

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

DETERMINACIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL EN HEMBRAS DE PIE
DE CRÍA Y SUS CRÍAS USANDO DOS VACUNAS COMERCIALES CONTRA
INFLUENZA PORCINA.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

MARTÍN GARCÍA OSORIO

Asesores:

MVZ, MC. Maria Del Carmen Mercado García.

MVZ, EPA. Alfredo García Rendón y López.

MVZ Francisco Rosales Espinosa.

México, D.F.

2007



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.

Dedicatorias.

A mi madre, por ese gran corazón.

A mi padre, en el lugar donde se encuentre.

A mis hermanos, por su gran fortaleza.

A mi familia.

A ti.

Por redimir mi vida con tus palabras, tus sonrisas, tu inmensa compañía

y tu generosa bondad.

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A mis asesores:

MVZ. Maria Del Carmen Mercado García.

MVZ Francisco Rosales Espinosa.

MVZ. Alfredo García Rendón y López.

A los miembros del jurado:

MVZ. Jorge Raúl López Morales.

MVZ Mario Enrique Haro Tirado.

MVZ. Francisco Javier Basurto Alcántara.

MVZ. Maria Del Carmen Mercado García.

MVZ. Humberto Ramírez Mendoza.

Mi mayor gratitud a todo el personal del Departamento de Producción Animal: Cerdos

En especial al MVZ Roberto Martínez Gamba por su gran apoyo

y al MVZ Gerardo Ramírez Hernández por sus enseñanzas.

CONTENIDO

Página

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Antecedente general de la enfermedad.....	3
1.2 Etiología.....	3
1.3 Epidemiología.....	6
1.4 Patogenia.....	8
1.5 Signos y Lesiones.....	9
1.6 Respuesta Inmune.....	11
1.7 Diagnostico.....	11
1.8 Tratamiento, prevención y control.....	13
1.9 Vacunas y vacunación.....	15
1.10 Aspectos históricos.....	21
1.11 Brotes pandémicos.....	21
1.12 Antecedentes en México.....	23
2. JUSTIFICACIÓN.....	26
3. OBJETIVOS.....	27

4.	HIPOTESIS.....	28
5.	MATERIAL Y METODOS.	
5.1	Granja.....	29
5.2	Inmunógenos.....	29
5.3	Procedimiento experimental.....	29
5.4	Toma de muestras y preparación de sueros.....	30
5.5	Análisis serológico	
5.5.1	Preparación de las muestras.....	31
5.5.2	Antígeno.....	31
5.5.3	Eritrocitos.....	31
5.5.4	Controles.....	31
5.6	Procedimiento de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.....	31
5.7	Análisis estadístico.....	32
6.	RESULTADOS.....	33
7.	DISCUSIÓN.....	40
8.	CONCLUSIÓN.....	43
9.	REFERENCIAS.....	44

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.

Cuadro	Título	Página.
1.	Segmentos de RNA y proteínas del virus de influenza tipo A	5
2.	Títulos promedio y desviación estándar obtenidos en Hembras de los diferentes grupos para el subtipo H1N1	33
3.	Títulos promedio y desviación estándar obtenidos de la inmunidad pasiva en los lechones de los diferentes grupos para el subtipo H1N1...	34
4.	Títulos promedio y desviación estándar obtenidos en Hembras de los diferentes grupos para el subtipo H3N2.....	35
5.	Títulos promedio y desviación estándar obtenidos de la inmunidad pasiva en los lechones de los diferentes grupos para el subtipo H3N2...	36
6.	Modas de los títulos obtenidos para H1N1 en las madres y en sus crías de los diferentes grupos.....	37
7.	Modas de los títulos obtenidos para H3N2 en las madres y en sus crías de los diferentes grupos.....	37
Figura	Título	Página.
1.	Títulos de anticuerpos promedio contra Influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 en hembras de los diferentes grupos.....	38
2.	Títulos de anticuerpos promedio contra Influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 de las crías provenientes de los diferentes grupos de hembras vacunadas.....	39

RESUMEN

GARCÍA OSORIO MARTÍN. Determinación de la inmunidad humoral en hembras de pie de cría y sus crías usando dos vacunas comerciales contra Influenza porcina. (Bajo la dirección de: MVZ, MC Ma. del Carmen Mercado García, MVZ, EPA. Alfredo García Rendón y MVZ Francisco Rosales Espinosa).

En este trabajo se evaluó el efecto inmunógeno de dos vacunas comerciales diferentes (Vacuna 1 y Vacuna 2) que contienen los subtipos H1N1 y H3N2 del virus de influenza porcina, formándose 4 grupos de 12 hembras cada uno. Grupo 1, formado por hembras que fueron vacunadas 1 mes antes del parto (Vacuna 1); Grupo 2 formado por hembras que fueron vacunadas cuando les faltaban 2 meses antes de la fecha de parto (Vacuna 1); Grupo 3, hembras previamente vacunadas (vacuna 1) y cuatro meses después re-vacunadas (Vacuna 2) cuando les faltaba un mes antes del parto; Grupo 4, hembras previamente vacunadas (vacuna 1) y cuatro meses después re-vacunadas (Vacuna 2) cuando les faltaba dos meses antes del parto. Se obtuvieron muestras de suero de cada grupo al momento del parto, así como de 2 de sus crías a las dos semanas de edad. Todas las muestras fueron analizadas mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. En las hembras para el subtipo H1N1 y en las crías para ambos subtipos se encontró una interacción ($P < 0.05$) entre el tipo de vacuna y el momento en que fueron aplicadas (1 o 2 meses antes del parto) concluyendo que los mayores niveles de anticuerpos se encuentran en las hembras con 2 vacunaciones 1 mes antes del parto, lo que también se observó en las crías de ese grupo (Grupo 3).

ABSTRACT

GARCIA OSORIO MARTIN. Determination of humoral immunity stand breeding females and their offspring using two commercial vaccines (Under the direction of: MVZ, MC Ma. del Carmen Mercado Garcia, MVZ, EPA. Alfredo Garcia Rendon and MVZ Francisco Rosales Espinosa).

This study evaluated the immunogenic effect of two different commercial vaccines (vaccine 1 and a vaccine 2) containing H1N1 and H3N2 subtypes of swine influenza virus, utilizing four groups of 12 sows each. Groups 1 was composed by sows that were vaccinated one month before farrowing (vaccine 1); Group 2 comprises sows that were vaccinated two months before farrowing (vaccine 2); Group 3 included previously vaccinated sows using vaccine 1, and re-vaccination (vaccine 2) was performed 4 months later, one month before farrowing; Group 4 included previously vaccinated sows using vaccine 1, and re-vaccination (vaccine 2) was performed 4 months later, two months before farrowing. Serum samples were collected from each group at farrowing, as well as two of their offspring at two weeks of age, and all samples were tested by the HI test. In sows considering the H1N1 subtype and in piglets considering both subtypes, it was found interaction ($P < 0.05$) between the type of vaccine and the vaccination schedule (1 or 2 months before farrowing). It was concluded that the highest antibody levels were found in sows with 2 vaccinations one month before farrowing, which also was observed in the offspring of that group (Group 3).

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTE GENERAL DE LA ENFERMEDAD

El virus de la influenza porcina afecta a cerdos de todas las edades y forma parte del complejo respiratorio porcino cuando se asocia con otros agentes infecciosos como el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio del Cerdo (PRRS), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, entre otros, lo que ocasiona cambios en la conversión alimenticia con la disminución de: la tasa de crecimiento, ganancia diaria de peso, consumo de alimento y el peso de los animales al mercado. Los cerdos afectados con problemas respiratorios presentan disminución en la ganancia de peso de 41.1 g diarios y tardan 16.7 días más en salir al mercado, aumentando los costos de producción. En brotes epizooticos del subtipo H3N2 hay abortos, lo que ocasiona pérdidas graves.¹

Los virus de influenza infectan a un amplio rango de hospedadores mamíferos y aviares. La transmisión cruzada entre especies y la constante evolución de los virus de la influenza tipo A, por medio de mutaciones y recombinaciones presenta un panorama complejo y dinámico.²

1.2 ETIOLOGÍA

La influenza porcina (IP) es una enfermedad infecciosa respiratoria aguda del cerdo causado por el virus de la influenza tipo A que pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* que comprende cuatro géneros antigénicamente distintos: Influenza virus A, Influenza virus B, Influenza virus C y Thogotovirus.³

La clasificación de los distintos tipos: A, B y C se basa en los antígenos de la nucleoproteína y de la proteína M (Matriz). La partícula vírica de influenza tipo A tiene un tamaño de 80 a 120 nm de diámetro, forma estructuras pleomórficas o esféricas y contiene un genoma de ocho segmentos de RNA de cadena sencilla y de polaridad negativa. Cinco de los segmentos son monocistrónicos y codifican para una proteína, mientras que los otros

tres contienen marcos abiertos de lectura (orf) para dos proteínas de cada uno de los tres segmentos. La nucleoproteína (NP) está unida a las cadenas de RNA, que en el microscopio electrónico, se observan como estructuras helicoidales. La envoltura viral es lipídica, se deriva de la membrana plasmática de la célula infectada y contiene dos glicoproteínas a manera de espículas, la Hemaglutinina (HA) y la Neuraminidasa (NA). En los virus de influenza A se describen 16 diferentes subtipos antigénicos de HA y nueve diferentes subtipos de NA. Cada virus de influenza contiene en cualquier combinación sólo un subtipo de HA (H1-H16) y un solo subtipo de NA (N1-N9), lo que puede generar un número extenso de posibles combinaciones o subtipos, de los cuales casi todos se encuentran en las aves silvestres acuáticas.^{3,4,5.}

La Hemaglutinina, es la responsable de la unión del virus a las células y produce la aglutinación de los eritrocitos. La Neuraminidasa, es la responsable de la elución enzimática del virus de los eritrocitos y puede jugar algún papel en la liberación del virus de las células infectadas. Los anticuerpos antihemaglutinina son de mayor importancia en la prevención de la infección con un virus de influenza que contienen la misma Hemaglutinina, mientras que los anticuerpos contra Neuraminidasa restringen la diseminación del virus a partir de células infectadas.⁶

En el cuadro 1 se describen las proteínas del virus de influenza tipo A y sus funciones.

