



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN.

**CORRELACIÓN ENTRE LA INMUNOGENICIDAD Y LA PROTECCIÓN
DE VACUNAS COMERCIALES INACTIVADAS CONTRA
EL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

PATRICIA CASTRO MORALES.

ASESOR: M.V.Z. FERNANDO DIOSDADO VARGAS.

COASESOR: DR. JUAN CARLOS DEL RIO GARCÍA.

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Correlación entre la inmunogenicidad y la protección de vacunas comerciales inactivadas contra el virus de Influenza Aviar en México.

que presenta la pasante: Patricia Castro Morales
con número de cuenta: 09808726-8 para obtener el título de :
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Agosto de 2010

PRESIDENTE Dr. Ariel Ortíz Muñiz

VOCAL MVZ. Fernando Diosdado Vargas

SECRETARIO MVZ. Juan Arturo Olivares Díaz

PRIMER SUPLENTE MVZ. María de Lourdes Jara Ramírez

SEGUNDO SUPLENTE MC. Celso López López

DEDICATORIA

A Dios:

Porque gracias a él he podido realizar todo en la vida y él me ha dado todo lo que necesito. Gracias.

A mi hijo:

Gracias por existir, ser la luz de mi vida, y que gracias a tu amor eres la guía de mis actos, mi motor, mi razón, mi aliento y alimento para seguir adelante. Te amo

A mi madre:

Eres el mejor consejo que siempre necesito y que en las buenas y en la malas siempre estás conmigo. Te amo mami.

A mi padre:

Gracias papá que me has enseñado a ser perseverante y no rendirme además de siempre buscar la solución a todo lo que se me presenta en el camino. Te amo papá.

A mi hermana Dianita:

Hermanita, gracias por tu apoyo, por ser mi confianza y mi ángel que siempre me cuida, sabes que he llegado hasta aquí por ustedes. Te amo hermanita.

A mi cuñado Gabriel:

Sabes que es como si fueras de mi familia y que te quiero tanto como si fueras mi hermano, gracias por ser un buen consejero y por escucharme. Te quiero.

A mi familia:

A todas mis tías, tíos, primas y primos por su reconocimiento, especialmente a mi Tía Evelia por cariño y apoyo, a mi Tío Martín por su muestra de respeto y a mis primos Martín, Gabriel y Polo que son un gran ejemplo a seguir y por forzarme a ser mejor cada día, a las primas Tania y mi Odetilla que sabes que te quiero mucho. Los quiero mucho Familia Castro y Familia Morales.

A mis amigos:

Arge, Paty, Luis, Carlos, Robert, Amiguita Claudia, Amiguita Lilis, que estuvieron siempre ayudándome, apoyándome, escuchándome durante toda la carrera, saben que son mis hermanos y que los quiero mucho y a todos los que me falta por mencionar y que saben que no acabaría nunca por de mencionarlos, los quiero mucho.

A todos lo que compartieron conmigo muchas experiencias y de ellas aprendí, a todos mis compañeros que a lo largo de toda la carrera tuve.

AGRADE CIMIENTO

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser siempre una fuente de orgullo para mí.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por acogerme en tus instalaciones y poder decir que aquí estudié Medicina Veterinaria Zootecnista

A mi asesor M.V.Z. Fernando Diosdado que le agradezco infinitamente su paciencia, y que gracias a él este trabajo se realizó. Muchas gracias.

A mi coasesor el Dr. Juan Carlos Del Río por su apoyo y aliento. Gracias por ser mi profesor.

A todos los profesores de esta facultad quienes han colaborado directa e indirectamente en mi formación profesional. Gracias.

INDICE.

RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
Antecedentes.....	7
Etiología y estructura viral.....	8
Características del virus.....	9
Patogenicidad.....	9
Replicación del virus.....	10
Epidemiología.....	11
Estrategias para el control y erradicación de la IA.....	11
Prevención.....	12
Vacunas.....	12
Vacunas vivas.....	12
Vacunas muertas o inactivas.....	12
Vacunas subunitarias.....	13
Vacunas de influenza termosensibles.....	13
Vacunas de influenza vivas modificadas genéticamente.....	13
Vacunas de influenza deficientes en replicación.....	14
Diagnóstico serológico.....	14
Inhibición de la hemaglutinación.....	14
Inmunodifusión en agar.....	14
Pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos.....	15
Diagnóstico para la detección de antígenos.....	15
Aislamiento viral.....	15
Pruebas de ELISA para la detección de antígenos.....	15
Técnicas de biología molecular.....	16
Nuevas alternativas de diagnóstico.....	16
Situación en México.....	17
JUSTIFICACIÓN.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS PARTICULARES.....	19

HIPÓTESIS.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
Localización.....	21
Aves.....	21
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	21
Vacunación.....	22
Serología.....	22
Titulación viral.....	22
Metodología para realizar la inhibición de la hemoaglutinación.....	22
Desafío.....	24
Evaluación de Signos Clínicos.....	24
Análisis Estadístico.....	24
RESULTADOS.....	24
Signos Clínicos.....	24
Cuadro 1.....	25
Cuadro 2.....	26
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIONES.....	29
ANEXO.....	30
PBS.....	30
SOLUCIÓN ALSEVER´S.....	30
GLOBULOS ROJOS AL 1%.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31

RESUMEN.

