



COMPARACION DE LAS CEPAS DE VIRUS  
INFLUENZA EQUINA A/EQUI 2/MEXICO  
1-5-/66 POR LA PRUEBA DE INHIBICION  
DE HEMAGLUTINACION

TESIS PROFESIONAL

RODOLFO R. VILLASEÑOR VAZQUEZ

México, D. F.

1 9 6 7



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.

## ASESORES TECNICOS:

M. V. Aurora Velázquez E.  
Jefe del Departamento de  
Microbiología.

M. V. Raymundo G. Cunha.  
Coordinador de Patología del  
Proyecto de Educación Veterinaria  
de la F.A.O. y U.N.A.M.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Virología e  
Inmunología de la Escuela Nacional de Medicina Veteri-  
naria y Zootecnia.

## I.- INTRODUCCION.

El término "Influenza Equina" se ha usado desde los años 1800, el cual describía un complejo de síndromes de etiología incierta, en relación a las enfermedades de las vías respiratorias de los caballos.

Hoy día esta denominación tiene una definición precisa, ya que el agente etiológico de dicha enfermedad, se ha descubierto y se sabe que es un virus identificado. Recientemente se reconoció que la Influenza humana era producido por varios tipos de virus como: A, B y C. Además que el virus de Influenza Suina pertenecía al tipo A.

En el año de 1955, en Suecia apareció un brote de una enfermedad respiratoria en caballos producida por un virus; Heller y Col, lo identificaron como virus tipo A. (1)

De este primer foco la enfermedad se difundió rápidamente por toda Europa, causando un brote severo en Checoslovaquia en 1956. (2)

Sovinova y Col, (3) en sus trabajos lo reportaron como virus Influenza tipo A, designándolo como: A/Equi 1/Praga/1/56; de acuerdo con la nomenclatura propuesta por la Organización Mundial de la Salud.

En 1963 se difundió la enfermedad en varios Estados de la Unión Americana. Apareció en Miami, Fla., el primer brote, causado según la opinión de la mayoría de los investigadores por los caballos importados de la Argentina.

Waddell y Col, (4) estudiaron el brote aislando el virus el cual difería inmunológicamente del tipo A/Equi/1, y lo identificaron como A/Equi/2/Miami/1/63.

Doll, (5) en sus estudios serológicos, demostró que en los E.E.U.U. un 60% de la población equina mostraba anticuerpos contra el virus de la Influenza tipo A.

En México, la Influenza Equina se ha diagnosticado clínicamente desde hace algunos años. En 1966 Cunha y Col, (6) lograron hacer el aislamiento-

e identificación del virus en el Departamento de Virología e Inmunología de la Escuela de Medicina Veterinaria; este virus fué clasificado como: A/Equi/2/México/1/66. De un segundo brote de la misma enfermedad Cunha y Col, (7) aislaron cuatro cepas mas de virus A/Equi/2/México/2/5/66.

Sería importante realizar un estudio serológico comparativo entre estas cepas, con vista a verificar si tienen propiedades similares o presentan características individuales.

En este trabajo, se presenta el estudio llevado a cabo con el fin de comparar las cepas referidas a través de la prueba de Inhibición de Hemaglutinación.

## II.- MATERIAL Y METODOS.

1.- Cepas: de virus de Influenza Equina A/Equi/2/México/1/5/66, procedentes del Laboratorio de Virología e Inmunología de la Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

2.- Embriones: de once días de incubados provenientes de gallinas Leghorns, para realizar los pasajes del virus.

3.- Gallos: de raza Leghorns de 11 semanas de edad y de 2.500 - Kgrs. de peso; se usaron 3 gallos por cepa; siendo 12 en total. Estos gallos estaban aparentemente normales.

### 4.- Preparación de Antisuero de gallo (8).

El antígeno procede de embriones de pollo de once días, inoculados en la cavidad alantoidea, con dosis de 0.2 ml., de una dilución adecuada de virus de siembra. Después de la inoculación los huevos son incubados a 37° C durante - 40 a 44 horas, y el líquido alantoideo se recoge después de meter los huevos en el refrigerador.

Después de una sangría preliminar para comprobar si no hay anticuerpos de esta enfermedad y con cepas recién aisladas se inocularon dos gallos, dejando un tercero igual como testigo por cada cepa. El líquido alantoideo que se usó para la inoculación tenía un título de hemaglutinación de 1:1 280. La inoculación se hizo por dos vías: la primera, 5 ml. por la intravenosa y la segunda 10 ml. por la intraperitoneal.

