MP, de todos modos, son capaces de mutar a virus de alta patogenicidad en condiciones de campo, y algunas cepas de alta virulencia han evolucionado desde cepas suaves después de pasajes seriados a través de poblaciones de aves.

La IA AP es causada por algunos subtipos H5 y H7 del tipo A del virus de influenza. y no se conoce un reservorio del virus en aves silvestres como en los virus de baja patogenicidad (65,67).

DEFINICIÓN DE PATOGENICIDAD

La patogenicidad variable de los virus puede evaluarse in vivo o in vitro. Los virus de IA AP se ha demostrado que deben reunir uno o más de los siguientes 3 criterios (28,65,67):

- a) Cualquier virus de influenza que es letal para seis, siete u ocho de ocho ($\geq 75\%$) aves susceptibles de cuatro- a seis semanas de edad dentro de los diez días a partir de la inoculación intravenosa con 0.2 ml de una dilución de 1:10 de fluido alantoides infeccioso libre de bacterias.
- b) Cualquier virus H5 o H7 cuya dosis no reúne el criterio a), pero tiene una secuencia de aminoácidos en el sitio de clivaje de la H que es compatible con los virus de IA AP.
- c) Cualquier virus de influenza que no sea un subtipo H5 o H7 y que mate de uno a cinco de las ocho aves inoculadas y crezca en cultivos celulares en ausencia de tripsina.

El cumplimiento de uno o más de los criterios enumerados categorizaría el virus como IA AP.

La definición de la IA AP adoptada por la Unión Europea y por Argentina es la siguiente: "Es una infección de las aves, producida por cualquier virus de la influenza aviar tipo A, cuyo índice de patogenicidad intravenosa (IPIV) sea superior a 1,2 en pollitos de seis semanas de edad, o cualquier infección provocada por virus del subtipo H5 o H7 de la Influenza A cuya secuenciación de nucleótidos haya demostrado la presencia de múltiples aminoácidos básicos en el punto de corte de la hemoaglutinina" (67,49).

En estudios experimentales, virus de IA altamente patógenos para pollitos, generalmente son no patógenos para patos y gansos (1,67). De todos modos este virus va a ser altamente patógeno para otras aves dentro del orden *Galliformes*, familia *Phasianidae*, como pavos o codornices (1).

ECOSISTEMA Y TRASMISSION

La mayoría de especies de aves domésticas y salvajes parecen ser susceptibles a IA. La población de aves silvestres (migratorias): aves acuáticas salvajes (incluyendo gansos, patos, cisnes, aves de la costa y el mar) constituyen el reservorio de los virus de IA MP (29,34,45,62) y a través del mundo “transportan” el virus, pero los signos clínicos de la enfermedad son suaves o no evidentes; es decir que actúan como reservorio llevando el virus en el tracto intestinal (11).

Las infecciones en aves domésticas pueden ser más severas, y los pavos son más comúnmente infectados que los pollos (3,8,35,39,60).

Se ha determinado la presencia de virus de IA en avestruces y emús (5,21,24,37,48,69,73).

La transmisión se realiza a través de las descargas nasales y de las heces. El virus no resiste las altas temperaturas por lo que los brotes son más frecuentes en invierno por las bajas temperaturas y humedad.

La transmisión más común es la intraespecies, ej. humano a humano, porcino a porcino, aves a aves, etc. (58,59). Ocasionalmente es interespecies e intraclases, ej. porcinos a humanos, patos silvestres a pavos domésticos, etc. y recientemente, pero muy raro se ha comprobado interespecies e intraclases, ej. aves a humanos, aves a porcinos, etc.(42)

Las heces y secreciones respiratorias de aves infectadas (ej. aves acuáticas, en las dos primeras semanas de infección) pueden producir grandes cantidades de virus frecuentemente defecadas directamente en el agua. Por eso la contaminación del ambiente acuático parece ser el método más eficiente de transmisión del virus. La transmisión también puede producirse por:

- Equipos (contaminados)
- Calzados y ropa (mecánica)
- Aire
- Aves : en mercados, exhibiciones, traspatio (avicultura rural), diversión (gallos de riña)
- Aves comerciales

Por eso la exposición de las aves comerciales a aves acuáticas migratorias y movimientos internacionales de aves, equipo de granja y personas incrementan el riesgo para la introducción de cepas de IA. Los mercados de aves vivas (54) son un reservorio de infección porque sirven como un punto focal para juntar y alojar muchas especies de aves.

En cuanto a los virus de IA AP no se les conoce reservorio alguno entre la fauna salvaje, pese a que de vez en cuando, en el curso de brotes entre aves de corral domésticas, han aparecido en muestras tomadas de aves salvajes.

SIGNOS CLINICOS

Los signos de la enfermedad son en extremo variables y dependen de la especie afectada, edad, sexo, infecciones concomitantes, virus, factores ambientales, etcétera.