Segmento de RNA	Nucleótidos	Proteína	Nombre de la proteína	Función de la proteína
1	2341	PB2	Polimerasa B2	Proteína interna de replicación viral.
2	2341	PB1	Polimerasa B1	Subunidad catalítica de la RNA polimerasa, proteína participante en la apoptosis.
3	2233	PA	RNA polimerasa	Proteína interna de replicación viral.
4	1778	HA	Hemaglutinina	Ligando del receptor, proteína participante de la apoptosis
5	1565	NP	Nucleoproteína	Cápside, participa en la replicación.
6	1413	NA	Neuraminidasa	Rompe el ácido siálico, facilita la liberación del virus y previene la agregación viral.
7	1027	M1	Matriz 1	Interactúa en el genoma, apoya en el ensamble viral.
		M2	Matriz 1	Forma el canal iónico, controla el pH intracelular y el desnudamiento.
8	890	NS1	No estructural 1	Controla la postranscripción, antagonista del interferón.
		NS2	No estructural 2	Exporta el RNA viral del núcleo, ensamble vírico.

Cuadro 1. Segmentos de RNA y proteínas del virus de influenza tipo A.³

La denominación internacional de los virus de influenza debe indicar: a) el género (tipo) del virus, b) la especie animal (en inglés) de la que se aisló –excepto cuando procede de humanos–, c) el lugar del aislamiento, d) el número de caso del laboratorio, e) el año del aislamiento, y f) el subtipo de HA y NA del virus entre paréntesis. Por ejemplo el virus de influenza porcina aislado en Wisconsin en 1984 se designaría: A/Swine/Wis/1/84(H1N1).^{2, 4, 7}

1.3 Epidemiología.

Los virus de la influenza porcina de los subtipos H1N1 y H3N2 son los que se describen más frecuentemente asociados con la enfermedad de los cerdos. En las cepas causantes se incluyen los H1N1, clásicos del cerdo, las cepas del tipo aviar H1N1 y las de tipo humano los H3N2.² Las evidencias indican que las aves acuáticas fueron el reservorio de los virus prototipo y que son el principal reservorio para la generación de los nuevos subtipos. La infección de las aves representa una relación agente-hospedador muy bien adaptada en el sentido que los virus de influenza no son virulentos para las aves salvajes y tienden a persistir en las poblaciones de aves. Las aves acuáticas son el depósito natural del virus de influenza tipo A que replican en el tracto gastrointestinal y es transmitida por ruta fecal-oral.⁸ El virus de la influenza es estable por lo menos durante 4 semanas en agua con una temperatura de 4°C y durante 5 días en agua a 20°C, propiedades que facilitan la transmisión entre las aves acuáticas y las aves de otras especies.²

Se sabe que los cerdos son susceptibles a los virus de influenza de las aves y de los mamíferos debido a que en su epitelio poseen receptores para ambos tipos de cepas. Por este motivo se ha implicado a los cerdos como intermediarios en la adaptación y recombinación de los virus aviares a los mamíferos.⁹ Los receptores para el virus de influenza presentes en las aves y caballos son de tipo ácido siálico alfa 2, 3 Gal y la ácido siálico alfa 2, 6 Gal, en humanos. Ambas cadenas del sitio receptor están presentes en el glucocáliz de las células de la traquea de los cerdos.¹⁰ La presencia de ambos tipos de receptores en los cerdos sugiere que éstos pueden infectarse con virus de aves y de humanos, mezclando y amplificando a los virus con potencial de zoonosis.¹⁰

Los virus que tienen mezclas de genes de diferentes virus de influenza A se denominan genotipos y las variaciones genéticas dentro de un mismo subtipo de virus se denominan linajes.⁴ Los virus de influenza experimentan un proceso de evolución continua mediado

por mutaciones que les permite adaptarse al hospedero y a las condiciones del ambiente, lo cual se conoce como presión selectiva o evolución obligada.¹¹ Las mutaciones se presentan como sustituciones de nucleótidos, inserciones y deleciones de tripletes que son causados principalmente por errores de la enzima polimerasa de RNA durante la transcripción, que ocurren en cada uno de los ocho segmentos genómicos del virus. Las mutaciones se van acumulando en cada ciclo de transcripción y generan variantes de estructura o función de las proteínas que expresan. Hay cambios mayores como los que se observan al comparar las 16 diferentes hemaglutininas, que muestran diferencias por lo menos en 30% entre ellas, lo que las hace diferentes desde el punto de vista antigénico.^{11, 12} Los cambios menores pueden ser irrelevantes, como los que ocurren en los virus encontrados en las aves silvestres acuáticas, que muestran que la mayoría de las sustituciones de nucleótidos no originan cambios en los aminoácidos de las proteínas, lo que indica una restricción en la evolución del virus en estas aves, mientras que las mutaciones que se acumulan en los virus en aves domésticas y mamíferos originan cambios en los aminoácidos y generan alteraciones importantes en su comportamiento biológico. Esto es lo que les permite infectar a especies diferentes, seleccionar poblaciones que no sean reconocidas por la respuesta inmune, generar familias resistentes a agentes antivirales o cambiar su tropismo celular, con lo que modifican su patogenicidad.^{11, 12} La continua circulación de virus de la influenza de tipo A en los cerdos puede resultar en la producción de nuevos virus recombinantes. Muchas granjas están infectadas endémicamente, a menudo con más de un subtipo, y esto crea un riesgo moderado de recombinación genética. Este es un proceso constante con un intercambio genético frecuente entre variantes circulantes del mismo virus.² En Italia, demostraron la recombinación de los virus aviarios y humanos en los cerdos, lo que prueba la capacidad del cerdo para actuar como un adaptador de virus no porcinos. Los análisis filogenéticos de virus humanos y aviarios de tipo H3N2 que

circulaban en los cerdos italianos revelaba que la combinación entre los virus aviares y de tipo humano han estado ocurriendo desde 1983.^{13, 14}

La aparición de nuevos serotipos en los cerdos no siempre tiene como resultado que estos se establezcan en una población inmunológicamente negativa. Un virus H1N7, aislado en los cerdos de Reino Unido en 1992, era antigénicamente único y derivaba de una recombinación entre virus humanos y equinos. Sin embargo, no se diseminó de los cerdos a otras especies.¹⁵

La deriva genética se refiere a las mutaciones en los determinantes antigénicos de las glicoproteínas de la envoltura viral y dan sustento a las variaciones antigénicas. Esto ocurre por la acumulación de mutaciones puntuales de nucleótidos, en particular en el segmento que codifica para la HA y que resulta en sustituciones de aminoácidos en los determinantes antigénicos; de ello se deriva la imposibilidad para que puedan unirse los anticuerpos generados por infecciones o inmunizaciones previas.²

1.4 PATOGENIA

El virus de la influenza porcina entra por vías respiratorias durante el contacto directo con animales infectados o por aerosoles que puede dar lugar a una diseminación rápida entre granjas de una zona de alta densidad porcina. El virus se adhiere a los residuos de ácido siálico en la superficie de las células de la traquea y de las células bronquiales.²

constante con un intercambio genético frecuente entre variantes circulantes del mismo virus.² En Italia, demostraron la recombinación de los virus aviáres y humanos en los cerdos, lo que prueba la capacidad del cerdo para actuar como un adaptador de virus no porcinos. Los análisis filogenéticos de virus humanos y aviáres de tipo H3N2 que circulaban en los cerdos italianos revelaba que la combinación entre los virus aviáres y de tipo humano han estado ocurriendo desde 1983.^{13, 14}

La aparición de nuevos serotipos en los cerdos no siempre tiene como resultado que estos se establezcan en una población inmunológicamente negativa. Un virus H1N7, aislado en los cerdos de Reino Unido en 1992, era antigénicamente único y derivaba de una recombinación entre virus humanos y equinos. Sin embargo, no se diseminó de los cerdos a otras especies.¹⁵

La deriva genética se refiere a las mutaciones en los determinantes antigénicos de las glicoproteínas de la envoltura viral y dan sustento a las variaciones antigénicas. Esto ocurre por la acumulación de mutaciones puntuales de nucleótidos, en particular en el segmento que codifica para la HA y que resulta en sustituciones de aminoácidos en los determinantes antigénicos; de ello se deriva la imposibilidad para que puedan unirse los anticuerpos generados por infecciones o inmunizaciones previas.²

1.4 PATOGENIA

El virus de la influenza porcina entra por vías respiratorias durante el contacto directo con animales infectados o por aerosoles que puede dar lugar a una diseminación rápida entre granjas de una zona de alta densidad porcina. El virus se adhiere a los residuos de ácido siálico en la superficie de las células de la traquea y de las células bronquiales.²

Después de 2 horas postinfección se puede demostrar por inmunofluorescencia en las células del epitelio respiratorio, 4 horas pos infección en los septos alveolares y 16 horas post infección en las mucosas bronquiales. Se presenta una hiperemia 24 a 72 horas post-

infección. A las 24 horas de la entrada del virus se puede encontrar por inmunofluorescencia en conductos alveolares y alvéolos. Se ha demostrado replicación del virus en la mucosa nasal, amígdalas, tráquea, linfonodos traqueobronquiales y en los pulmones, los cuales son el principal órgano blanco.^{6, 16}

El proceso patógeno alcanza su pico en aproximadamente 72 horas, después de lo cual, la replicación del virus disminuye y las células fluorescentes desaparecen: en la tráquea por el día 4, en los conductos alveolares, los bronquios y los bronquiolos alrededor del día 9, la reparación comienzan en el día 4, aunque sigue la presencia de células mononucleares y detritos celulares.¹⁶

El engrosamiento de los septos alveolares, pulmonía intersticial e hiperplasia del epitelio bronquial se observan más, alrededor del día 5 postinfección. Nueve días después de la infección hay una reacción celular máxima en el epitelio bronquial, septos alveolares, áreas peribronquiales y perivasculares.^{6, 16}

El virus de la influenza porcina no ha podido ser aislado de los pulmones u otros tejidos del sistema respiratorio después del día 7 postinfección.⁶

1.5 SIGNOS Y LESIONES

Es característico el inicio súbito de la enfermedad, que tras un periodo de incubación de uno a tres días, se presenta fiebre, inapetencia, tos y disnea. La temperatura corporal en los cerdos aumenta hasta 41° C en poco tiempo. En los lechones, la infección cursa de forma más leve y con menos fiebre. Los signos pueden ser: secreción ocular y nasal, heces pastosas, hipogalactia en cerdas lactantes e incluso abortos. Las cerdas que enferman durante la gestación, llegan a parir lechones pequeños, con poca vitalidad y menor resistencia.¹⁷

Existen tres periodos importantes cuando la enfermedad causa infertilidad:

1. Si las cerdas están enfermas en los primeros 21 días post-servicio, los embriones no se implantan y hay retorno a estro.
2. Si la infección se establece 14-16 días post-parto la consecuencia es un incremento en el intervalo destete presentación de celo.
3. Si la infección ocurre en las cinco primeras semanas de gestación puede haber mortalidad embrionaria, reabsorción o pseudogestación.