Se mantuvieron todos los animales aislados en jaulas y se enumeraron según las cepas; no mostraron síntomas durante el período de inmunización.

A los 16 días fueron sangrados por punción directa del corazón. La sangre se depositó en cajas de petri estériles y se dejaron a temperatura ambiente - por dos horas, después se colocaron en refrigeración por ocho horas y finalmente se recolectaron los sueros, los cuales fueron centrifugados a 2000 r. p. m. durante 20 minutos. Parte de los animales recibieron dos inoculaciones con 20 días de intervalo.

5.- Preparación de glóbulos rojos: tanto para las pruebas de Hemaglutinación e Inhibición de Hemaglutinación se emplearon glóbulos rojos de sangre de gallina obtenidos por punción cardiaca, recolectada en solución de citrato de sodio estéril al 2% y centrifugada a 1,500 r. p. m. durante 10 minutos; se lavó con solución salina al 0.85% por tres ocasiones; y finalmente se le agrega la cantidad necesaria de solución salina para integrar una suspensión de glóbulos rojos al 0.5%.

6.- Solución estéril de Periodato de potasio en una concentración de 0.5%.

7.- Solución estéril de Dextrosa en una concentración del 10%.

8.- Titulación del virus: Las 5 cepas de virus empleadas en las pruebas de Inhibición de Hemaglutinación, A/Equi 2/México/1-5-66 fueron tituladas previamente por la prueba de Hemaglutinación según el método de la O. M. S.

9.- Los sueros hiperinmunes preparados con las cepas 1 a 5 fueron examinados sucesivamente contra las cepas 1, 2, 3, 4, y 5 verificándose el título de los sueros frente a su propia cepa y las demás a través de la prueba de Inhibición de Hemaglutinación.

10.- Prueba de Inhibición de Hemaglutinación. Los sueros inmunes y normales fueron sometidos al Baño María durante 30 minutos y a una temperatura constante de 56° C para su inactivación.

Después se distribuyó 0.25ml. de solución salina al 0.85% a cada uno de los tubos excepto al primero; se distribuyó después suero diluido 1/8 en igual cantidad o sea 0.25 ml. al primero y segundo tubo; de este último se comienza a transferir 0.25 ml. a los siguientes, desechándose el del último tubo; obteniendo de esta manera diluciones dobles de 1/8 hasta 1/2048. Una vez hecha esta operación se les adiciona 0.25 ml. de la suspensión del virus a cada uno de los tubos, se agitan y se dejan a temperatura ambiente 15 minutos y como último paso se les agrega 0.5 ml. de la suspensión de glóbulos rojos al 0.5%. La lectura de la reacción se efectúa a los 60 minutos. Se hicieron controles de glóbulos rojos y de virus en cada prueba.

11.- Eliminación de Inhibidores Inespecíficos.

Los estudios realizados hasta la fecha han demostrado que existen dos tipos de Inhibidores: el Alfa y el Beta.

El Inhibidor Alfa se encuentra en el suero sanguíneo, albumina de huevo, estroma de glóbulos rojos, glándulas salivales y saliva; cuyas propiedades son las siguientes: es termoestable; es destruido por la R.D.E. (receptor-destroying-enzyme), tripsina y periodato de potasio y es competidor del receptor del glóbulo rojo.

El Inhibidor Beta se encuentra en el suero sanguíneo, pulmón de pollo y saliva; es termolabil y destruido por la tripsina. (9-10-11).

La presencia de estos inhibidores inespecíficos en los sueros nos pueden dar resultados dudosos al afectar la actividad hemaglutinante de los virus, dando resultados positivos falsos.

Por lo que se procedió a hacer el tratamiento de los sueros, con las soluciones de periodato de potasio y dextrosa, para destruir a los inhibidores inespecíficos; los pasos a seguir fueron los siguientes: 1.- Volumen de solución salina estéril al 0.85% (0.2ml) + un volumen de suero (0.2 ml) + 2 volúmenes de la solución de periodato de potasio (0.4 ml); se dejaron a temperatura ambiente por 20 minutos, pasado este momento se les agregó 4 volúmenes de la solución dextrosa (0.8 ml); quedando el suero en una dilución igual 1/8.

## III.- RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en las pruebas de hemaglutinación y en las diferentes pruebas de Inhibición de Hemaglutinación, realizadas en este trabajo se presentan en los cuadros No. 1, 2, y 3.

En el cuadro No. 1, se indican los títulos hemaglutinantes obtenidos en los distintos pases, observando un crecimiento progresivo de los títulos de los líquidos alantóicos infectados con las diversas cepas.