La patogenicidad del virus de influenza, va a determinar su ubicación en el organismo. Los menos patógenos van a atacar el aparato respiratorio superior y a medida que aumenta la patogenicidad se distribuirá en el tracto digestivo, pudiéndose aislar hasta de tejido muscular.

Las infecciones pueden variar clínicamente en: subclínicas (no patogénicas), respiratoria aguda y/o urogenital (baja patogenicidad) y enfermedad sistémica severa (alta patogenicidad). Por lo tanto la IA puede manifestarse como una enfermedad respiratoria, entérica, reproductiva o neurológica (36).

Signos clínicos descriptos pueden incluir descenso en la producción de huevos, huevos en fáfara o deformados, hinchazón de la cabeza, párpados, cresta, barbillones y garrones; cianosis de los barbillones, crestas y patas; problemas respiratorios con descargas nasales claras, mucopurulentas o sanguinolentas; tos; trastornos nerviosos, incoordinación; plumaje erizado; inapetencia; depresión y diarrea. Cualquiera de estos signos se puede producir solo o en varias combinaciones.

Los signos clínicos que se observan mas frecuentemente en la IA MP comprenden: descarga ocular, rinitis y traqueitis, diarrea, bajas en la producción de huevos e incremento moderado en la mortalidad. Los mismos se presentan acompañados de las siguientes lesiones macroscópicas: aerosaculitis, involución ovárica y hemorragias, peritonitis por ruptura ovárica e inflamación renal con presencia de uratos (38,41).

Los signos clínicos de la IA AP pueden distinguirse:

- En caso de explotaciones de aves a piso, con aparición repentina de mortalidad elevada, transmisión rápida dentro del galpón y depresión severa sin consumo de alimento.
- En caso de explotaciones de aves en jaula, se observa una transmisión lenta dentro del galpón, mortalidad del 100% en 10 a 15 días y depresión severa.

Observándose en ambos tipos de explotación signos nerviosos como tortícolis, opistótonos, imposibilidad de pararse, temblor de cabeza y cuello, cresta y barbillones edematosas a necróticos, edema en cabeza y patas, hemorragias subcutáneas en patas, edema, hemorragias viscerales, congestión y hemorragias en pulmones (fig. 1,2,3).

En algunos casos, la enfermedad es rápidamente fulminante y se encuentran las aves muertas sin signos previos. En condiciones experimentales algunos virus ocasionan enfermedades graves en una especie e infecciones inaparentes en otras. De manera similar, virus que son idénticos antigénicamente pueden tener características biológicas muy peculiares, uno puede producir una enfermedad grave en una especie y una infección inaparente en otra (1). En el brote de pollos en Pensilvania en 1983-84 (31), hubo al principio una enfermedad respiratoria aguda con aumento en mortalidad y declinación en la producción de huevos. Sin embargo, cuando el virus se volvió altamente patógeno hubo otros problemas, incluyendo una mortalidad alta (50 a 89%).

DIAGNÓSTICO

Mientras que los signos clínicos pueden sugerir la presencia de IA, el diagnóstico es confirmando a través de pruebas serológicas, aislamiento e identificación viral (50, 70). Muestras de sueros de varias aves deben ser enviadas para pruebas serológicas. El virus de IA puede aislarse de muestras de tejidos (tráquea, pulmón, bazo, cloaca y