El objetivo de este trabajo, fue evaluar la inmunogenicidad y la protección conferida que inducen cuatro vacunas elaboradas por diferentes laboratorios comerciales. Para lo cual, se formaron 6 grupos de 8 aves SPF cada uno: Grupo I.- Aves inmunizadas con vacuna comercial A y desafiadas; Grupo II.- Aves inmunizadas con vacuna B y desafiadas; Grupo III.- Aves inmunizadas con vacuna C y desafiadas; Grupo IV.- Aves inmunizadas con vacuna D y desafiadas; Grupo V.- Aves sin inmunizar y desafiadas y Grupo VI.- Aves sin inmunizar ni desafiadas. Las aves se vacunaron a las 4 semanas de edad y se revacunaron a las 8 semanas de edad. A las 12 semanas de edad se desafiaron con una cepa de influenza aviar de baja patogenicidad vía intranasal con un título de 10^6 DIEP₅₀/0.2ml. Las aves de los grupos I, II, III y IV fueron inmunizadas siguiendo las indicaciones de cada laboratorio productor. Se obtuvieron sueros a las 0, 4 y 8 semanas post-vacunación (SPV). La detección de anticuerpos se realizó por la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IH). Los títulos de anticuerpos se expresaron en medias geométricas (MG), utilizando la prueba de Kruskal-Wallis para su análisis estadístico con una significancia de ($p < 0.05$). Los resultados mostraron que a las 4 SPV se detectaron anticuerpos en el 100% de las aves inmunizadas con las diferentes vacunas, incrementándose los títulos de anticuerpos a los 8 SPV ($p < 0.05$), con excepción de las aves inmunizadas del Grupo II. A los 4 y 8 SPV, se encontró que las aves vacunadas del Grupo I produjeron niveles significativamente más altos de anticuerpos en comparación con los grupos II, III y IV ($p < 0.05$), sin embargo los grupos II, III y IV no mostraron diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$), a pesar de que las aves del grupo II fueron las que desarrollaron una menor respuesta inmune. Con relación al desafío, se encontró que el 100% de las aves en las que se llevo a cabo el trabajo, presentaron signos clínicos característicos de la enfermedad pero no hubo mortalidad en ninguno de los grupos. Estos resultados mostraron que todas las aves inmunizadas con las diferentes vacunas comerciales fueron capaces de inducir anticuerpos, pero no la presentación de signos clínicos. Con este estudio se puede concluir que las vacunas comerciales que se utilizaron para el control de IA pudieran estar utilizando diferentes adyuvantes y/o que la masa antigénica utilizada en su preparación es diferente, no ajustándose a los lineamientos que marca la norma de requisitos mínimos para la elaboración de vacunas (NOM-055-ZOO-1995).

INTRODUCCIÓN.

ANTECEDENTES.

La influenza aviar (IA) esta clasificada dentro de la lista A de la OIE (Oficina Internacional de Epizootias) que incluye a las enfermedades transmisibles con gran poder de difusión y especial gravedad. A nivel mundial los brotes ocasionados por el virus de la IA han producido grandes pérdidas económicas, debido principalmente a una baja en los parámetros de producción, aunado a esto, se restringe la comercialización de las aves y sus productos, dentro y fuera de los países afectados por lo tanto, es una de las enfermedades más importantes a nivel mundial que impacta en el comercio internacional de aves y sus productos⁽¹⁾.

A nivel mundial, entre los años 2002 y 2005 en el continente americano, han ocurrido tres brotes de virus de alta patogenicidad (AP) de IA: Un brote en Chile (H7N3) en el año 2002, uno en Estados Unidos (H5N2) en el 2004 y uno en Canadá (H7N3) en este mismo año. El brote de IA de AP en Estados Unidos ocurrió en Texas. El brote en Canadá fue el mayor de los tres, involucrando 42 explotaciones y aproximadamente 17 millones de aves. Los funcionarios de Sanidad Animal en Canadá reportaron la presencia de los subtipos H3, H5 y H6 en aves domésticas, y los subtipos H3, H5, H11 y H13 de aves importadas y en especies silvestres. En los últimos años, se ha reportado que el virus de baja patogenicidad (BP) H5N2 continúa circulando en México y en los países centroamericanos de Guatemala y El Salvador. Cada país reportó el aislamiento de virus H5N2 de aves domésticas y el uso a gran escala de vacunas H5 inactivadas y recombinantes en sus programas de control de la IA. En Estados Unidos las intensas actividades de vigilancia detectaron el virus de IA o anticuerpos específicos para 13 de 16 hemoaglutininas (H) (H1–H13) y en los nueve subtipos de neuraminidasa (N) en granjas pequeñas y en aves comerciales de 29 estados. El mayor brote de IA de BP en los Estados Unidos ocurrió en el año 2002, cuando 197 granjas fueron despobladas (4.7 millones de aves) para controlar el brote en el Estado de Virginia y los estados adyacentes. El brote fue causado por un virus de BP H7N2 que estaba relacionado estrechamente con un virus H7N2 que ha circulado en el Noroeste de los Estados Unidos desde el año 1994⁽²⁾