En los machos, la elevación de la temperatura corporal puede provocar efectos adversos sobre la espermatogénesis lo que provoca una fertilidad reducida.¹⁸

Lesiones Macroscópicas:

Se puede encontrar vías aéreas con exudado fibrinoso sanguinolento, linfonodos aumentados de tamaño, edema interlobulillar, tejido pulmonar con zonas consolidadas de color púrpura, en casos graves pleuritis fibrinosa. Las lesiones de influenza se pueden complicar con infecciones bacterianas.¹⁷

Lesiones Microscópicas:

Degeneración diseminada, necrosis del epitelio de bronquios y bronquiolos, alvéolos con exudado e infiltración de neutrófilos, hiperemia con dilatación de capilares, infiltración de los tabiques alveolares con linfocitos y células plasmáticas, proliferación de neumocitos tipo 2 y formación de membrana hialina en la luz de los conductos alveolares.¹⁷

1.6 RESPUESTA INMUNE

La respuesta de anticuerpos es rápida, la seroconversión ocurre a partir de los 3 días post-inoculación. Los anticuerpos específicos de subtipo son encontrados en las secreciones nasales de 5 a 10 días después de la inoculación, al mismo tiempo que hay una alta producción de interferón gamma en el bazo y ganglios traqueobronquiales como respuesta de la separación del virus de las células infectadas. Hay una aguda producción de citocinas como son el Factor de necrosis tumoral (TNF) e Interleucina 1 (IL1) esenciales para la rápida resolución de la enfermedad.^{19,20}

El pico de anticuerpos se alcanza a los 10 a 14 días postinfección y persisten moderadamente altos hasta por 4 semanas postinfección momento en el que comienzan a declinar. Los anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación pueden persistir hasta por 18 meses. En el tracto respiratorio también se producen inmunoglobulinas de tipo A que aparecen alrededor del octavo día postinfección. La respuesta humoral tras la vacunación es parecida a la que se observa en la infección aunque la vacunación parece que induce un nivel más bajo de anticuerpos. Los anticuerpos transferidos con el calostro se detectan hasta las 8 o 16, semanas dependiendo de su nivel inicial.^{2,6}

1.7 DIAGNÓSTICO

Los tejidos, en particular los pulmones, son usados para el aislamiento o detección del antígeno mediante el aislamiento viral, el cual se puede hacer con el uso de cultivo celular utilizando células de riñón de perro (línea celular MDCK), en que se espera observar daño celular, o bien utilizando huevos de gallina embrionados de 9-10 días de edad provenientes de aves libres de patógenos. Debido a que el virus de la influenza porcina no mata al embrión, se recolecta el líquido alantoideo después de 72 horas de incubación y se comprueba su capacidad de aglutinar eritrocitos de pollo, lo cual constituye una evidencia presunta de la presencia del virus de la influenza.^{2,6}

La inmunofluorescencia directa, la inmunohistoquímica, la ELISA de captura de antígeno buscan el antígeno en muestras de pulmones refrigerados a 4 °C que deben procesarse dentro de las primeras 48 horas postrecolección. Debido a que la inmunidad se desarrolla rápidamente, la mayoría de los cerdos eliminan el virus únicamente durante 5-7 días y, es en este tiempo, cuando se pueden tomar muestras de orificios nasales mediante el uso de hisopos.^{2,6}

Otra prueba para determinar la presencia del virus de la influenza porcina es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las pruebas basadas en PCR se pueden utilizar *ante mortem* mediante el uso de muestras de fluido nasal por medio de hisopos. La prueba ha demostrado tener una alta sensibilidad y especificidad comparado con la ELISA de captura y la inmunohistoquímica. La PCR aporta además la capacidad de diferenciar los subtipos directamente sobre muestras clínicas o sobre aislamientos.² La prueba RT-PCR se basa en la identificación del gen M y con el se pueden encontrar virus inusuales de influenza.²¹

El virus de influenza tiene la capacidad de producir aglutinación de los eritrocitos. Cuando el suero posee anticuerpos frente a un tipo de Hemaglutinina se inhibe la hemoaglutinación. Esta reacción es la base de la prueba de la inhibición de la hemoaglutinación para detectar anticuerpos contra el virus de la influenza porcina. Dado que la inhibición de la hemoaglutinación se basa en un único componente del virus no puede realizarse una sola prueba para detectar los anticuerpos de H1 y H3, es por ello que deben realizarse pruebas separadas con cada uno de los virus.² Con la prueba de inhibición de la Hemoaglutinación se puede detectar a las dos semanas de vacunación, el 55 % de los cerdos con un título mayor a 1:20. Los títulos más altos se observan 4 semanas después de la vacunación y son mayores de 1:320.⁶

Otras pruebas que pueden realizarse para la detección de anticuerpos son la seroneutralización y la prueba de ELISA.¹ Con la prueba de ELISA, el 50% de los cerdos

son seropositivos a las 2 semanas. A las 4 semanas de la vacunación, el 100% de los animales tienen seroconversión.⁶

En la Inmunodifusión en gel de agar, en pozos hechos en un gel de agar se les adiciona suero de cerdo y se les enfrenta al antígeno; después de un periodo de incubación, en que los anticuerpos del suero y el antígeno se difunden, se forman bandas de precipitación. El antígeno utilizado es la nucleoproteína del virus de influenza aviar tipo A. La prueba detecta anticuerpos precipitantes IgG de alto título, por lo que es de baja sensibilidad y alta especificidad. Tiene la ventaja de que no usa el virus patógeno.²²

1.8 TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL.

Durante los brotes agudos, el tratamiento de las infecciones por el virus de la influenza porcina se limita a establecer medidas de tipo paliativo como son: reducir el estrés, disminuir la fiebre mediante el uso de ácido acetilsalicílico, prevenir las infecciones secundarias y asegurarse de que los cerdos se encuentren en el ambiente más confortable que sea posible.² La prevención se basa en prácticas de manejo destinadas a reducir la entrada del virus de influenza porcina en una explotación. Las prácticas incluyen medidas de bioseguridad tales como: la limitación de acceso para personas y vehículos, la limpieza y desinfección exhaustiva y la cuarentena de cualquier cerdo nuevo que entre en la granja. Para minimizar las pérdidas reproductivas debidas al virus se puede vacunar a las cerdas de reemplazo, verracos, así como a las cerdas antes de parir.²

El uso de medicamentos antivirales contra la influenza humana es una alternativa a considerar en el control de la enfermedad. Hasta el momento existen cuatro medicamentos antivirales que han sido utilizados en el control de la infección. Se trata de la amantadina y la rimantadina, que bloquean al canal iónico que forma la proteína M2 en la envoltura viral, de manera que evita el cambio de pH requerido para separar la nucleoproteína de los segmentos genómicos durante el proceso de desnudamiento y la fusión de la envoltura

vírica con la membrana endosómica. Los inconvenientes para su uso provienen de la rápida resistencia que se produce a la acción de ambos medicamentos y de la producción de efectos colaterales, que en el caso de la amantadina se verifica en el sistema nervioso central y el hígado, y en el de la rimantadina, en los riñones. La rimantadina puede utilizarse con una dosis diaria en lugar de dos con amantadina. Además, la rimantadina presenta menos reacciones adversas.^{4,23} La amantadina demostró ser eficaz para disminuir la respuesta febril y la eliminación del virus en cerdos experimentalmente infectados. Sin embargo, no hay ningún tratamiento autorizado contra influenza porcina. Los nuevos medicamentos para el control de la influenza se basan en el bloqueo de la neuraminidasa. Las moléculas son inhibidores competitivos análogos del ácido Siálico que compiten con éste para prevenir la liberación de la partícula viral y su posterior distribución en el tracto respiratorio. Se han fabricado otras dos sustancias denominadas oseltamivir y zanamivir que se administran por vía oral y en aerosol intranasal, respectivamente, y ambas han demostrado eficiencia para el control de infecciones por virus de los subtipos H1 y H3, así como efecto variable con el virus H5N1. El zanamivir mostró resultados variables en

personas infectadas por el virus H5N1, sin embargo resultó efectivo en animales con infección experimental.⁴

1.9 VACUNAS Y VACUNACION

El impacto sobre la morbilidad y la mortalidad humanas ocasionadas por la infección con virus de influenza endémica estacional se puede prevenir con el uso de vacunas.⁴

Las vacunas de influenza porcina actualmente en uso son de virus inactivado (virus completo y por subunidades). Todas de manera general se obtienen a partir de virus cultivados en huevos de gallina embrionados en un largo proceso que toma entre 6 y 8 meses.^{24, 25}

En las vacunas inactivadas de virus enteros, el virus es cultivado en el saco alantoideo de los huevos de gallina embrionados, purificado, concentrado y finalmente inactivado usando formaldehído o β -propiolactona según el fabricante.²⁴ Las vacunas por subunidades son producidas de igual manera, pero las partículas virales son fragmentadas mediante el uso de detergentes y la HA y NA son purificadas eliminándose otros componentes virales. Estas vacunas causan menos reacción local y una simple dosis genera niveles adecuados de anticuerpos contra el virus.²⁴

Las vacunas ofrecen poca o nula protección cruzada entre diferentes subtipos, y la protección ofrecida una vez que ha habido una variación antigénica entre aislamientos no ha sido bien documentada. La vacuna ideal contra el virus de la Influenza Porcina debería inducir la producción de anticuerpos neutralizantes y una fuerte respuesta inmune celular. También se requiere del desarrollo de células citotóxicas para destruir las células infectadas por el virus. Idealmente, debería producirse una vacuna que protegiera contra la enfermedad provocada por todos los subtipos de influenza porcina. Actualmente hay vacunas de virus inactivado contra el virus de la influenza porcina, a pesar de que se están

llevando a cabo estudios con vacunas de virus vivo modificado, existe la preocupación de que pudiera ocurrir la reversión de la virulencia dada por un cambio antigénico.²⁴

Las vacunas actuales contra el virus de la influenza porcina inducen la producción de anticuerpos tanto sistémicos como locales, y deberían disminuir la cantidad de virus presentes en el cerdo y, por lo tanto, la cantidad de virus que se excreta dentro de una población. Las actuales vacunas son eficaces en la reducción de la enfermedad clínica. Aunque se sabe menos de la respuesta inmune celular en cerdos, las vacunas contra la influenza en los humanos han demostrado que inducen buenas respuestas, por lo tanto que se puede llegar a la hipótesis, de obtener resultados similares en los cerdos.²⁶

Debe tenerse cuidado de no vacunar antes de las 10 semanas de edad con el fin de evitar la interferencia producida por la inmunidad materna.⁶

Vacunas recombinantes.