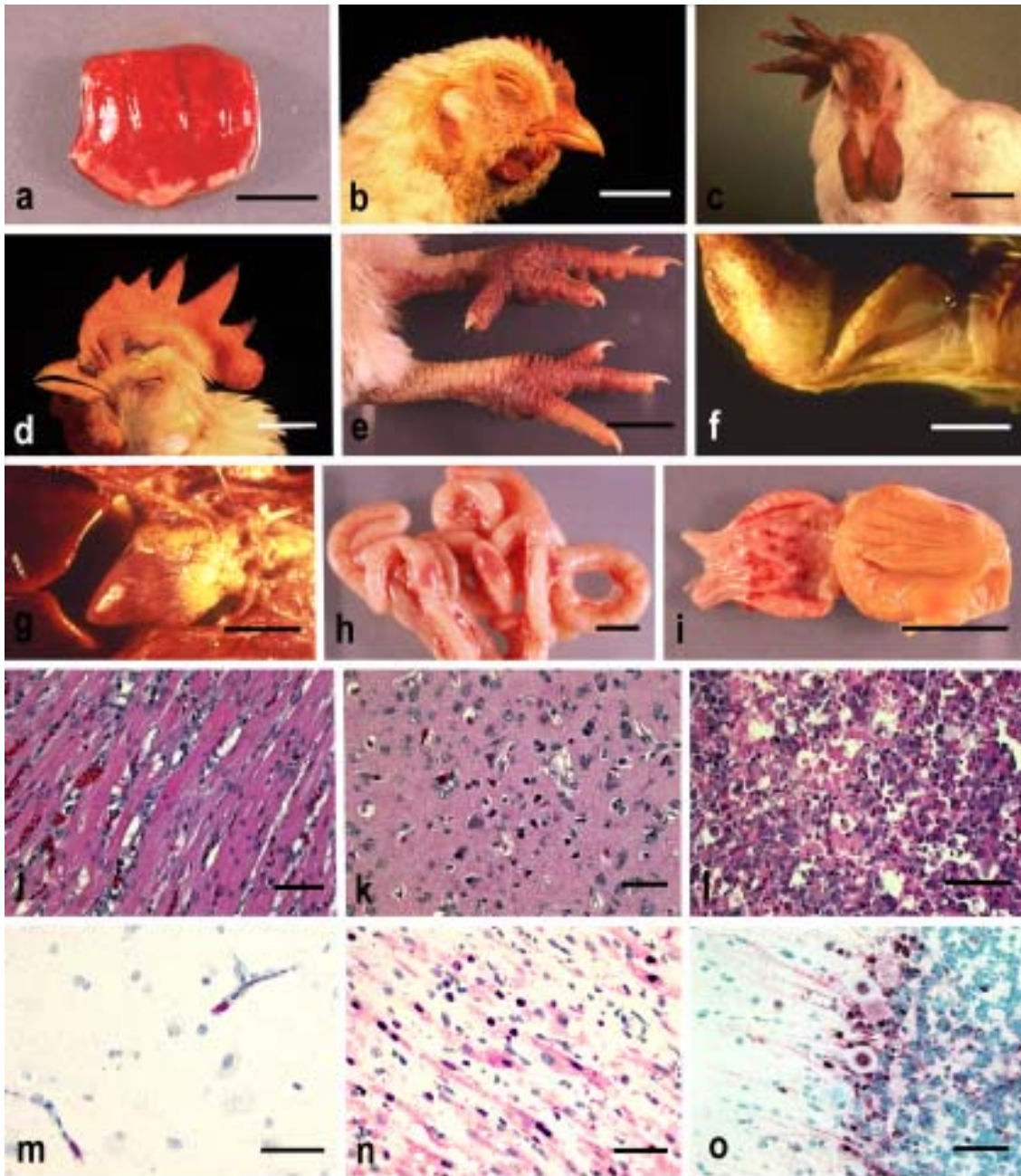


Fig 1 Lesiones macroscópicas (a-i) cambios histológicos (j-l) e inmunohistoquímicos en aves experimentalmente infectadas con IA AP.

La misma pertenece a la publicación de Swayne y Suarez 2002 y fue autorizada su reproducción por la OIE.

- a) Severa hemorragia y edema en el pulmón (Barra = 1cm)
- b) Severa hinchazón de cabeza, cresta y barbillones por edema subcutáneo (Barra = 2cm)
- c) Severo edema, necrosis y hemorragia de la cresta y barbillones (Barra = 5cm)
- d) Severa conjuntivitis con edema de cresta , barbillones y área periorbital y necrosis de las puntas de la cresta (Barra = 2cm)
- e) Severas hemorragias subcutáneas y edema de dedos y cañas (Barra = 2cm)
- f) Engrosamiento de dermis por edema de la pata (Barra = 2cm)
- g) Petequias en la grasa del epicardio (Barra = 3cm)
- h) Hemorragias en tejidos linfoides de placas de Peyer y el divertículo de Meckel del yeyuno (Barra = 1cm)
- i) Hemorragia subcutánea rodeando conductos y glándulas en proventrículo(Barra = 2cm)
- j) Miocarditis no supurativa con necrosis de miocitos individuales (Barra = 50um)
- k) Focos de necrosis de neuronas en el cerebro (Barra = 50um)
- l) Severa necrosis aguda de acinos de glándulas del páncreas (Barra = 50um)
- m) Antígeno viral de IA en el citoplasma y núcleo de células endoteliales en el cerebelo (Barra = 30um)
- n) Antígeno viral de IA en el citoplasma y núcleo de miocitos cardíacos (Barra = 25um)
- o) Antígeno viral de IA en el citoplasma y núcleo de células de Purkinje, células gliales de Bergmann y células granulares del cerebelo (Barra = 50um)



Figura 2. Ponedoras en jaula con IA AP. Postración y dificultad de movimiento en fase preagónica.
Esta figura pertenece al CD de Influenza Aviar Epidemia Italiana 1999-2000 de Ilaria Capua y Franco Mutinelli (reproducción autorizada).