La actividad de la IA actualmente en Europa, Asia y África durante el período comprendido entre el año 2006 hasta el 2009 ha sido sobrepasado por la pandemia en curso del virus H5N1 (IA de AP de declaración obligatoria), que ha afectado a 63 países en tres continentes (África, Asia y Europa) durante este periodo. Dos países, Indonesia y Egipto, han declarado oficialmente la IA como

enfermedad endémica ante la OIE, mientras que otros han utilizado una variedad de enfoques encaminados a la contención, control y erradicación. Otros brotes en la avicultura con el virus de la IA de AP se han reportado en Sudáfrica y en el Reino Unido (en aves con H7N7 en el año 2008). También se informó de un brote de IA de AP H5N2 en las poblaciones de aves silvestres en el norte de África en el 2007. Virus de la IA de BP de declaración obligatoria H5 o H7 fueron aislados y detectados en la avicultura de Bélgica (H5N2, 2008); así como en Taipei, China (H5N2, 2008); en Dinamarca (H5N2, 2006; H7N1, 2008); en Francia (H5N2, 2007); en Alemania (H7N3, 2008); en Italia (H7N7, 2006; H7N3, 2007–08); en Holanda (H7N7, 2006); Portugal (H5N2, 2007; H5N3, 2007); en la República de Corea (H7N8, 2007; H5N2, 2008); y en el Reino Unido (H7N3, 2006; H7N2, 2007). Además, también ha habido una importante actividad con virus H6 y H9 en las poblaciones avícolas, especialmente en Asia. ⁽³⁾

ETIOLOGÍA Y ESTRUCTURA VIRAL.

Esta enfermedad es causada por un virus del tipo A, perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae* ⁽⁴⁾. La estructura del virus de influenza la conforman 8 segmentos que codifican las siguientes proteínas conocidas como polimerasas PB1, PB2 y PA que forman un complejo polimerasa para la transcripción y replicación, así como las proteínas HA, NP, NA, M1, M2, NS1, NS2 ^(5,6,7). El virus cuenta con dos glicoproteínas de superficie (antes mencionadas), denominadas hemoaglutinina (H) y neuraminidasa (N), que son codificadas en el segmento 4 y 6 respectivamente. Hasta la fecha, se han determinado 16 diferentes subtipos basados en sus hemoaglutininas “H” (H1 a H16), y 9 neuraminidasas “N” (N1 a N9) que pueden combinarse indistintamente entre los subtipos ⁽⁸⁾. La función de la H es la fijación y unión del virus al receptor de la célula huésped, así como, la penetración de las partículas virales a través de la membrana celular. La N tiene como función principal el de eliminar los residuos de ácido siálico de la H, favoreciendo la liberación de las partículas virales y diseminación a otras células. En cuanto a la proteína M2, que se codifica en el segmento 7 y se localiza en la envoltura viral, se encarga de controlar el pH intracelular durante la fase de desnudamiento en el ciclo de replicación. Además, juega un papel importante, ya que mutaciones ocurridas en el gen que codifica para esta proteína, dan como resultado resistencia a fármacos antivirales. La proteína M1, que de igual forma se codifica en el segmento 7 interactúa con el genoma y participa en el ensamble viral. Por otro lado, la NP que se codifica en el segmento 5 participa en la replicación viral siendo transportada al núcleo de las células infectadas para proteger al RNA viral ^(6,7,9,10). La proteína NS1 es codificada en el octavo segmento, es sintetizada

tempranamente en grandes cantidades en una infección y se ha determinado que participa en la inhibición del interferón alfa y beta ⁽¹¹⁾. Cepas virales deficientes o con mutaciones parciales en el gen NS1, presentan una atenuación notable en su virulencia ⁽¹²⁾ y la proteína NS2 que también es codificada en el segmento ocho del virus, se ha descrito recientemente que es componente menor del virión ^(13,14,15).

CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS.

El virus de IA tiene la capacidad de mutar y de originar nuevas variantes antigénicas, debido a estos constantes cambios en el virus. Todos los virus de influenza tipo A, son genéticamente lábiles y bien adaptados para eludir defensas del hospedero. Los virus de la influenza carecen de mecanismos para leer, marcar y reparar los errores que ocurren durante su réplica como lo hacen otro tipo de virus. Como resultado de estos errores sin corregir, la composición genética de los virus cambia mientras se replican en seres humanos y animales y la cepa existente se reemplaza por una nueva variante antigénica. Estos pequeños cambios pero constantes y permanentes en la composición antigénica de los virus tipo A de influenza se conocen como pequeños cambios “drift” o “derivación antigénica” ⁽¹⁶⁾. Por otro lado, los virus de influenza tienen una segunda característica de gran preocupación para la salud pública: los virus tipo A de influenza, incluyendo subtipos de diversas especies, pueden intercambiar material genético por recombinación. Este proceso de intercambio, conocido como “cambios antigénicos” o cambios “shift”, tiene como resultado un nuevo subtipo diferente al de ambos “virus padres”. Debido a esta situación, las aves no tienen ninguna inmunidad hacia el nuevo subtipo y tampoco existe vacuna alguna que pueda conferir protección, por lo que el cambio antigénico ha dado como resultado pandemias altamente mortales. Para que esto suceda, el nuevo subtipo necesita tener genes de los virus de influenza humanos que hicieran fácilmente transmisible la infección de persona a persona por un período sostenible ⁽¹⁷⁾.

PATOGENICIDAD.