Se ensayan también vacunas recombinantes que contienen diferentes proteínas virales (HA, NA, NP, M1, y/o M2) expresadas en diferentes sistemas: Baculovirus, Adenovirus y *E. Coli*.²⁴

Vacunas de ADN.

Otro campo en el que desde hace años se trabaja y cuyo inicio fue precisamente con el virus de la influenza, es el de las vacunas de ADN. Diversas construcciones que contiene genes de HA, NA, NP, M1 y NS combinados de diferentes maneras y asociados generalmente a inmunopotenciadores están teniendo una inmunorespuesta humoral y celular. A pesar de lo promisorio de esta tecnología, consideraciones fundamentalmente de tipo regulatorio han impedido su total desarrollo.²⁴

Vacuna universal.

Un aspecto muy importante, y que en conjunción con la aplicación de las tecnologías ya expuestas, resolvería definitivamente el problema de las vacunas contra influenza es la utilización de antígenos conservados para generar protección contra la enfermedad en lugar de antígenos tan variables como la HA. En la creación de una vacuna universal contra la influenza también se trabaja desde la última década del siglo pasado. Las proteínas NP, M y M2 han demostrado ser inmunogénicas y de reacción cruzada en los estudios hechos hasta el momento.²⁴

La vía para aumentar el efecto de la vacuna gripal mediante los adyuvantes es un campo en continua expansión, recientemente se han ensayado en modelos animales los adyuvantes LT-K63 y LTR72, fracciones derivadas de la enterotoxina termoestable de *E. coli*, con resultados prometedores. Algunas de estas experiencias en modelos animales han utilizado además la combinación de liposomas para vehicular interferón gamma en vacunas inactivadas compuestas de subunidades antigénicas de hemaglutinina y Neuraminidasa y conseguir un efecto inmunógeno mayor.²⁴

Vacunación en Humanos

Los virus de la influenza experimentan cambios frecuentes en sus antígenos de superficie.²⁷

La inmunidad adquirida tras la infección por uno de estos virus no genera una protección total contra las variantes antigénicas o genéticas del mismo subtipo (virus de tipo A) ni del mismo tipo (virus de tipo B). En consecuencia, cada año ocurren brotes epidémicos de influenza. Es necesario diseñar anualmente nuevas vacunas adaptadas a los virus que circulan, los cuales se prevé que serán la causa de la siguiente epidemia. En los países industrializados, las vacunas antigripales procuran una protección del 70% al 90% aproximadamente, contra la enfermedad clínica en los adultos sanos, siempre que los antígenos de la vacuna correspondan con los antígenos de los virus que circulan. La

vacunación antigripal durante el embarazo se considera segura y se recomienda para todas las mujeres embarazadas durante la temporada de influenza. Esta recomendación no sólo responde a la gravedad que puede alcanzar la influenza durante el embarazo, sino que busca proteger a los lactantes contra la influenza, pues son particularmente vulnerables durante sus primeros meses de vida.²⁸

La protección contra la enfermedad clínica proviene esencialmente de los anticuerpos séricos, mientras que las inmunoglobulinas de tipo IgA producidas en las mucosas contribuyen a la resistencia contra la infección. El principal objetivo antigénico de los anticuerpos neutralizantes es la hemaglutinina. Las concentraciones de anticuerpos séricos, medidas mediante la inhibición de la hemoaglutinación, parecen correlacionarse con la protección contra la infección y la enfermedad. Los linfocitos T citotóxicos específicos de la influenza y las células que originan una citotoxicidad dependiente de anticuerpos y con mediación celular permiten limitar la infección. Los anticuerpos contra la influenza pueden persistir durante meses o incluso años, aunque en algunos grupos de alto riesgo puede observarse una disminución de la concentración de anticuerpos pocos meses después de la vacunación.²⁸

Dentro de un subtipo dado, el efecto protector del anticuerpo inducido por una cepa particular puede disminuir o perderse como consecuencia de un fenómeno de deriva antigénica.²⁸

Existen dos tipos de vacunas antigripales, las vacunas inactivadas y las vacunas con cepas vivas atenuadas. De acuerdo con las recomendaciones de la OMS, las vacunas autorizadas en el mercado internacional contienen los dos subtipos H3N2 y H1N1 del virus de tipo A y un virus de tipo B. La actual vacuna rusa atenuada se prepara a partir de variantes atenuadas mediante resiembras a baja temperatura de una cepa H2N2, la cual ha tenido intercambios genéticos con las cepas epidémicas H1N1 y H3N2 y se combina con un virus

de la influenza tipo B, reordenado y también atenuado a baja temperatura. Este virus vacunal termosensible se reproducirá bien en el medio relativamente fresco de la nasofaringe, pero mal en las vías respiratorias inferiores. Los informes señalan que la vacuna es inocua y sumamente eficaz tras una dosis única en adultos y niños mayores de 3 años de edad.²⁸

Vacunación en aves.

La influenza aviar ha reabierto el debate internacional sobre la posibilidad de aprobar campañas de vacunación en aves. La experiencia en la prevención de brotes de influenza aviar en aves de corral de años previos recomienda estrategias que permitan diferenciar entre aves infectadas y aves vacunadas. Tras el brote de influenza aviar H7N1 que se declaró en 1999-2000 en la región del valle del Po en Italia, se desarrolló y aplicó una campaña de vacunación preventiva, en la que se utilizó la estrategia DIVA (diferenciación entre animales infectados y vacunados), con pavos, gallinas ponedoras y otras aves de corral en ciertas zonas de alto riesgo (de tránsito de aves migratorias). Se empleó una vacuna inactivada H7N3 contra el virus H7N1. La campaña fue de gran eficacia para la contención de los virus de influenza aviar de baja patogenicidad, evitando su mutación a cepas de alta patogenicidad. La estrategia DIVA requiere el empleo de vacunas apropiadas y pruebas diagnósticas específicas. Se basa en el uso de una vacuna inactivada que contiene el mismo subtipo de Hemaglutinina (H) que el virus escogido pero que tiene una Neuroaminidasa (N) diferente. Esta Neuroaminidasa diferente es la que permite marcar y diferenciar en un brote de influenza aviar, los animales vacunados de los naturalmente infectados y eliminar las restricciones aplicadas a la carne y derivados de aves de corral vacunadas, una vez que se demuestre claramente que las manadas están libres de infección. Las desventajas de la estrategia de vacunación DIVA son:

- Se necesitan de una a tres dosis para lograr una inmunidad adecuada, lo cual supone un costo importante y un retraso en la adquisición de la inmunidad.
- Excepto en gallinas y pavos, y hasta cierto punto en patos, los resultados no son completamente satisfactorios.
- La estrategia DIVA requiere un diagnóstico específico complejo.
- Independientemente de lo establecido en el Código de la OIE, puede suponer la aparición de restricciones comerciales unilaterales entre los países.^{29, 30}

La estrategia de vacunación DIVA se utiliza en cerdos para la inmunización de subunidades de la bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae*.³¹

En México se ha establecido la NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar Donde se establece que: “Habiéndose identificado en algunas entidades federativas virus de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad se autoriza la producción del biológico y su aplicación. Únicamente se autorizará la elaboración de vacuna inactivada de Influenza Aviar. Para la producción de vacunas se utilizará la semilla producida en la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios”.³²

1.10 ASPECTOS HISTÓRICOS

Los historiadores de la medicina afirman que la gripe ya era conocida desde la antigüedad. Existe la posibilidad de que la epidemia descrita por Hipócrates en el año 412 a.C. fuera de gripe. Otra epidemia de perfiles similares fue la que afectó al ejército griego en el sitio de Siracusa, en el año 395 a.C. El primer registro de una epidemia de gripe se refiere a la que ocurrió en Europa en el año 1170 d.C. a la que siguieron por lo menos 47 epidemias importantes en el viejo continente. En América, la primera descripción de un problema respiratorio severo de este tipo se documentó en Texcoco, en 1552, y se le denominó "pestilencia catarral". La primera pandemia reconocida ocurrió en 1580, que los italianos describieron como influencia de las estrellas, de ahí la denominación de influenza.^{33,4}

El virus de la influenza porcina se describió por primera vez en 1918 en Estados Unidos, Hungría y China. Coincidió con la pandemia de influenza humana más grave de los tiempos modernos que causó la muerte de más de 20 millones de personas en todo el mundo. Ahora se sabe que el agente causal de ambas infecciones fue un virus H1N1 que posiblemente derivó de un antecesor común. En 1930 el virus de la influenza porcina se aisló y fue identificado por el Dr. Richard Shope del Departamento de Patología Comparativa del Instituto Rockefeller en Princeton. Fue el primero en reproducir la influenza en cerdos sanos, inoculando material obtenido de cerdos enfermos que había sido filtrado mediante la cámara de Pasteur-Chamberland. Esta fue la primera evidencia de una etiología viral de la influenza porcina.⁶

1.11 BROTES PANDEMICOS

La influenza pandémica se refiere a la introducción y posterior diseminación mundial de un nuevo virus de influenza en la población humana, lo que ocurre de manera esporádica, y

que, debido a que los humanos carecen de inmunidad para el nuevo virus, pueden suscitarse epidemias graves con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. Históricamente el origen de las pandemias de influenza se debe a la transmisión de virus de aves al hombre o la transferencia de genes de éstos a los virus de la influenza estacional.³⁴