Figura 3. Ponedoras en jaula con IA AP. Esplenomegalia y hemorragia a nivel de folículos ováricos. Esta figura pertenece al CD de Influenza Aviar Epidemia Italiana 1999-2000 de Ilaria Capua y Franco Mutinelli (reproducción autorizada).

cerebro), hisopados traqueales o cloacales, o muestras de materia fecal. Especímenes múltiples de varias aves deben enviarse a un laboratorio calificado porque muchas muestras fallan en producir virus. El aislamiento e identificación tradicional puede realizarse en huevos embrionados de 9 a 10 días de edad o detección del antígeno, Directigen o RT-PCR. Es importante determinar si la actividad hemoaglutinante detectada en el líquido alantoideo se debe al virus de IA o a otros virus hemoaglutinantes como el virus de Newcastle. También pueden realizarse detecciones directas de proteínas virales de IA o ácidos nucleicos de tejidos o hisopados.

Las pruebas serológicas se utilizan para demostrar la presencia de anticuerpos específicos que pueden detectarse tan pronto como siete días después de la infección. La serología recomendada es la precipitación en agar o prueba de inmunodifusión en agar gel (7) para detectar anticuerpos anti-nucleoproteínas porque detecta anticuerpos para antígenos específicos a tipo A compartidos por todos los virus de influenza A. Pruebas de ELISA también han sido desarrolladas (9, 32,40,55,61,77) y se encuentran disponibles comercialmente. Una vez que la influenza es detectada por inmunodifusión o ELISA se pueden determinar los subtipos por medio de inhibición de la hemoaglutinación (IH) e inhibición de la neuraminidasa (IN).

La determinación de virulencia de una cepa particular, requiere aislamiento viral y subsecuentes descargas de pollos sanos controladas por el laboratorio. Recientemente una prueba de RTPCR rápida fue desarrollada en el laboratorio del Dr. David Swayne (64)

PREVENCIÓN Y CONTROL

Las medidas de bioseguridad son fundamentales para su control y se comparten para el control de todas las enfermedades. A pesar de que el virus puede recobrase de la yema, cáscara y albúmina de los huevos, la transmisión vertical no ha sido demostrada. El período de incubación es usualmente de 3 a 7 días.

Prácticas apropiadas de bioseguridad son la llave para prevenir la infección con virus de IA (12). El manejo de los lotes “todo adentro, todo afuera” prevendrá la difusión del virus de un lote a otro. No deben permitirse el contacto de lotes de aves con aves migratorias, silvestres y deben mantenerse lejos de fuentes de agua que puedan haber estado contaminadas con aves silvestres. El personal y los equipos que entran y salen de las instalaciones deben estar desinfectados en forma apropiada a la entrada y salida y no deben intercambiarse entre instalaciones.

La prevención de la exposición al virus y la erradicación son dos métodos aceptables para hacer frente a la IA AP al igual que la educación de los avicultores y métodos de monitoreo. La aplicación de programas de control, cuya lógica admite la presencia de la infección a niveles bajos de incidencia, no constituye un método de gestión aceptable en este caso, aunque ello no ha impedido recurrir a programas de ese tipo ante algunos brotes de IA AP. Una estrategia adecuada para hacer frente a la IA (en cualquiera de ambas formas) debe comprender medidas de vigilancia y diagnóstico, seguridad biológica, formación, cuarentena y sacrificio sanitario. Para algunos programas de control y erradicación de la IA se ha utilizado la vacunación (17). Una vacunación estratégica que permite la detección de infecciones por influenza en aves

expuestas en el campo llamada DIVA (“differentiating infected from vaccinated animals”) ha sido utilizada en áreas densamente pobladas de aves durante los brotes entre los años 2000-2002 y 2002-2003 en Italia (23,19).

El tratamiento de la IA no ha sido efectivo y la prognosis de los lotes infectados con virus de alta patogenicidad es pobre. Lotes recuperados continúan eliminando virus en forma intermitente, por lo tanto precauciones apropiadas y vigilancia deben llevarse a cabo. Una vez que un lote infectado ha sido removido, las instalaciones y equipos deben lavarse a fondo y desinfectarse.

Los virus de IA son sensibles a la mayoría de los detergentes y desinfectantes. El aumento de temperatura y secado los inactivan, pero la materia orgánica como las heces, van a proteger al virus de IA de la inactivación, y un virus activo puede recobrase de estas fuentes por mas de 105 días. Instalaciones y equipamientos deben limpiarse y desinfectarse después de la remoción del lote infectado. La cama y materia fecal debe ser compostada antes de su uso o enterrada.

Lo enumerado en los párrafos anteriores es lo que se hace en países donde se ha detectado la enfermedad. La manera que se manejan las explotaciones en Argentina alejadas de lagunas con aves silvestres y/o migratorias y de criaderos de pavos y la escasa presencia de mercados de aves vivas, hace casi imposible un brote de IA por lo que es imprescindible continuar con excelentes medidas de bioseguridad y el control por parte de las autoridades (13).