De acuerdo a la severidad en la presentación clínica, el virus se ha dividido en cepas de AP y BP ⁽¹⁸⁾. Las cepas virales de IA que comúnmente afectan a las aves son de BP y se asocian a enfermedades respiratorias, reduciendo los parámetros de producción ⁽¹⁹⁾. Los virus de BP pueden

mutar a virus de AP después de haber circulado por períodos (a veces cortos) en una población de aves de corral ⁽¹⁸⁾.

En México, la enfermedad se encuentra regulada por la Campaña Nacional contra la Influenza Aviar (NOM-044-ZOO-1995), que se encarga de controlar por medio de la vacunación al virus de BP ^(20,21).

La cepa de IA de AP tiene mayor repercusión económica, ya que es la que ocasiona una mayor mortalidad en el campo. La IA de BP puede variar desde una infección asintomática hasta una enfermedad respiratoria con pérdidas en la producción; en algunas ocasiones la IA de BP en el campo se asocia a patógenos secundarios ⁽²²⁾.

La diferencia entre IA de AP y IA de BP es que la primera tiene una replicación sistémica mientras que la IA de BP se replica localmente en mucosas. Esto es debido a las diferencias en el sitio de corte en la proteína H en los subtipos H1 y H2, que son necesarios para que el virus infecte a la célula. La proteína H del virus de IA de AP se puede unir mediante proteasas endógenas que se encuentran en la mayoría de las células del cuerpo, mientras que la proteína H de IA de BP sólo se puede unir a proteasas de tripsina que se encuentran principalmente en el tracto respiratorio y digestivo ⁽²³⁾.

Para determinar el grado de patogenicidad de un virus de IA se emplean los criterios establecidos por la OIE. En dichos lineamientos, se señala que para declarar un virus altamente patógeno, éste debe ser letal para un mínimo del 75% de pollos susceptibles de cuatro a ocho semanas de edad en el plazo de diez días tras la inoculación intravenosa ^(24,25). Por otro lado, también se puede determinar el grado de patogenicidad conociendo la secuencia del péptido de conexión de la hemaglutinina. Sí la secuencia es similar a la observada en los altamente patógenos, el virus en cuestión, debe ser considerado de igual manera ⁽²⁶⁾.

REPLICACIÓN DEL VIRUS.

Los virus de influenza se adhieren a los residuos de ácido siálico en la superficie de la célula. Una vez adheridos, ingresan mediante endocitosis mediada por receptores y se forma un endosoma donde el pH ácido favorece el denudamiento de los genes virales. A continuación la envoltura viral se fusiona con la membrana del endosoma mediada por la proteína H del virus; ello permite la salida al citosol de los segmentos genómicos que transitan hasta llegar al núcleo, en donde se lleva a cabo la transcripción que genera tanto RNA mensajeros (RNAm) como la replicación de los RNA virales (RNAv). Los RNAm se transportan al citoplasma para unirse a los ribosomas e iniciar la síntesis de

las proteínas virales necesarias para la transcripción y producción de las proteínas integrales de membrana, las cuales se procesan en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi para que finalmente se expresen en la membrana celular. Los segmentos del genoma viral se ubican en la membrana celular y se inicia el proceso de gemación, tras el cual los viriones se liberan de la célula infectada ^(27,28,29,30).

EPIDEMIOLOGÍA.

Dentro de un país, la enfermedad se difunde fácilmente de granja a granja. Grandes cantidades de virus pueden dispersarse por medio de deyecciones provenientes de aves, contaminando el polvo y el suelo. El equipo, vehículos, alimento, jaulas, ropa y zapatos contaminados, pueden llevar el virus de granja a granja ⁽³¹⁾. Durante los brotes ocurridos en Holanda y Canadá, se sugirió la posibilidad de que el virus sea transportado por el aire, difundiendo la enfermedad de ave a ave, causando la infección cuando se inhala el virus ⁽³²⁾. Las deyecciones de las aves silvestres infectadas pueden introducir el virus en parvadas comerciales y de traspatio. El riesgo de que la infección sea transmitida de aves silvestres a las aves domésticas es más grande cuando las aves domésticas se encuentran en libertad, donde comparten agua y alimento con las aves silvestres o utilizan un abastecimiento de agua que pudo haberse contaminado por secreciones y excreciones de aves silvestres portadoras de virus de influenza. En mercados donde las aves vivas se venden bajo condiciones de alta densidad de población y a veces antihigiénicas, son otra fuente de propagación de la enfermedad ⁽³³⁾.

ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA IA.

Los brotes de IA, especialmente los de alta patogenicidad, pueden ser devastadores para la industria de las aves de corral y sus productos. Las consecuencias económicas pueden ser especialmente terribles para los países en vías de desarrollo, donde la producción de aves de corral es una fuente importante de ganancia. Cuando los brotes llegan a ser extensos dentro de un país, el control puede ser extremadamente difícil. Por estas razones las autoridades gubernamentales emprenden generalmente medidas de control de emergencia tan pronto como se detecta un brote ⁽³⁴⁾.