La pandemia de 1918-1919 (H1N1) causó la muerte mundial de 20 a 40 millones de personas, lo que representó del 2.5 a 5% de la población global, y se calcula que al menos 20% de la población mundial se infectó con el virus. En México, a finales de 1918 se registraron brotes en Torreón, Gómez Palacio y San Pedro de las Colinas, al grado de que se registraron hasta 300 defunciones en la primera de las localidades mencionadas, calculándose que durante dicha epidemia murieron en esas poblaciones alrededor de 21 mil personas. La pandemia de influenza de 1918-1919 produjo en México – (que entonces tenía 14 millones de habitantes)- 500 mil víctimas mortales, con una tasa de mortalidad de entre 22 y 35%.³³

Influenza asiática de 1957 (H2N2). La pandemia de 1957 se inició cuando un virus de origen aviar del subtipo H2N2 aportó, mediante un proceso de recombinación, tres genes al virus H1N1 circulante. Los genes donados fueron los de la HA, NA y PB1. El virus resultante, con nuevas proteínas HA y NA, con las cuales la población humana no había tenido contacto, se difundió con celeridad en dos oleadas que causaron una alta morbilidad y una mortalidad que, aunque no fue semejante a la de 1918, se calcula que alcanzó de uno a cuatro millones de personas. Como el origen se identificó en Singapur, se le denominó "influenza asiática". La alerta temprana de un problema respiratorio con elevada morbilidad en Hong Kong, la pronta identificación y caracterización del nuevo virus de influenza, y el rápido desarrollo y distribución de la vacuna específica contribuyeron a minimizar los efectos de la pandemia.^{4,7}

Influenza de Hong Kong (H3N2) en 1968. Una nueva recombinación ocurrió entre el virus H2N2, circulante en humanos, con un virus aviar del subtipo H3. El total de fallecimientos global se estimó en cuatro millones de personas debido a que, en contraste con la detección temprana del virus de la pandemia anterior, en 1968 la detección tuvo lugar de manera tardía y no se produjo una vacuna con oportunidad.^{4,7}

Influenza New Jersey (H1N1) 1976. Se aisló un virus A/NJ/8/76(H1N1) relacionado a los virus de influenza porcina, a partir de reclutas militares enfermos en el fuerte Dix, NJ. Por consiguiente, se inició un programa nacional para vacunar a los seres humanos contra el virus y también se inicio un programa de vigilancia para investigar a los cerdos y su contacto con los seres humanos. La naturaleza zoonótica del virus se comprobó en noviembre de 1976 cuando se aisló a partir de cerdos y de su cuidador el virus de Influenza H1N1.⁶

Influenza rusa (H1N1)1977. El origen del virus es incierto ya que permaneció oculto por al menos 20 años ya que los estudios de secuenciación indicaron su similitud con el virus H1N1 que circulaba en 1957 y que pudo haber sido liberado por algún laboratorio de manera accidental. El brote se inició en la región sur de Rusia en octubre y para febrero del siguiente año el virus se había difundido a todo el mundo. Debido a que la población mayor de 20 años había tenido contacto previo con el virus, el impacto fue mayor en individuos menores de esta edad, en quienes causó una elevada tasa de morbilidad y mortalidad.⁶

1.12 ANTECEDENTES EN MEXICO

En 2003 en un estudio donde se involucraron 240 granjas porcinas de ciclo completo ubicadas en los Estados de México, Guanajuato y Jalisco, se identificaron anticuerpos contra PRRS, Coronavirus Respiratorio Porcino, Enfermedad de Aujeszky, Enfermedad del Ojo Azul e Influenza Porcina. Se concluyó que los animales con anticuerpos contra el

virus del PRRS presentaron asociación serológica con Coronavirus Respiratorio Porcino, Influenza Porcina, virus de la Enfermedad de Aujeszky y de la Enfermedad del Ojo Azul.³⁵

En el 2003 se realizo un estudio en la zona centro del Estado de Yucatán en 25 granjas porcinas de ciclo completo. El número de cerdos muestreados por granja fue de 40, diez por cada etapa de producción (destete, crecimiento, desarrollo y finalización). Se utilizo la prueba de inhibición de la hemoaglutinación para los subtipos H1N1 y H3N2. De los 1000 cerdos muestreados 83 fueron positivos al subtipo H1N1 y 651 al subtipo H3N2. Estos resultados indican alta frecuencia (56%) del subtipo H3N2, como la descrita en países de Europa, lo que indica que el virus de la influenza porcina tiene una alta distribución en las granjas porcinas del mundo. El subtipo H3N2 mostró mayor frecuencia que el subtipo H1N1 en las distintas etapas de producción.¹

En el 2005 se determinaron los anticuerpos contra influenza porcina subtipo H3N2 en los diferentes estados de la república mexicana y se encontró que de 1850 sueros se detectaron 796 (43%) seropositivos para el subtipo H3N2 para el virus de influenza porcina.³⁶

Un estudio del 2006 de seroprevalencia realizado para el subtipo H3N2 del virus de la influenza porcina en las etapas de: pie de cría y engorda. Se encontró que de los trescientos sueros analizados por etapa el 47 % de los animales en pie de cría eran seropositivos y en la etapa de engorda el 47.6 % lo cual no mostró diferencia estadística por etapas.³⁷

En zonas rurales en el estado mexicano de Yucatán, en el municipio de Maxcanu el “sistema de traspatio,” es el sistema de producción en el cual los animales tales como cerdos, patos, pavos, y pollos están todos en proximidad a los seres humanos, este sistema es a la actividad tradicional de personas indígenas mayas de los cuales se tomaron 115 muestras de sangre y por medio la prueba de inhibición de la hemoaglutinación se encontró que la seropositividad era: 26.9% a A/Bayern/7/95 (H1N1) , 40.8% a A/Sydney/5/97

(H3N2), 1.7% a A/Swine/Wisconsin/238/97 (H1N1), y 79.1% a A/Swine/Minnesota/593/99(H3N2). Este es el primer informe en México del predominio de anticuerpos al virus de la gripe de los cerdos en seres humanos.³⁸

2.0 JUSTIFICACIÓN

La Influenza Porcina es una enfermedad que tiene el potencial de causar problemas sanitarios severos en granjas porcinas, especialmente cuando se asocia con otros agentes etiológicos. Actualmente el desarrollo y la aplicación de inmunógenos es el principal método para contrarrestar los efectos de la enfermedad. Por lo tanto es importante evaluar los esquemas de vacunación que se están llevando a cabo en las granjas porcinas y los biológicos existentes en el mercado nacional.

La vacunación en sábana (masiva o simultáneamente a todo el hato) es una de ellas, sin embargo al aplicarse en momentos diferentes de la gestación, pudiera ser que las hembras pierdan inmunidad entre una aplicación y otra, o bien que no transfieran suficiente inmunidad a sus lechones. Por otro lado, al aplicarse en un tiempo fijo (cada cuatro meses), las hembras tendrán diferentes edades de gestación en cada aplicación, lo que obliga a determinar la duración de dicha inmunidad para poder definir el tiempo al que debería repetirse la vacunación. También es común el hecho de que en las granjas se cambie de marca comercial entre una aplicación y otra, esto se hace por diversos motivos: precio y disponibilidad en el mercado entre las principales.

3.0 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la presencia de anticuerpos al momento del parto en hembras y en sus crías mediante la aplicación de un esquema de inmunización en diferentes momentos de la gestación, con una sola vacunación y el efecto de una segunda aplicación con una marca comercial diferente cuatro meses después y así poder determinar cual es el mejor momento para inmunizar a las cerdas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el estado inmunológico de las hembras antes de aplicar la primera vacunación para establecer los títulos de anticuerpos basales antes de la vacunación.
- Inmunizar cerdas con uno y dos meses de gestación mediante la aplicación de una (Grupo 1 y 2) y dos vacunaciones en un intervalo de 4 meses (Grupo 3 y 4) y así establecer en que momento se obtienen mayores títulos de anticuerpos.
- Obtener sueros de las cerdas inmunizadas mediante la colección de sangre al día del parto y de una muestra de sus crías, a las 2 semanas de edad para realizar las pruebas serológicas.
- Comparar los títulos de anticuerpos contra la influenza porcina para los subtipos H1N1 y H3N2 mediante la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación tanto en las hembras como en sus crías.
- Comparar los títulos de anticuerpos entre grupos mediante la prueba de Análisis de Varianza y saber si hay diferencia estadística entre ellos.

4.0 HIPÓTESIS

La aplicación de una o dos vacunas contra influenza porcina (subtipos H1N1 y H3N2) a hembras reproductoras a las que les falten uno o dos meses para parir, en forma masiva y simultánea en esquema de hato reproductor completo, no afecta la inmunidad activa generada en las hembras, ni en la pasiva transferida a los lechones.

5.0 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Granja

El trabajo se llevo a cabo en una granja sitio 1 de 1400 hembras ubicada en Tepalcingo, Estado de Morelos, región de clima cálido subhúmedo, registra una temperatura media anual de 23.6° C, con una precipitación pluvial de 942.9 milímetros anuales. Esta granja tiene antecedentes de la presencia del virus, pero no de vacunación previa contra Influenza porcina. Las hembras se encuentran alojadas en jaulas de gestación en las áreas de servicio y gestación (donde fueron vacunadas) y una semana antes del parto son cambiadas a la sala de Maternidad.

5.2 Inmunógenos:

1. **Vacuna comercial Flusure** (Pfizer) liofilizada que contiene 2 subtipos H1N1 y H3N2 de virus inactivados de Influenza con adyuvante de aceite en agua el cual es utilizado para rehidratar la vacuna liofilizada (V 1).
2. **Vacuna comercial Maxivac Excell 3** (Lab. Schering-Plough) es una vacuna de virus inactivado que contiene 2 subtipos H1N1 y H3N2 (V 2).

5.3 Procedimiento experimental

Se seleccionaron aleatoriamente cuatro grupos de animales de 12 hembras cada uno compuesto con el siguiente tipo de animales: 2 reemplazos, 2 de primer parto, 2 de segundo parto, 2 de tercer parto, 2 de cuarto parto y 2 de quinto parto.

Se aplicaron a las cerdas dos vacunaciones en esquema de ható completo con vacunas comerciales contra influenza porcina.