Agradecimientos

Sumamente agradecida a la Dra Ilaria Capua (OIE Reference Laboratory for Newcastle Disease and Avian Influenza - Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie, Italia) y al Dr. David Swayne (Southern Poultry Research Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, USA). Se hace extensivo el agradecimiento a la OIE por permitir la reproducción de las fotos publicadas por los Drs Swayne y Suarez en *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 19:463-482, 2002.

BIBLIOGRAFIA

1. ALEXANDER, D.J. 1986. Criteria for the definition of pathogenicity of avian influenza viruses. In B. C. Easterday (ed.). Proceedings of the second international symposium on avian influenza. U.S. Animal Health Association: Richmond, Virginia, 228-245.
2. ALEXANDER, D.J. 1996. Highly pathogenic avian influenza (fowl plague). In OIE Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. List A and B diseases of mammals, birds and bees, 3rd ed. Office International des Epizooties: Paris, 155-160.

3. ALEXANDER, D.J.; D. SPACKMAN. 1981. Characterisation of influenza A viruses isolated from turkeys in England during March-May 1979. *Avian Pathol* 10:281-293.
4. ALEXANDER, D.J., G. PARSONS; R.J. MANVELL. 1986. Experimental assessment of the pathogenicity of eight influenza A viruses of N5 subtype for chickens, turkeys, ducks and quail. *Avian Pathol.* 15: 647-662.
5. ALLWRIGHT, D. M., W. P. BURGER, A. GEYER, A. W. TERBLANCHE. 1993. Isolation of an influenza A virus from ostriches (*Struthio camelus*). *Avian Pathol* 22:59-65.
6. BANKOWSKI, R. A. 1981. Proceedings of the First International Symposium on Avian Influenza. U.S. Animal Health Association: Richmond, VA, 1-215.
7. BEARD, C. W. 1970. Avian Influenza antibody detection by immunodiffusion. *Avian Dis* 14: 337-341.
8. BEARD, C. W. , D. H. HELFER. 1972. Isolation of two turkey influenza viruses in Oregon. *Avian Dis* 16:1133-1136.
9. BECK, J. R., D. E. SWAYNE. 1998. Evaluation of ELISA for avian influenza serologic and diagnostic programs: Comparison with agar gel precipitin and hemagglutination inhibition test. In D. E. Swayne and R. D. Slemons (eds). Proceedings of the fourth international symposium on avian influenza. U.S. Animal Health Association: Richmond, VA, 297-304.
10. BOSCH, F.X., M. ORLICH, H.D. KLEINK; R. ROTT. 1979. The structure of the Hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of Influenza viruses. *Virology*, 95:197-207.
11. BRUGH, M.; D. C. JOHNSON. 1986. Epidemiology of avian influenza in domestic poultry. In Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza. U.S. Animal Health Association : Richmond, VA, 177-186.
12. BUSCAGLIA, C. 2003. - Un Recordatorio sobre Influenza de las Aves. CAPIA Informa. La revista de la Cámara Argentina de Productores Avícolas. Nº 196. Enero 2002- junio 2003. pp. 9-11.
13. BUSCAGLIA, C. 2004. Situación de la Influenza Aviar. Una puesta al día sobre las características de la enfermedad. Seminario por un campo sano: ¿Como estamos en sanidad agropecuaria? Bolsa de Cereales, Buenos Aires, Argentina, 29 de abril, 2004, 30-31.
14. CAPUA, I., D. J. ALEXANDER. 2002. Avian influenza and human health. *Acta Topica* 83:1-6