Es difícil establecer reglas fijas para controlar las diferentes enfermedades, en el caso de la IA una de las estrategias para su erradicación es el sacrificio para lo cual debe tomarse en cuenta, tanto

la patogenicidad, como la transmisibilidad del virus, la densidad de las granjas, el valor de las aves afectadas y los costos de sacrificio, entre otros. Cuando un brote de IA ocurre en un área con una alta densidad poblacional en la que la aplicación de rigurosas medidas de bioseguridad pueden llegar a ser propiamente imposibles, la vacunación debería considerarse como la principal opción para controlar la diseminación del virus. De esta manera se reduce la susceptibilidad a la infección, ya que se requeriría de una dosis más alta de virus para establecer una infección productiva y se reduce la cantidad de virus diseminado al medio ambiente ⁽³⁵⁾.

PREVENCIÓN.

Para la prevención de la enfermedad se utilizan vacunas que administradas a un individuo inducen inmunidad contra un agente infeccioso. Actualmente estamos presenciando una revolución en biotecnología basada principalmente en técnicas ADN recombinantes, gracias a los conocimientos crecientes en inmunología y biología molecular de los patógenos. Estos recursos se están empleando en desarrollar nuevos y poderosos sistemas de vacunación ⁽³⁶⁾.

VACUNAS.

Vacunas vivas.

Este tipo de vacunas se pueden replicar en el huésped pero su patogenicidad es atenuada para evitar la enfermedad. Estas vacunas desencadenan generalmente inmunidad celular y humoral, comúnmente se requiere solo una, dos o hasta tres dosis para obtener protección prolongada. Una desventaja es el riesgo de que el virus revierta a una forma patógena, también que el virus pase de individuos vacunados a no vacunados. Estas vacunas no son utilizadas para el control de la IA. ⁽³⁶⁾.

Vacunas muertas o inactivas.

Estas vacunas no se multiplican en el huésped y no hay el riesgo de que reviertan a patogenicidad o que se transmita a otros individuos. La inmunogenicidad usualmente debe ser estimulada con adyuvantes como emulsiones oleosas. Se ha demostrado que la inmunogenicidad de estas vacunas se puede mejorar empleando preparaciones de liposomas con colesterol conteniendo

partículas víricas (ISCOMS: immune-stimulating-complex). Estas preparaciones son muy efectivas en la administración intranasal o subcutánea ⁽³⁷⁾.

Otro adyuvante que ha mostrado efectividad es la toxina lábil de *E. coli*, acoplada a vesículas de lecitina. Esta preparación puede ser administrada intranasal provocando respuestas inmunes protectoras ⁽³⁸⁾. La respuesta inmunológica es mayoritariamente una respuesta humoral. La producción de estas vacunas requiere de un cultivo a gran escala del microorganismo ^(39, 40).

Vacunas subunitarias.

Las vacunas subunitarias consisten en preparaciones del antígeno protector, el cual puede ser purificado directamente a partir del patógeno, producido como proteína recombinante ú obtenidos como péptidos sintéticos. Las vacunas recombinantes generalmente se le llama a los vectores que expresan el antígeno protector al ingresar al huésped y por lo general se emplean como vectores de inmunización: virus (adenovirus, poxvirus, baculovirus, etc.), pero también pueden emplearse bacterias. Dentro de estos se encuentran las vacunas de virus de ADN, los cuales son simples plásmidos con el gen del antígeno clonado ⁽⁴⁰⁾.

Vacunas de influenza termosensibles.

El virus de influenza puede cultivarse repetidamente en células renales de pollo o en huevos embrionados a 25°C ⁽⁴¹⁾. Las cepas virales resultantes son termo-sensibles y apropiadas para usarse como vacunas vivas, ya que su patogenicidad esta fuertemente atenuada y son utilizadas tanto en animales como humanos. Estas vacunas vivas pueden ser administradas convenientemente por vía intranasal mediante aerosoles. Se ha visto que estas vacunas generan inmunidad neutralizante local y una respuesta inmune mediada por células, la cual puede estar asociada a una inmunidad cruzada y más prolongada que la obtenida con preparaciones virales inactivadas químicamente. Estas cepas termo-sensibles pueden recombinarse *in vitro* para incorporarles nuevos determinantes antigénicos conservando los genes que codifican para los antígenos de superficie (H y N) de las cepas emergentes y el resto de los genes que provienen de las cepas termo-sensibles. Aunque se ha visto que estas vacunas no revierten a cepas patógenas, se requiere de una vigilancia constante para remediar inesperadas complicaciones que pudieran resultar del uso de estas vacunas ⁽⁴²⁾.

Vacunas de influenza vivas modificadas genéticamente.

El desarrollo de técnicas para introducir cambios en sitios específicos en el genoma viral de RNA de cadena negativa, ha hecho posible contemplar nuevos tipos de vacunas ⁽¹¹⁾. Una técnica novedosa de manipulación genética del virus de la influenza consiste en rescatar variantes virales a partir de células transfectadas con plásmidos, ésta tecnología permite obtener modificaciones genómicas específicas en el virus de IA ⁽⁴³⁾.

La sustitución del promotor del gen N del virus de la influenza de tipo A por la del virus de tipo B lleva a la atenuación ⁽⁴⁴⁾. Estos virus modificados genéticamente inducen una potente respuesta inmune protectora con inóculos hasta 100 veces menores en comparación a vacunas inactivadas ⁽⁴⁵⁾.

Vacunas de influenza deficientes en replicación.