Conformación de los grupos:

Vacuna 1 (V1)	
Grupo 1	Grupo 2
12 Hembras vacunadas un mes antes de la fecha probable de parto	12 Hembras vacunadas dos meses antes de la fecha probable de parto

Vacuna 2 (V2)	
Grupo 3	Grupo 4
12 Hembras vacunadas un mes antes de la fecha probable de parto	12 Hembras vacunadas dos meses antes de la fecha probable de parto

Cronograma	
Días	Actividades
0	Muestreo Basal
1	Inmunización de todos los grupos con V1
30	Muestreo de cerdas paridas (Grupo 1)
44	Muestreo de lechones del grupo 1
60	Muestreo de cerdas paridas (Grupo 2)
74	Muestreo de lechones del grupo 2
134	Inmunización de los grupos 3 y 4 con V2
164	Muestreo de cerdas paridas (Grupo 3)
174	Muestreo de lechones del grupo 3
194	Muestreo de cerdas paridas (Grupo 4)
208	Muestreo de lechones del grupo 4

5.4 Toma de muestras y preparación de sueros:

Las muestras fueron tomadas con jeringas de 20 ml y aguja del No. 18 para las cerdas y para los lechones con jeringas de 10 ml y agujas del No. 21 a partir del golfo de yugulares, sin anticoagulante. Las muestras de sangre se centrifugaron para la obtención del suero, se colocaron en tubos Eppendorff y se conservaron a -20°C hasta su procesamiento. Todas las muestras se procesaron y trabajaron en el Laboratorio de Virología del Departamento de Producción Animal: Cerdos (DPAC), de la FMVZ en la UNAM

5.5 Análisis serológico:

5.5.1 Preparación de muestras.

Todos los sueros se colocaron en baño maría a 56°C durante 30 min, con el fin de inactivar el complemento. Para eliminar hemaglutininas inespecíficas y posibles contaminantes se tomaron 60 microlitros de suero y se le adicionaron 120 microlitros de caolín y 120 microlitros de eritrocitos de ave al 5% (Dilución 1:5). Se dejaron en refrigeración durante 24 hrs. para que sedimenten el caolín y los eritrocitos.

5.5.2 Antígeno.

Se utilizaron antígenos de referencia H1N1 y H3N2 (donados por los Lab. Pfizer). Los cuáles fueron titulados previamente y ajustados a 8 unidades hemoaglutinates (UH) en 50 microlitros.

5.5.3 Eritrocitos.

Se utilizo una suspensión de eritrocitos de ave al 0.5% preparada en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con pH de 7.0 a 7.2.

5.5.4 Controles.

Suero control positivo para H1N1 (suero hiperinmune polivalente elaborado en conejo).

Suero control positivo para H3N2 (suero hiperinmune polivalente elaborado en conejo).

Suero control negativo de cerdo (tomado del banco de sueros del DPAC).

Control de virus (Cepas de referencia donadas por Laboratorios Pfizer)

Control de eritrocitos de ave.

5.6 Procedimiento de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación

1. Se colocaron 50 microlitros de PBS en microplacas de 96 pozos fondo en “U”.

2. En la hilera “A” de la placa se colocaron 50 microlitros de cada suero problema y de los controles (positivo y negativo) (Dilución de suero 1:10).
3. Se realizaron diluciones dobles seriadas transfiriendo 50 microlitros (desde 1:10 hasta 1:1280).
4. Se colocaron 50 microlitros de antígeno y se dejó incubar por media hora.
5. Se colocaron 50 microlitros de eritrocitos al 0.5% y se esperó a que el control de eritrocitos sedimentara.
6. Realización de la lectura. El título de los sueros se dio en la dilución inversa a donde se comenzó a presentar aglutinación.

5.7 Análisis estadístico

Primero se realizó una transformación logarítmica base 10 de los títulos serológicos, obtenidos para cumplir el supuesto de normalidad. Para el análisis de estos datos se empleó un análisis de varianza (ANDEVA) con un diseño de dos factores completamente aleatorizados y con el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

μ = media

α = i-ésimo efecto del número de vacunas aplicadas ($i = 1, 2$).

β = j-ésimo efecto del periodo posvacunación ($j = 1, 2$).

$\alpha\beta$ = efecto de la interacción entre el número de vacunas aplicadas y el periodo posvacunación.

ε = Error aleatorio.

Para el análisis se utilizó el paquete estadístico JPM.³⁹

6.0 RESULTADOS.

6.1 Serología para el subtipo H1N1

Las 48 cerdas gestantes seleccionadas eran serológicamente negativas antes de la aplicación de las vacunas, ya que tuvieron un título de anticuerpos basales de 1:20 (\pm 1.72) y la dilución en la que se consideran positivos es a partir de 1:80.

En el cuadro 2 se observan que las 12 hembras que recibieron la vacuna 1, un mes antes de la fecha probable de parto (Grupo 1) tuvieron al parto un promedio de títulos de anticuerpos de 1:90.

Para las 12 hembras que recibieron la vacuna 1, dos meses antes de la fecha probable de parto (Grupo 2) tuvieron al parto un promedio de títulos de anticuerpos de 1:90.

Las 12 hembras que recibieron la vacuna 2, un mes antes de la fecha probable de parto (Grupo 3) tuvieron al parto un promedio de títulos de anticuerpos de 1:320.

Para las 12 hembras que recibieron la vacuna 2, dos meses antes de la fecha probable de parto (Grupo 4) tuvieron al parto un promedio de títulos de anticuerpos de 1:127.

CUADRO 2: Títulos promedio y desviación estándar obtenidos en Hembras de los diferentes grupos para el subtipo H1N1.

H1N1 (n= 12)	
Hembras	Promedios (Desv.est.)
Grupo 1	90 (\pm 1.49)
Grupo 2	90 (\pm 1.78)
Grupo 3	320 (\pm 3.5)
Grupo 4	127 (\pm 1.87)

En el cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos del muestreo de las 48 crías (dos por camada) se observa que el título de anticuerpos más alto se obtiene de las crías de las hembras a las que se les aplicó la vacuna 2 un mes antes de la fecha probable de parto (Grupo 3), con un promedio de título de anticuerpos de 1:277 y el promedio de los títulos de anticuerpos pasivos más bajo registrado fue el proveniente de los lechones de las hembras a las que se les aplicó la vacuna 1 un mes antes de la fecha probable de parto (Grupo 1) con un título de de 1:32.

CUADRO 3: Títulos promedio y desviación estándar obtenidos de la inmunidad pasiva en los lechones de los diferentes grupos para el subtipo H1N1.

H1N1 (n= 24)	
Crías	Promedios (Desv.est.)
Grupo 1	32 (± 1.62)
Grupo 2	35 (± 1.5)
Grupo 3	277 (± 2.43)
Grupo 4	73 (± 2.68)

6.2 Serología para el subtipo H3N2

Los títulos de anticuerpos basales para las 48 hembras fue de 1:27 (± 1.63) por lo cual son considerados negativos ya que a partir de la dilución 1:80 se consideran positivos.

En el cuadro 4 se muestran los resultados de la serología de las hembras de pie de cría hacia el subtipo H3N2, donde se observa que las 12 hembras que recibieron la vacuna 1, un mes antes de la fecha probable de parto (Grupo 1) el promedio de títulos de anticuerpos obtenido al momento del parto fue de 1:640.

Las 12 hembras que recibieron la vacuna 1, dos meses antes de la fecha probable de parto (Grupo 2) el promedio de títulos de anticuerpos obtenido al momento del parto fue de 1:479.

Para las 12 hembras que recibieron la vacuna 2, un mes antes de la fecha probable de parto (Grupo 3) el promedio de títulos de anticuerpos obtenido al parto fue de 1:570.

Las hembras que recibieron la vacuna 2, dos meses antes de la fecha probable de parto (Grupo 4) el promedio de títulos de anticuerpos obtenido al parto fue de 1: 427.

CUADRO 4: Títulos promedio y desviación estándar obtenidos en Hembras de los diferentes grupos para el subtipo H3N2.

H3N2 (n= 12)	
Hembras	Promedios (Desv.est.)
Grupo 1	640 (± 1.69)
Grupo 2	479 (± 1.87)
Grupo 3	570 (± 2.13)
Grupo 4	427 (± 1.73)

En el cuadro 5 se observan los resultados obtenidos del muestreo de las 48 crías donde el título de anticuerpos más alto estuvo en los lechones provenientes de hembras a las que se les aplicó la vacuna 2, un mes antes de la fecha probable de parto con un promedio de título de anticuerpos de 1:554 y el título de anticuerpos pasivos más bajo registrado fue el proveniente de las crías de las hembras a las que se les aplicó la vacuna 2, dos meses antes de la fecha probable de parto con un título de de 1:190.

CUADRO 5: Títulos promedio y desviación estándar obtenidos de la inmunidad pasiva en los lechones de los diferentes grupos para el subtipo H3N2.

H3N2 (n= 24)	Mes 1
Crías	Promedios (Desv.est.)
Grupo 1	453 (± 2.26)
Grupo 2	320 (± 2.49)
Grupo 3	554 (± 2.08)
Grupo 4	190 (± 2.45)

En el cuadro 6 se observan las modas obtenidas para el subtipo H1N1 en donde los valores altos se obtuvieron mayoritariamente con la vacuna 2. En el caso de las hembras la moda de título de anticuerpos mas alto se encontró en las hembras del grupo 3 con un título de 1:320 y los valores más bajos se encontraron en las hembras del grupo 1 y 2 con un título de anticuerpos de 1:80. En el caso de las crías la moda más alta se encontró en las crías provenientes de hembras del grupo 3 y el valor más bajo en las crías provenientes del grupo 1 con un título de anticuerpos de 1:20.

CUADRO 6: Modas de los títulos obtenidos para H1N1 en las madres y en sus crías de los diferentes grupos.

Hembras		Crías	
Grupo 1	80	Grupo 1	20
Grupo 2	80	Grupo 2	40
Grupo 3	320	Grupo 3	320
Grupo 4	160	Grupo 4	80

En el cuadro 7 se observan las modas obtenidas para el subtipo H3N2 en donde los valores altos se obtuvieron en las hembras del grupo 3 con un valor de 1:1280 y de las crías provenientes de este grupo con un título de 1:640. La moda del valor bajo se encontró en las hembras del grupo 2 y 4 con un valor de 1:320 y en sus crías con un título de 1:160.