15. CAPUA, I., D. J. ALEXANDER. 2004. Human health implications of avian influenza viruses and paramixoviruses. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23:1-6.
16. CAPUA, I. ; S MARANGON. 2000. The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a Review. *Avian Pathol* 29:289-294.
17. CAPUA, I.; S. MARANGON. 2003. Vaccination policy applied for the control of avian influenza in Italy. Brown, F., Roth, J. (eds): *Vaccines for the OIE List A and Emerging Animals Diseases*. Dev. Biol. Basel, Karger 114:213-219.
18. CAPUA, I., F. MUTINELLI. 2001. CD on Avian Influenza 1999-2000 Italian Epidemic
19. CAPUA, I., CATOLI, G. MARANGON, S. 2004. "DIVA" – A vaccination strategy enabling the detection of field exposure to avian influenza infections in poultry. Program and Abstract Book: International Conference on the Control of Infectious Animal Diseases by Vaccination, 13-16 April, 2004 Buenos Aires, Argentina, 33, 2004.
20. CAPUA, I., S. MARANGON, L. SELLI, D. J. ALEXANDER, D. E. SWAYNE, M. D. POZZA, E. PARENTI, F. CANCELLOTTI. 1999. Outbreaks of highly pathogenic avian influenza (H5N2) in Italy during October 1997-January 1998. *Avian Pathol* 28:455-460.
21. CAPUA, I., F. MUTINELLI, M. A. BOZZA, C. TERRIGNO; G. CATTOLI. 2000 a. Highly pathogenic avian influenza (H7N1) in ostriches (*Struthio camelus*). *Avian Pathol* 29:643-646.
22. CAPUA, I., F. MUTINELLI, S MARANGON, D. J. ALEXANDER. 2000 b. H7N1 avian influenza in Italy (1999 to 2000) in intensively reared chickens and turkeys. *Avian Pathol* 29:537-543.
23. CAPUA, I., C. TERRIGNO, G. CATTOLI, F. MUTINELLI, J.F. RODRIGUEZ. 2002. Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza). *Avian Pathol* 32:47-55.
24. CLAVIJO, A., J. E. RIVA, J. COPPS, Y. ROBINSON, E. M. ZHOU. 2001. Assessment of the pathogenicity of an emu-origin influenza A H5 virus in ostriches (*Struthio camelus*). *Avian Pathol* 30:83-89.

25. CROSS, G. M. 1987. The status of avian influenza in poultry in Australia. In B. C. Easterday (ed). Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza. U.S. Animal Health Association: Richmond, VA, 96-103.
26. EASTERDAY, B. C. 1987. Proceedings of the Second International Symposium On Avian Influenza. U.S. Animal Health Association: Richmond, VA, 1- 475.
27. EASTERDAY, B. C. ; C. W. BEARD. 1992. Proceeding of the Third International Symposium On Avian Influenza. U.S. Animal Health Association: Richmond, VA, 1-458.
28. EASTERDAY, B. C., V. S. HINSHAW, D. A. HALVORSON. 1997. Influenza. In B. W. Calnek, H.J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, (eds.). Diseases of Poultry, 10th ed. Iowa State University Press: Ames, IA, 583-605.
29. EASTERDAY, B. C., D. O. TRAINER, B. TUMOVA, H. G. PEREIRA. 1968. Evidence of infection with influenza viruses in migratory waterfowl. Nature 219:523-524.
30. EASTERDAY, B. C., B. TUMOVA. 1978. Avian influenza. In M. S. Hofstad, B. W. Calnek, C. F. Helmbol, W. M. Reid and H. W. Yoder, Jr. (eds). Diseases of poultry, 7th ed. Iowa State Univrsity Press: Ames, 549-573.
31. ECKROADE, R. J. , L. A. SILVERMAN-BACHIN. 1986. Avian influenza in Pennsylvania. The beginning. In B. C. Easterday (ed). Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza. U.S. Animal Health Association: Richmond, VA, 22-32.
32. FATUNMBI, O. O., J.A. NEWMAN, V. SIVANANDAN, D. A. HALVORSON. 1989. A broad-spectrum avian influenza subtype antigen for indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Dis 33:264-269.
33. FULLER CATALAN, J. 2003. Influenza Aviar en Chile. Memorias Jornada de Actualización Avícola de AMEVEA Influenza Aviar, 25 de abril de 2003, Colón, Entre Ríos, Argentina, 69-76.
34. HINSHAW, V. S., V. F. NETLES, L. F. SCHORR, J. M. WOOD, R. G. WEBSTER. 1986. Influenza virus surveillance in waterfowl in Pennsylvania after the H5N2 avian outbreak. Avian Dis 30:207-212.
35. HOMME, P. J., B. C. EASTERDAY, D. P. ANDERSON. 1970. Avian influenza virus infections II. Experimental epizootiology of influenza A/turkey/Wisconsin/1966 virus in turkeys. Avian Dis 14:240-247.