Un enfoque promisorio es el desarrollo de vacunas vivas de IA que no puedan replicarse en células hospedadoras. Esto da la ventaja de que el virus infecta inoculando sus antígenos por vías naturales de inmunización generando respuestas protectoras efectivas y prolongadas. La infección de células con partículas víricas que carecen del gen que codifica la proteína NS2, expresan proteínas virales, pero no resultara en la producción de partículas infecciosas ⁽⁴⁶⁾. La eliminación del gen M2 lleva también a deficiencia en la replicación viral ⁽⁴⁷⁾.

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO.

Inhibición de la hemaglutinación (IH)

La IH es la prueba más utilizada en los países en donde la enfermedad es endémica, ya que reconoce la H que es específica para cada subtipo y no presenta reacciones cruzadas ⁽⁴⁸⁾. En esta prueba, los componentes son el antígeno H, las diluciones del suero problema y los glóbulos rojos. El suero con los anticuerpos, inhibe la hemaglutinación de los glóbulos rojos sensibilizados con el virus. Los resultados se expresan como la dilución más alta de suero que inhibe la aglutinación ⁽⁴⁹⁾.

Inmunodifusión en agar.

La presencia de anticuerpos contra el virus de IA, se detecta con la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDG) ⁽⁵⁰⁾, en esta prueba se utiliza como antígeno la nucleoproteína del virus, por lo

cual se reconocen anticuerpos circulantes contra todos los subtipos de influenza tipo A. Es utilizada en otros países para detectar parvadas infectadas con el virus de IA sin importar el subtipo ⁽⁵⁰⁾. En el Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal, del Instituto Nacional Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (CENID-Microbiología, INIFAP), se desarrolló la prueba de microinmunodifusión en gel, (MIDG) la cual probó ser una técnica útil en conjunto con la IH, para facilitar el diagnóstico de la infección en parvadas durante el brote. Esta técnica, tiene la ventaja de emplear poco antígeno y reactivos, además de que se puede aplicar en laboratorios que cuentan con una infraestructura simple. ⁽⁵¹⁾.

Pruebas de ELISA para detección de anticuerpos.

Se han desarrollado pruebas de ELISA empleando la nucleoproteína como antígeno para la detección de anticuerpos contra el virus de IA. Estudios realizados han mostrado una alta sensibilidad y especificidad de esta técnica al ser comparada con las pruebas tradicionales y una concordancia del 95% cuando son comparados los kits desarrollados por diferentes laboratorios ^(52,53). Sin embargo, la evaluación y validación de estos kits, las han llevado a cabo los mismos laboratorios por lo que resulta de gran importancia validar estas pruebas bajo diferentes condiciones y estadíos de la enfermedad ⁽⁵⁴⁾.

DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN ANTIGENOS.

Aislamiento viral.

El virus de la IA se puede aislar a partir de muestras de hisopos de tráquea o cloaca, además de órganos como pulmón, sacos aéreos, intestino, bazo, riñón, cerebro, hígado y corazón, obtenidos dentro de los tres días posteriores al inicio de la enfermedad ⁽⁵⁵⁾. El virus se cultiva en embrión de pollo, libre de patógenos específicos (SPF) requiriendo de un mínimo de 48 horas para demostrar su presencia. ⁽⁵⁶⁾.

Pruebas de ELISA para detección de antígeno.

Esta prueba resulta ser una opción para llevar a cabo un diagnóstico rápido (10-30 minutos) y se sugiere que sea una técnica complementaria para el diagnóstico de la IA, tomando como prueba

confirmatoria el aislamiento viral ⁽⁵⁷⁾. En los últimos años, se han desarrollado pruebas comerciales, principalmente para uso en medicina humana ⁽⁵⁸⁾. Estas pruebas proporcionan la ventaja de contar con diagnóstico rápido, sin embargo, se ha descrito que tienen una baja sensibilidad, además de que resulta importante llevar a cabo la validación a nivel de campo y para diferentes especies de aves, ya que estas pruebas fueron desarrolladas principalmente para infecciones en mamíferos ⁽⁵⁷⁾.

Técnicas de biología molecular.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) resulta ser una herramienta muy útil tanto para el diagnóstico, como para la epidemiología molecular del virus de IA. Esta técnica permite la amplificación de un fragmento del genoma viral. En el caso del virus de la IA, cuyo ácido nucleico es ARN de cadena sencilla, se requiere de un paso previo a la reacción de amplificación que consiste en sintetizar una cadena complementaria al ARN llamada ADN complementario (ADNc) mediante transcriptasa reversa (RT). Una vez que se cuenta con el ADNc se procede a la amplificación por medio de la PCR ^(59,60).

Actualmente el aislamiento viral está siendo apoyado por la prueba de transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) ⁽⁶¹⁾. Con la técnica de RT-PCR se ha logrado obtener una alta sensibilidad y especificidad a partir de la utilización de iniciadores específicos que son capaces de detectar al tipo A y al menos el subtipo H5 y H7 del virus de IA ^(62, 63). Para detectar la presencia de un virus de influenza tipo A, se utilizan iniciadores específicos para un fragmento del gen que codifica para la proteína M, la cual es la región más conservada del genoma del virus ⁽⁶²⁾ y para el gen que codifica para una región de la nucleoproteína ⁽⁶⁴⁾.