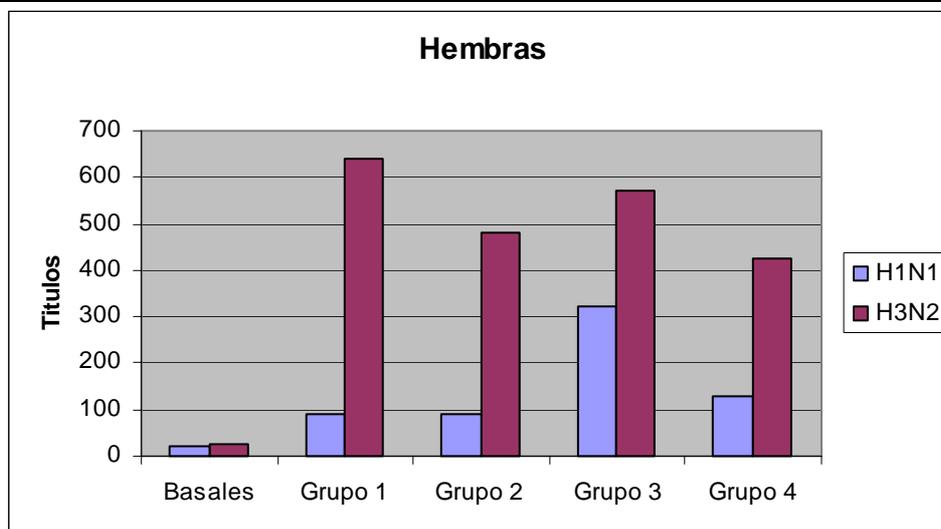
CUADRO 7: Modas de los títulos obtenidos para H3N2 en las madres y en sus crías de los diferentes grupos.

Hembras		Crías	
Grupo 1	640	Grupo 1	320
Grupo 2	320	Grupo 2	160
Grupo 3	1280	Grupo 3	640
Grupo 4	320	Grupo 4	160

En la Figura 1 aparecen graficados los promedios de los títulos de anticuerpos contra Influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 en hembras. Los resultados de las hembras para el subtipo H1N1, el valor más alto de títulos de anticuerpos se obtuvo en el grupo 3 con un título de anticuerpos promedio de 1:320 y el menor lo obtuvieron las hembras del grupo 1

y 2 con un título de anticuerpos promedio de 1:90. Para el subtipo H3N2 el valor más alto de títulos de anticuerpos se obtuvo de las hembras del grupo 1 con un título de anticuerpos promedio de 1:640 y el menor valor lo obtuvieron las hembras del grupo 4 con un título de anticuerpos promedio de 1:427.

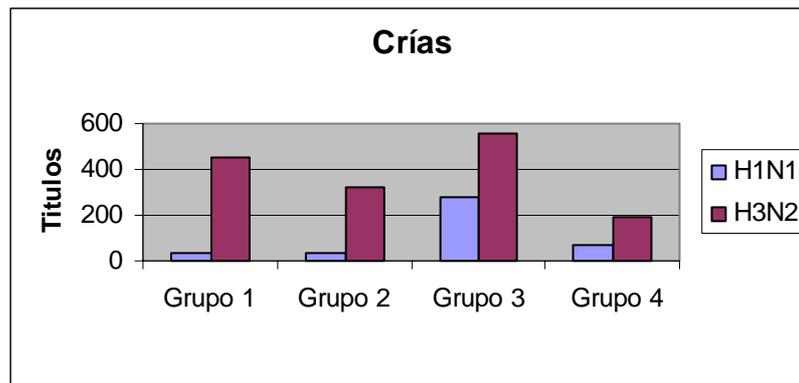
Figura 1: Títulos de anticuerpos promedio contra Influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 en



En la figura 2 aparecen los títulos promedio de las crías de los diferentes grupos de hembras. El título promedio mas alto de anticuerpos para el subtipo H1N1 corresponde a las crías provenientes de hembras del grupo tres con un titulo promedio de anticuerpos de 1:277 y el menor corresponde a las crías provenientes de las hembras del grupo 1 con un

título promedio de anticuerpos de 1:32. Para H3N2, el título promedio más alto en las crías fue de las provenientes de hembras del grupo 3 con un título promedio de anticuerpos de 1:554; mientras que el título promedio menor fue en las crías provenientes de hembras del grupo 4 con un título promedio de anticuerpos 1:190.

Figura 2: Títulos de anticuerpos promedio contra Influenza porcina subtipos H1N1 y



En las hembras, para el subtipo H1N1 se encontró interacción entre el tipo de vacuna y el momento de la vacunación ($P=0.0467$). Para H3N2 no se encontraron diferencias entre las vacunas ($P= 0.523$) ni entre los momentos de la vacunación ($P= 0.115$). En las crías, para H1N1y H3N2 se encontró una interacción entre la vacuna y el momento de la vacunación ($P<0.001$ y $P=0.038$ respectivamente).

7.0 DISCUSIÓN.

Para el subtipo H1N1 los títulos de anticuerpos más altos se dieron al recibir el refuerzo 4 meses después un mes antes de la fecha probable de parto con la vacuna Maxivac Excell 3, lo que puede ser debido a que contiene cepas de H1N1 clásicas y H1N1 recombinante. Los títulos de anticuerpos más altos para el subtipo H3N2 se obtuvieron al vacunar a las hembras un mes antes de la fecha probable con la vacuna I (Flusure) lo que ayudaba a tener títulos de anticuerpos pasivos altos.

Se reconoce el papel del cerdo como hospedador intermediario, adaptador y amplificador de ciertos subtipos virales para infecciones en humanos. Los estudios genéticos de los virus de influenza clásica del cerdo y en humanos de los subtipos H1 y H3 indican que tienen un ancestro común de origen aviar y una relación filogenética cercana entre ellos.⁴⁰

La vacunación contra el virus de la influenza porcina es una herramienta usada que ayuda a prevenir y controlar la enfermedad en cerdos.⁴⁰ Asimismo el monitoreo de los programas de vacunación requiere de técnicas estandarizadas que permitan conocer el estado de los hatos vacunados.⁴¹

En este experimento se midieron los anticuerpos activos y pasivos mostrándose que para el subtipo H1N1 de la vacuna de Flusure (Pfizer) y Maxivac Excell 3 (Shering Plough), el promedio de los títulos de anticuerpos fue diferente durante el primer periodo comparado con el segundo y según Kristien *et al.* uno de los mayores problemas en las vacunas es que su contenido de hemaglutininas no está estandarizado. En el caso de las vacunas utilizadas en el ser humano y en los equinos se ha demostrado que existe una relación directa entre la cantidad de hemaglutininas y los niveles de anticuerpos y que, para lograr una buena protección se han fijado límites para hacer las vacunas.⁴²

La determinación de anticuerpos dos meses después aplicada la vacuna fue con el objetivo de comprobar si había una producción de anticuerpos o estos declinaban ya que en la etiqueta de la vacuna de Maxivac garantiza que con su adyuvante estimula la inmunidad hasta por tres meses después de la vacunación, sin embargo los resultados demuestran que tienden a caer.

En la medición de los anticuerpos pasivos para el subtipo H1N1 el título mas alto lo obtuvieron las crías procedentes de hembras que tenían un mes de haber recibido la segunda vacunación, esto les permite disminuir la incidencia y la severidad de la enfermedad clínica, pero no proporcionan la protección completa contra la infección del virus.^{42, 43}

Para el subtipo H3N2 los títulos de anticuerpos promedio mas altos se obtuvieron con la vacuna uno al inmunizar a las cerdas un mes antes de la fecha probable de parto.

Los títulos de anticuerpos pasivos más altos se dieron de las crías de las hembras con un mes de haber recibido la segunda vacuna.

Los animales que recibieron dos vacunaciones mostraron un elevado título de anticuerpos debido a que al recibir la primera vacunación generaron anticuerpos y linfocitos T sensibilizados generándose, por lo tanto, memoria inmunológica que al entrar en contacto por segunda vez con el inmunógeno la respuesta fue mejor.⁴⁴

Actualmente los cerdos son afectados por los subtipos H1N1, H3N2 y recientemente el H1N2 y se ha demostrado que en la Hemaglutinina 1 del subtipo H1N1 y H1N2 posee un 70 % de aminoácidos homólogos por lo que al vacunar a los cerdos con los subtipos H1N1 y H3N2 y desafiarlos con un virus H1N2 se ha recuperado una menor cantidad de virus de sus pulmones y se han reducido los signos o no se han observado, comparados con los del grupo control en donde se presento disnea, fiebre, anorexia, depresión y respiración abdominal.⁴⁵

En Europa, experimentalmente se creó una vacuna trivalente con los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2, que al ser aplicada a cerdos serológicamente negativos se observó que para el subtipo H1N2 los títulos de anticuerpos eran altos, pero para los subtipos H1N1 y H3N2 eran bajos o nulo, por lo que se consideró que podría deberse a una competencia antigénica entre los componentes de la vacuna y por ello se requería tener una óptima formulación de los mismos.⁴⁵

La competencia antigénica se presenta cuando la presencia de un antígeno determinado en una mezcla de antígenos puede provocar una disminución de la respuesta inmune a los otros antígenos, esto puede ocurrir incluso entre epítomos de una misma molécula antigénica. La posible explicación estriba en la competencia entre distintos péptidos procesados (de distintas moléculas o de la misma) por unirse al surco de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, de modo que el péptido más inmunodominante se une a casi todas las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad disponibles, evitando la unión de otros péptidos; ello evita la activación de células T que reconocen esos otros péptidos.⁴⁵ La competencia antigénica podría ser una causa por la cual el título de anticuerpos para el subtipo H1N1 de la vacuna Flusure de laboratorios Pfizer es más bajo comparado con la vacuna Maxivac Excell 3 Shering Plough. Jackson *et al.* Experimento con un esquema de vacunación que consistía en la aplicación de dos dosis con un intervalo de 21 días, haciendo nueve muestreos serológicos con la utilización de tres grupos de 10 animales de la cuarentena provenientes de hembras serológicamente negativas utilizando un tipo de biológico para cada grupo los resultados mostraron que de los días 0 a 21 la respuesta de títulos de anticuerpos era lenta y a partir del día 21 que se aplicó la segunda vacuna los títulos de anticuerpos aumentaban rápidamente alcanzando su título más alto entre los días 25 a 31 después disminuían los mismos.⁴⁶

8.0 Conclusión.

El mejor momento para vacunar a las cerdas gestantes es un mes antes del parto con lo que se transfiere mayor inmunidad pasiva a sus lechones.