En el cuadro No. 2, se presentan los resultados de los sueros Normales e Inmunes examinados. Los sueros normales presentaron una inhibición inespecífica que fué removida con el tratamiento de periodato de potasio.

Los sueros inmunes fueron examinados sin tratamiento con la cepa No. 5 y con tratamiento, solamente con el fin de tener una indicación de título y su posible utilización posterior. Los resultados indican una alta formación de anticuerpos que persisten, aún en menor cantidad con el tratamiento.

En el cuadro No. 3, se presentan los resultados de inhibición de hemaglutinación cruzada de los diferentes sueros frente a las diversas cepas.

Las cepas mostraron títulos de inhibición de hemaglutinación con los diferentes sueros.

CUADRO No. 1

TITULOS HEMOAGLUTINANTES DE LIQUIDOS ALANTOICOS VIRULENTOS DE LAS DIFERENTES  
CEPAS DE INFLUENZA EQUINA: A/EQUI 2/MEXICO 1-5/66 EN DIVERSOS PASES.

CEPAS No.	NUMEROS DE PASES.								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	XIV
1 *	-	-	-	-	-	-	-	-	1 280 *'
2	20	40	160	80	160	320	640	1 280 *'	----
3	10	40	160	160	320	320	1 280	1 280	----
4	5	20	20	40	80	80	320	1 280	----
5	5	20	20	80	160	160	320	1 280	----

\* Esta Cepa fué recibida con el XIII pasaje.

\*' Ultima dilución del líquido alantoico presentando aglutinación completa.

CUADRO No. 2

TITULOS DE INHIBICION DE HEMAGLUTINACION DE SUERO DE GALLO NORMALES Y  
 POST-INMUNIZACION EXAMINADOS CON LA CEPA A/EQUI 2/MEXICO 5/66.

SUEROS		NORMALES		INMUNES	
CEPAS	GALLOS	SIN TRATAMIENTO	CON TRATAMIENTO	SIN TRATAMIENTO	CON TRATAMIENTO
1	I	64	0	2 048	128
1	II	64	0	2 048	256
2	III*	64	0	2 048	128
3	V*	64	0	2 048	128
3	VI*	32	0	1 024	128
4	VIII*	64	0	2 048	64
4	IX*	64	0	4 096	512
4	X	32	0	512	64
4	XIII	32	0	128	16
5	XI*	64	0	4 096	512
5	XII*	64	0	4 096	512

\* Gallos que recibieron 2 inoculaciones de virus.

CUADRO No. 3

TITULOS DE INHIBICION DE HEMAGLUTINACION DE LOS SUEROS FRENTE A LAS CEPAS  
DEL VIRUS A/EQUI 2/MEXICO 1/5/66

SUEROS		VIRUS-(CEPAS)				
CEPAS	GALLOS	1	2	3	4	5
1	I	256	256	128	128	128
1	II	512	512	256	256	256
2	III	128	256	512	256	128
3	V	128	512	256	256	128
4	VIII	128	1 024	256	128	64
4	IX	4 096	2 048	4 096	2 048	512
4	X	128	64	64	64	64
4	XIII	64	32	32	64	16
5	XI	4 096	2 048	1 024	512	512
5	XII	2 048	2 048	1 024	512	512

#### IV.- DISCUSION.

Para el estudio inmunológico de los virus de Influenza se pueden -- usar varias pruebas como: la de Suero Neutralización, Fijación de Complemento e Inhibición de Hemaglutinación, según métodos recomendados por el Comité de Ex-- pertos en Gripe y aprobados por la O.M.S.

Para la prueba de Suero Neutralización será necesario cultivos de -- tejidos o Huevos embrionados y de estirpes de virus pertenecientes a los distintos tipos; además de costosa esta prueba no permite una mejor identificación de cepa.

La prueba de Fijación de Complemento es empleada en la identifi-- cación de cepas recién aisladas y para el estudio de sueros mediante la comproba-- ción de anticuerpos.

Existen dos antígenos del virus Influenza que fijan el complemento: antígeno soluble (S) y el antígeno viral (V). El antígeno (S) es específico de tipo -- e idéntico para todas las variedades de un tipo. Los antígenos (V) tienden a ser -- específicos de cada variedad y probablemente son similares a los elementos respon-- sables de la hemaglutinación.

Es evidente que para la identificación de una cepa y para el serodiag-- nóstico específico de las mismas, deben obtenerse antígenos V, que esten excentos-- de toda traza apreciable de antígeno S, sueros Anti V, que no contengan Anti S; -- lo que se logra con tratamientos especiales. Se descartó la prueba de fijación de -- complemento por requerir un mayor número de material y por presentar mayores difi-- cultades en su realización.