Otra prueba que se utiliza y que ha tenido una gran aceptación, es la RT-PCR múltiple en tiempo real en un solo paso ya que es rápida, sensible y específica cuando se ha aplicado durante brotes de influenza H5N1. Además se disminuyen los riesgos de contaminación durante el procedimiento y el tiempo de la prueba es menor en comparación con un RT-PCR convencional ⁽⁶⁵⁾.

Nuevas alternativas de diagnóstico.

Recientemente, la más novedosa herramienta molecular que aún presenta algunas desventajas son los microarreglos de ADN, que constituyen una herramienta importante para evaluar la expresión génica, debido a la facilidad para observar la señal de miles y hasta millones de fragmentos génicos a la vez. En el caso del virus de influenza, en la literatura se notifica su uso para tipificar y/o analizar cepas de este virus. Por ejemplo, Kessler *et al* en el 2004 ⁽⁶⁶⁾ utilizaron laminillas o chips

tridimensionales, usando secuencias de captura de 45 a 65 nucleótidos para incrementar la especificidad. La captura de sondas fue seleccionada de regiones conservadas de los genomas de varias cepas de influenza A, como el: H1N1, H3N2, H1N2 Y H5N1 y virus de influenza B; sin embargo, los autores obtuvieron resultados falsos positivos en casi 50% de los microarreglos. Recientemente, una compañía comercial anuncia un microarreglo para detectar la 16 hemaglutininas y las nueve hemaglutininas del virus de influenza; sin embargo el costo por chip es de aproximadamente 700 dólares americanos. Townsend *et al* (2006), reportan el uso de un microarreglo llamado FluChip-55 para identificar los subtipos H1N1, H3N2 Y H5 N1. Se notificó que en un estudio en ciego que se completo en 12 horas, en él que usaron 72 aislamientos y se obtuvo un promedio, el 72% de los casos detectaron el tipo y subtipo; mientras que el tipo correcto sólo se mostró en 10% de los aislados ⁽⁶⁷⁾.

SITUACIÓN EN MÉXICO.

En México, el brote provocado por un virus de AP (H5N2) entre diciembre de 1994 y mayo de 1995, arrojó una pérdida monetaria de 49 millones de dólares ⁽⁶⁸⁾. Desde junio de 1995, el virus de IA de AP fue erradicado del país; sin embargo el virus de BP (H5N2) se ha seguido detectando serológicamente en diferentes regiones. Es por ello que a partir de esa fecha existe la campaña (Campaña Nacional Contra la Influenza Aviar) para su control y erradicación basada principalmente en la vacunación y el diagnóstico serológico ⁽²⁰⁾. En la vacuna oficial esta autorizada la “semilla de trabajo” para la producción de vacunas comerciales A/Ck/México/CPA-232/94 (H5N2) aislada en 1994⁽⁶⁹⁾. La inmunización de las aves en México, se lleva a cabo con vacunas inactivadas emulsionadas, las cuales han probado su eficacia confiriendo protección contra los signos clínicos y la mortalidad ^(11, 18). Sin embargo, a nivel internacional esta vacuna no se utiliza comúnmente como parte de los programas de control y erradicación de virus de AP y BP, por lo que el control se efectúa por medio de cerco sanitario y sacrificio de las parvadas expuestas ⁽⁷⁰⁾. Aunque la vacunación no siempre previene la infección, se presenta las ventaja de prevenir la enfermedad y reducir la circulación del virus ⁽⁷¹⁾. Por razones económicas en México se ha preferido llevar a cabo un programa basado en el control y no en la erradicación de la IA.

JUSTIFICACIÓN.

Debido a que recientemente ha habido un incremento en los brotes del virus de IABP en el país es necesario evaluar la protección que actualmente confieren algunas vacunas inactivadas utilizadas para prevenir la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la inmunogenicidad y protección contra signos clínicos de las vacunas comerciales inactivadas contra el virus de la IA que actualmente se utilizan para la prevención y control de la enfermedad.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Evaluar la inmunogenicidad de las vacunas inactivadas que se utilizan contra la IA.
- 2.- Evaluar la protección contra signos clínicos que generan las vacunas contra la IA después de un desafío con una cepa de virus de BP aislado en el año 2007, que fue responsable de brotes.

HIPÓTESIS.

Las vacunas oleosas inactivadas confieren protección contra el desafío de un virus de BP de IA, evitando así la presencia de signos clínicos y mortalidad en las aves inmunizadas.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Localización.- El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de influenza aviar y en las unidades de aislamiento del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria de Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de la Ciudad de México ubicado en la Carretera México-Toluca Km. 15.5, Col. Palo Alto, Cuajimalpa, D.F. C.P. 05110.

Aves.- Para la evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas se obtuvieron embriones de pollo SPF de la compañía ALPES (Aves Libres de Patógenos Específicos S. A. de C. V.) de 11 días de edad, los cuales se mantuvieron en incubación a 37°C con una humedad del 70% hasta el momento del nacimiento. Posteriormente las aves fueron trasladadas a las unidades de aislamiento en donde se formaron 6 grupos de 8 aves cada uno. Esto se realizó en dos ocasiones, ya que el experimento se realizó una primera vez y una réplica.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para tener mayor certeza de los resultados, el diseño que a continuación se describe se realizó en dos ocasiones. Después de haber concluido el primer experimento se desinfectaron instalaciones y se adquirieron los siguientes embriones, hasta haber eclosionado, se trasladaron a las unidades de aislamiento para realizar la réplica o segundo experimento.