36. HOOPER, P. , P. SELLECK.1998. Pathology of low and high virulent influenza virus infections. In D. E. Swayne and R. D. Slemons (eds.). Poceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza. U.S. Animal Health Association: Richmond, VA, 134-141.
37. JORGENSEN, P. H., O. L. NIELSEN, H. C. HANSE, R. J. MANVELL, J. BANKS, D. J. ALEXANDER. 1998. Isolation of influenza A virus, subtype H5N2, and avian paramyxovirus type 1 from a flock of ostriches in Europe. *Avian Pathol* 27:15-20.
38. KOBAYASSHI, Y., T. HORIMOTO, Y. KAWAOKA, D. J. ALEXANDER, C. ITAKURA. 1996. Pathological studies of chickens experimentally infected with two highly pathogenic avian influenza viruses. *Avian Pathol* 25:285-304.
39. MCNULTY, M. S., G. M. ALLAN, R. M. MCCRACKEN, P. J. MCPARLAND. 1985. Isolation of a highly pathogenic influenza virus from turkeys. *Avian Pathol* 14:173-176.
40. MEULEMANS, G., M. C. CARLIER, M. GONZE, P. PETIT. 1987. Comparison of hemagglutination-inhibition, agar gel precipitin, and enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibodies against influenza viruses in chickens. *Avian Dis* 31:560-563.
41. MO, I. P., M. BRUGH, O. J. FLETCHER, G. N. ROWLAND, D. E. SWAYNE. 1997. Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. *Avian Dis* 41:125-136.
42. MOHAN, R., Y. M. SAIF, G. A. ERICKSON, G. A. GUSTAFSON, B. C. EASERDAY.1981. Serologic and epidemiologic evidence of infection in turkeys with an agent related to the swine influenza virus. *Avian Dis* 25: 11-16.
43. MOUNTS, A. W., H. KWONG, H. S. IZURIETA, Y. HO, T. AU, M. LEE, B. C. BUXTON, S. W. WILLIAMS, K. H. MAK, J. M. KATZ, W. W. THOMPSON, N. J. COX, K. FAKUDA. 1999. Case-control study of risk factors for avian influenza A (H5N1) disease, Hong Kong, 1997. *J Infect Dis* 180:505-508.
44. NAEEM, K. 1998.The avian influenza H7N3 outbreak in South Central Asia. In D. E. Swayne and R. D. Slemons (eds.). Proceedings of the 4th International Symposium on Avian Influenza, 4th ed. American Association of Avian Pathologist: Kennett Square, PA, 31-35.
45. NETTLES, V. F., J. M. WOD, R. G. WEBSTER. 1985. Wildlife surveillance associated with an outbreak of lethal H5N2 avian influenza in domestic poultry. *Avian Dis* 29:733-741.

46. NEWMAN, J., D. HALVORSON, K. KARUNAKARAN. 1981. Complications associated with avian influenza infections. In Proceedings of the First International Symposium on Avian Influenza. U.S. Animal Health Association: Richmond, VA, 8-12.
47. OIE (Office International des Epizooties) Website <http://www.oie.int> (documento consultado 4-6-2004)
48. PANIGRAPHY, B., D. A. SENNE, J. E. PEARSON. 1995. Presence of avian influenza virus (AIV) subtypes H5N2 and H7N1 in emus (*Dromaius novaehollandiae*) and rheas (*Rhea americana*): Virus isolation and serologic findings. Avian Dis 39:64-67.
49. Plan Nacional de Sanidad Avícola. Manual de Procedimientos Influenza Aviar Altamente Patogenas. 2003. Programa de Animales de Granja. Dirección de luchas Sanitarias. Dirección Nacional de Sanidad Animal. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. 2. Argentina.
50. PEARSON, J. E., D. A. SENNE. 1987. Diagnostic procedures for avian influenza. In B. C. Easterday (ed.). Proceedings of the Second International Symposium On Avian Influenza. U.S. Animal Health Association: Richmond, VA, 222-227.
51. RHOM, C., N. ZHOU, J. SUSS, J. MACKENZIE, R. J. WEBSTER. 1996. Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. Virology 217:508-516.
52. SENNE, D. 2002-2003. Influenza in Chile. 139th AVMA annual convention notes, Nashville TN, July 2002. Proceedings of the 51st Western Poultry Disease Conference, 2003. Sacramento, CA, U.S.A. pp. 81-82.
53. SENNE, D. A., J. E. PEARSON, Y. KAWAOJKA, E. A. CARBREY, R. G. WEBSTER. 1986. Alternative methods for evaluation of pathogenicity of chicken Pennsylvania H5N2 viruses. In B. C. Easterday (ed.). Proceedings of the second international symposium on avian influenza. U.S. Animal Health Association: Richmond, VA, 246-257.
54. SENNE, D. A., J. E. PEARSON, B. PANIGRAPHY. 1992. Live poultry markets: A missing link in the epidemiology of avian influenza. In B. C. Easterday (ed.). Proceedings of the third international symposium on avian influenza. University of Wisconsin-Madison: Madison, WI, 50-58.
55. SHAFER, A. L., J. B. KATZ, K. A. EERNISSE. 1998. Development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of type A influenza antibodies in avian sera. Avian Disease 42:28-34.