En este trabajo se empleó la prueba de Inhibición de Hemaglutina-- ción por presentar mayor comodidad y sencillez; por ser una de las más comunmente usada y porque sus resultados son específicos y precisos.

Waddell y Col, hicieron el reconocimiento del nuevo tipo de virus-- A/Equi/2/Miami/1/63, utilizando la prueba de Inhibición de Hemaglutinación.

Esta prueba fué utilizada por Mc Queen y Col, (12) en la identifi-- cación de las cepas A/Equi/2/Detroit/1/9/63, y por otros investigadores en el es-- tudio serológico de brotes de la enfermedad. (13-14).

Los resultados obtenidos en este trabajo no difieren de los citados --  
anteriormente.

Los resultados del cuadro No. 3 muestran una variación de títulos -  
de sueros de una cepa frente a las otras cepas.

Esta variación no indica ser Cepa-Específica porque los títulos más-  
altos del suero de una cepa no son confirmados frente a sí mismos.

Esta variación de títulos debe derivarse de factores individuales de  
la técnica seguida.

## V.- CONCLUSIONES.

UNICA. - Los resultados de las pruebas de Inhibición de Hemaglutinación indican que no hay diferencia inmunológica entre las cepas Nos. 1, 2, 3, 4 y 5 de A/Equi/2 MEXICO 1-5/66.

## VI.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- "Zoonoses" Communicable Disease Center. U.S. Department of Health, -- Education and Welfare. Atlanta, Ga., Report No. 5, 33 pp., 1965.
- 2.- Ibidem.
- 3.- Ibidem.
- 4.- Waddell, C.H. (etal)  
A New Influenza virus associated with equine Respiratory disease. South American Veterinary Medical Association, pp., 587-590.
- 5.- Doll, G.R.  
"Equine Influenza". Equine Medicine and Surgery. American Veterinary Publications, Inc., Vol. I.
- 6.- Cunha, R. G. (etal)  
Influenza equina en México: aislamiento y estudio de la cepa A/EQUI, 2/México/1/66. México, trabajo presentado al Ter. Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 16-18 Nov., 1966.
- 7.- Cunha, R.G.  
González, L.  
Estudio de un brote de influenza en México. Causado por el virus A/-EQUI 2. México. (A ser publicado)
- 8.- "Comité de Expertos en virosis del aparato Respiratorio" Serie de informes técnicos. Organización Mundial de la Salud. No. 170, Primer informe, - pp., 41-42, 1959.
- 9.- Francis, T.  
"Dissociation of Hemogglutinig and Antibody Measuring Capacities of - Influenza Virus".  
Journal of Exp. Med., 1947.

- 10.- Kaplan, Martin M.  
Payne, A.M.M.  
Serological Survey in animals for type A Influenza in relation to the 1957 Pandemic. Bull World Health Organization, pp., 465-488, 1959.
- 11.- Jawetz, Ernest.  
Melnick, Joseph (etal)  
Manual de Microbiología Médica. México, El Manual Moderno, 2a. - Edición, pp. 21, 93, 356-372, 1966.
- 12.- Mc. Queen, J. L. (etal)  
"Studies of equine influenza in Michigan". American Journal Of Epidemiology. No. 83, pp. 271-279, 1966.
- 13.- Nature. No. 5044, July 2, pp. 101-102, 1966.
- 14.- Ceccarelli, G.  
Tassi, P.  
"Indagini sulla influenza equina in qualche provincia della 'Italia Centrale'". Zoofitosi. Anno XXI, No. 10, pp. 529-536, 1966.

#### OTROS LIBROS CONSULTADOS . -

- Andrews, C.H. (etal)  
"Influenza". A Review of current Research. Geneva, World Health Organization. pp., 94-96; 1954.
- Cunningham, C.H.  
Virología Práctica. Zaragoza, España. Editorial Acribia, pp. 90-100; - 1959.
- Guzmán Mijares, Leonardo.  
Utilización del Hamster, gallo y conejo en la producción de suero inmune -- contra el virus de la influenza equina, cepa A/EQUI, 2/México/1/66. México, - D. F., Tesis Profesional, 1966.
- Sandoval Delecolle, René.  
Encuesta Serológica en el Distrito Federal para la determinación de anticuerpos contra la influenza equina por medio de la prueba de inhibición de Hemaglutinación.  
México, D. F., Tesis Profesional, 1966.