Se obtienen mejores resultados con la utilización de dos vacunaciones contra Influenza Porcina subtipos H1N1 y H3N2 en hembras de pie de cría, de esta forma se induce la producción de anticuerpos tanto sistémicos como locales así como la protección a sus crías al conferirles niveles más altos de anticuerpos pasivos.

Si un animal entra en contacto con un virus heterólogo del que se encuentra en la vacuna se ofrece poca o nula inmunidad cruzada, pero se disminuye la cantidad de virus presente en el cerdo y por lo tanto la cantidad de virus que se excreta dentro de la población.

Los cambios antigénicos de los virus circulantes, en comparación con la de los virus vacunales, pueden hacer a las vacunas menos eficaces al existir diferencia entre estos; por ello es importante se estandaricen las vacunas y se actualicen constantemente con los subtipos presentes en cada época.

El esquema presentado en el trabajo de hato completo (sabana) con un intervalo de 4 meses entre aplicaciones muestra ser una buena opción para reforzar los anticuerpos contra la enfermedad de influenza porcina, aunque esto sería el complemento de lo que se hiciera en las cuarentenas antes de ingresar a los animales a la granja a los cuales deberían aplicar dos dosis en un espacio de tiempo reducido, con el fin de que al ser introducido se apliquen los refuerzos con el esquema de hato completo.

9.0 REFERENCIAS

1. Álvarez FM, Rodríguez BJ, Ciprián CA, Rodríguez GL, Ayora TG, Segura, J. Perfil serológico del virus de la influenza porcina, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuroneumoniae*, en granjas de Yucatán México. *Veterinaria México* 2004; 35(4): 295-305.
2. Yoon JK, Janke BH. Influenza Porcina: Etiología, Epidemiología y Diagnóstico. In: González AM, Yoon JK, Zimmerman JJ, Editors. *Enfermedades víricas emergentes del cerdo*. Multimédica Ediciones Veterinarias 2004: 29-54.
3. Gramer MR. Defining swine influenza virus. *Journal of Swine Health and Production* 2005; 13(3):157-160.
4. García JG, Ramos C. La influenza, un problema vigente de salud pública. *Salud pública de México* 2006; 48(3): 244-267.
5. Van Reeth K, De Vleeschauwer A, Kyriakis C, Pensaert M. Influenza in birds, pigs and humans: old theories versus current viewpoints. *Memorias de 19th IPVS congress 2006*, 1 Copenhagen, Denmark.
6. Easterday B and Van K. Swine Influenza. In: Straw B, Mengeling W, D'Allaire S, Taylor DJ, Editors. *Diseases of swine 8th ed*. Iowa State University USA. 1999: 161-171.
7. Gaydos JC, Top FH, Hodder RA, Russell Swine Influenza A Outbreak, Fort Dix, New Jersey, 1976. *Emerging infectious Disease* 2006,12(1): 23-28
8. Makarova NV, Ozaki H, Kida H, Webster RG, Perez DR. Replication and transmission of influenza viruses in Japanese quail. *Virology* 2003; 310:8-15.

9. Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary Microbiology* 2000; 74: 29-46
10. Cox NJ, Subbarao K, Global epidemiology of influenza: Past and Present. *Annu. Rev. Med.* 2000; 51: 407-421
11. Suarez DL, Evolution of avian influenza viruses. *Veterinary Microbiology* 2000; 74: 15-27.
12. Webster RG, Peiris M, Chen H, Guan Y. H5N1 Outbreaks and Enzootic Influenza. *Emerging Infectious Diseases* 2006;12(1):3-8
13. Castrucci MR, Donatelli I, Sidoli L, Barigazzi G, Kawaoka Y, Webster RG. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology* 1993; 193: 503-506.
14. Capitelli L, Donatelli I, Foni E, Castrucci MR, Fabián C, Kawaoka Y, *et al.* Continued Evolution of H1N1 and H3N2 Influenza Viruses in Pigs in Italy. *Virology* 1997; 232: 310-318.
15. Brown IH, Alexander DJ, Chakraverty P, Harris PA, Manvell RJ. Isolation of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7) from pigs in England, and the subsequent experimental transmission from pig to pig. *Veterinary Microbiology* 1994; 39: 125-134.
16. Bachmann PA. Swine influenza virus In: Pensaert MB, editor. *Virus infections of porcines* 1989: 193-207.
17. Zimmerman W, Plonait H. Enfermedades del aparato respiratorio. In Plonait, H, Bickhardt, K editors. *Lehrbuch der Schweinekrankheiten* 2a ed Berlin. 2001:128-129.

18. Castillo MT. Hallazgos patológicos en asociaciones PRRS, Circovirus e Influenza. Memorias del IV Ciclo de conferencias AMVEC 2005 La Piedad Michoacán.
19. Thacker EL. Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* 2001; 17 (3): 551-565
20. Van Reeth K. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Veterinary Microbiology*.2000; 74: 109-116.
21. Ellis JS, Zambon MC. Combined PCR heteroduplex Mobility Assay for detection and differentiation of Influenza A viruses from different animal species. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39 (11): 4097-2001.
22. González AM, González D. Los perfiles serológicos y microbiológicos para evaluar el estado sanitario de las granjas porcinas. *Ciencia Veterinaria* 1996; 7: 273-313.
23. Saito R, Sakai T, Sato I, Sano Y, Oshitani H, Sato M, *et al.* Frequency of Amantadine Resistant Influenza A viruses during two seasons featuring cocirculation of H1N1 and H3N2. *American Society for Microbiology* 2003; 45 (3): 2164-2165.
24. Martínez R, Amín N, Aguilar A, Camacho F, Pérez EM. Influenza Vacunas clásicas y novedosas a las puertas de otra pandemia. *VacciMonitor* 2006; 15 (2): 22-29.
25. Lejarazu RO, Eiros JM, Villanueva MA, Delgado A, Castrodeza J, Investigación en nuevas vacunas antigripales, nuevas vías de administración y nuevas indicaciones. *Vacunas* 2002; 3 (1): 64-72.

26. Thacker EL. Inmunología vacunal, ¿Qué necesitamos? ¿Qué tenemos? .Los Porcicultores y su entorno 2003; 5 (35): 20-23.
27. Carrat F, Flahault A. Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. Vaccine 2007; 25: 6852-6862.
28. Organizacion Mundial de la salud. Boletín Epidemiológico semanal. Vacunas contra la influenza. Organizacion Mundial de la salud 2005; 80: 279-287.
29. Capua I, Marangon S. Control and prevention of avian influenza in an evolving scenario. Vaccine 2007; 25: 5645-5652.
30. Rodriguez AA, Izquierdo PM, Moros SJ, Heras AC. Medidas de vigilancia y contención de la influenza aviar en aves. Implicaciones para la salud pública. Rev. Esp. Salud Publica 2006; 80: 621-630.
31. Maas A, Meens J, Baltes N, Henning PI, Gerlach FG. Development of a DIVA subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. Vaccine 2006; 24: 7226-7237.
32. Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar .14 de agosto 1996.
33. Aguilar RV. Pandemia de gripe en Sinaloa, 1918-1919. Elementos: Ciencia y cultura 2002; 9: 37-43.
34. Claas EJ, Kawaoka Y, Jong JC, Masurel N, Webster RG. Infection of children with Avian-Human reassortant influenza virus from pigs in Europe. Virology 1994; 204: 453-457.
35. Diosdado VF, González VD, Moles CL, Morilla GA. Asociación entre anticuerpos contra el virus del síndrome disgenésico y respiratorio porcino y anticuerpos contra otros patógenos. Veterinaria México 2004,35(2):147-152.

36. Chávez SR. Determinación de anticuerpos contra el virus de influenza porcina subtipo H3N2 en diferentes estados de la República Mexicana (tesis de licenciatura). Coyoacán (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.
37. Jiménez NJ. Determinación de anticuerpos contra el virus de Influenza Porcina serotipo H3N2 en cerdos de diferentes sistemas de producción en México (tesis de licenciatura). Coyoacán (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
38. Talavera GA, Burgos JC, Armas AC. Serologic evidence of human and swine influenza in Mayan Persons Emerging infectious Disease 2005; 11(5): 158-160.
39. JMP. SAS/STAT User Guide 4th ed. SAS Inst.Inc. Cary NC.2000.
40. Jong JC, Nieuwstadt AP, Kimman TG, Loeffen WL, *et al.* Antigenic drift in swine influenza H3 haemagglutinins with implications for vaccination policy. Vaccine 1999, 17: 1321-1328
41. Palacios JM, Carreón NR, Chapa BJ, Pacheco R. Análisis comparativo del diagnóstico serológico de influenza porcina en México utilizando 3 antígenos diferentes de los serotipos H1N1 Y H3N2 en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación contra la prueba de ELISA. Memorias del XLI Congreso Nacional de AMVEC; 2006 Julio 16-19 Ixtapa (Guerrero), México Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C 2006: 87-88
42. Kristien VR, Geoffrey L, Sophie C, Maurice P. Efficacy of vaccination of pigs with different H1N1 swine influenza viruses using a recent challenge strain and different parameters of protection. Vaccine 2001, 19: 4479–4486.

43. Christopher WO. DNA vaccination against influenza viruses: a review with emphasis on equine and swine influenza. *Veterinary Microbiology* 2000, 74:149-164.
44. Tizar RI, et al. *Inmunología Veterinaria. Vacunas y vacunación sexta Ed.* México McGraw-Hill Interamericana 1998.254-273.
45. Van Reeth K, Labarque G, Pensaert M. The establishment of an H1N2 influenza virus in the European swine population and its impact on prevention and control. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases 2003, 250-253.
46. Jackson TA, Chandler-Conrey N, Prouty K, Theis D, Theis K, Ducommun A, *et. al.* Serologic responses to three commercial bivalent swine influenza virus vaccines in juvenile pigs. *American Association Of Swine Veterinarians* 2004, 235-240.