56. SHORTRIDGE, K. F. 1999 Poultry and the influenza H5N1 outbreak in Hong Kong. 1997: Abridged chronology and virus isolation. *Vaccine* 17:S26-S29.
57. SLEMONS, R. D., D. C. JOHNSON, J. S. OSBORN, F. HAYES. 1974. Type-A influenza viruses isolated from wild free-flying ducks in California. *Avian Dis* 18:119-124.
58. SLEMONS, R. D., M. C. SHIELDCASTLE, L. D. HEYMAN, K. E. BEDMARIK, D. A. SENNE. 1991. Type A influenza viruses in waterfowl in Ohio and implications for domestic turkeys. *Avian Dis* 35:165-173.
59. SLEMONS, R. D., D. E. SWAYNE. 1990. Replication of a waterfowl-origin influenza virus in the kidney and intestine of chickens. *Avian Dis* 34:277-284.
60. SMITHIES, L. K., F. G. EMERSON, S. M. ROBERTSON, D. D. RUEDY. 1969. Two different type A influenza virus infections in turkeys in Wisconsin. II. 1968 outbreak. *Avian Dis* 13:606-610.
61. SNYDER, D. B., W. W. MARQUARDT, F. S. YANCEY, P. K. SAVAGE. 1985. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against avian influenza virus. *Avian Dis* 29:136-144.
62. STALLKNECHT, D. E. 1998. Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations: Waterfowl, shorebirds, pelicans, cormorants, etc. In D. E. Swayne and R. D. Slemons (eds.). *Proceedings of the Fourth International Symposium On Avian Influenza*. U.S. Animal Health Association: Richmond, VA, 61-69.
63. STUBBS, E. L. 1948. Fowl pest. In H. E. Biester and L. H. Schwarte (eds.). *Diseases of Poultry*, 2nd ed. Iowa State University Press: Ames, IA, 603-614.
64. SWAYNE, D. 2003. Influenza Aviar. *Memorias Jornada de Actualización Avícola de AMEVEA Influenza Aviar*, 25 de abril de 2003, Colón, Entre Ríos, Argentina, 9-58.
65. SWAYNE, D.E. , D. A. HALVORSON. Influenza. Chapter 5. 11th Edition *Diseases of Poultry*, Editorial Board for the American Association of Avian Pathologists. Iowa State Press (E.E.U.U.), pp135- 1960, 2003.
66. SWAYNE, D. E., R. D. SLEMONS. 1998. *Proceedings of the Fourth International Symposium On Avian Influenza*. U. S. Animal Health Association: Richmond, VA, 1-401.

67. SWAYNE, D. E., D. L. SUAREZ. 2000. Highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 19:463-482.
68. SWAYNE, D. E., D. L. SUAREZ. 2003. Proceedings of the Fifth International Symposium on Avian Influenza . Special Issue: *Avian Diseases* 47: 783-1268, 2003.
69. SWAYNE, D. E., J. R. BECK, M. L. PERDUE, M. BRUGH, R. D. SLEMONS. 1996. Assessment of the ability of ratite-origin influenza viruses to infect and produce disease in rheas and chickens. *Avian Dis* 40:438-447.
70. SWAYNE, D. E., D. A. SENNE, C. W. BEARD. 1998. Influenza. In D. E. Swayne, J. R. Glisson, M. W. Jackwood, J. E. Pearson, and W. M. Reed (eds.). *Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th ed. American Association of Avian Pathologist: Kennett Square, PA, 150-155.
71. SNYDER, D.B., W.W. MARQUARDT, F.S. YANCEY, P.K. SAVAGE. 1985. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against avian influenza virus. *Avian Dis.* 29: 136-44.
72. TAUBENBERGER, J.K. 2003. Fixed and Frozen Flu: the 1918 Influenza and Lesions for the Future. Symposium Keynote address. *Proceedings of the Fifth International Symposium on Avian Influenza. Special Issue Avian Dis.* 47: 789-&91
73. TROCK, S. C. 1998. Epydemiology of influenza in live bird markets and ratite farms. In D. E. Swayne and R. D. Slemons (eds.). *Proceeding Of The Fourth International Symposium On Avian Influenza*. U.S. Animal Health Association: Richmond, VA, 76, 78.
74. VAN DEUSEN, R. A., V. S. HINSHAW,, D. A. SENNE, D. PELLACANI. 1983. Micro neuraminidase-inhibition assay for classification of influenza A virus neuraminidases. *Avian Dis* 27: 745-750.
75. VILLAREAL, C. L., A. O. FLORES 1998. The Mexican avian influenza (H5N2) outbreak. In D. E Swayne and R. D. Slemons (eds.). *Proceedings of The Fourth International Symposium On Avian Influenza*. U.S. Animal Health Association: Richmond, VA, 18-22.
76. WESTBURY, H. A. 1998. History of highly pathogenic avian influenza in Australia. In D. E. Swayne and R. D. Slemons (eds.) *Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza*. U.S. Animal Health association: Richmond, VA, 23-30.

77. ZHOU, E. M., M. CHAN, R. A. HECKERT, J. RIVA, M. F. CANTIN. 1998.
Evaluation of a comparative ELISA for detection of antibodies against avian
influenza virus nucleoprotein Avian Dis 42:517-522.