El diseño experimental utilizado se describe en el siguiente cuadro:

GPO	TRATAMIENTO	TIPO DE VACUNA	VIA DE INOCULACIÓN *
I	8 aves vacunadas y desafiadas	Inactivada oleosa: A	Subcutánea
II	8 aves vacunadas y desafiadas	Inactivada oleosa: B	Subcutánea
III	8 aves vacunadas y desafiadas	Inactivada oleosa: C	Subcutánea
IV	8 aves vacunadas y desafiadas	Inactivada oleosa: D	Subcutánea
V	8 aves sin vacunar y desafiadas	----	----
VI	8 aves sin vacunar, ni desafiar	----	----

* La dosis se aplicó de acuerdo a las indicaciones del laboratorio productor.

Vacunas.- Se aplicó la primera vacunación en cada uno de los grupos correspondientes a las 4 semanas de edad, ya que es a esta edad en el que el sistema inmune puede responder a un estímulo de inoculación de cualquier patógeno y se revacunaron a las 8 semanas de edad. Se aplicaron 4 vacunas por vía subcutánea, inactivadas emulsionadas, elaboradas por cuatro diferentes laboratorios.

Serología.- Se tomó una muestra de sangre para la obtención de suero a las 4, 8, 12 y 16 semanas de edad. Estos sueros se analizaron por la técnica de IH, utilizando 4 unidades hemoaglutinantes (UH) del virus de IA (H5N2) y eritrocitos de pollo a una concentración del 1%, esto con la finalidad de determinar los títulos de anticuerpos generados por cada vacuna aplicada ⁽¹⁶⁾.

Titulación viral.- Se llevó a cabo la titulación de una cepa de baja patogenicidad recientemente aislada de un brote de campo del año de 2007. Esta cepa fue proporcionada por el laboratorio de la Comisión México-Americana para la erradicación de la Fiebre Aftosa (CPA). Se realizaron diluciones décuples seriadas de 10^1 a 10^{10} de la cepa en solución salina fosfatada pH 7.2. Se utilizaron embriones de 9 días de edad, los cuales se inocularon con 0.2 ml de cada dilución por vía alantoidea y se incubaron a 37°C. Los embriones que resultaron muertos dentro de las primeras 24 hrs post-inoculación se consideraron por causas iatrogénicas. A las 48 hrs se evaluó la mortalidad y a las 72 hrs se sacrificaron los embriones colocándolos a 4°C durante 12 hrs. Se colectó líquido alantoideo para realizar la prueba de hemoaglutinación rápida en placa. La titulación viral se realizó en base a la dosis infectante en embrión de pollo al 50% (DIEP₅₀) por el método de Reed y Muench ⁽⁷²⁾.

Metodología para realizar la inhibición de la hemoaglutinación.

La metodología consiste primero en titular el antígeno viral (unidades hemoaglutinantes UH), como se describe a continuación:

- Se colocó 25µl de PBS en cada uno de los pozos en las filas A, B y C de una microplaca de 96 pozos con fondo en “U”
- Se agregó 25µl de antígeno en el primer pozo de las filas A y B.
- Se realizaron diluciones dobles seriadas (desde 1:2 hasta 1:2048), transfiriendo volúmenes de 25µl del pozo A1 hasta el pozo A12 y del pozo B1 hasta el pozo B12.

- Después se adicionaron 25µl de la suspensión de glóbulos rojos de pollo al 1% en todos los pozos (A1-12, B1-12 y C1-12)
- Se tapó la microplaca y agitó para mezclar los reactivos. Se incubó a temperatura ambiente durante 30-45 minutos y se realizó la lectura hasta que se formó un botón bien delimitado en el fondo de los pozos para el control de glóbulos rojos.
- Para determinar el título de antígeno se inclinó la microplaca (aproximadamente 45°) y se observó la presencia o ausencia del escurrimiento de los glóbulos rojos en forma de lágrima. El título del antígeno se determinó tomando como referencia la dilución más alta donde se encontró el 100% de hemoaglutinación (es decir donde no se observó el escurrimiento de glóbulos rojos en forma de lágrima).
- Para obtener las Unidades Hemoaglutinantes (UH) que se empleó en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, se dividió el título del antígeno entre el número de unidades deseadas (4 UH) y el resultado de ésta división fue la dilución que se empleó para que el antígeno contenga 4 UH en 25µl.

Procedimiento de la técnica:

- En una microplaca fondo en “U” se colocaron 25µl de PBS en cada uno de los 96 pozos.
- Se transfirieron 25µl de la dilución 1:2 de suero de cada muestra a analizar a la columna 1 de la microplaca.
- Todas las muestras se trabajaron en orden secuencial, por ejemplo el suero No.1 se ubicó en el pozo A1, el suero No.2 en el pozo B1 etc. Los sueros control positivo y control negativo se procesaron de la misma forma.
- Se realizaron diluciones dobles seriadas transfiriendo 25µl de la columna 1 hasta la columna 12 y se obtuvieron las diluciones 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256; 1:512; 1:1024 y 1:2048.
- Posteriormente se agregaron 25µl de antígeno de Influenza Aviar H5 conteniendo 4 UH cada pozo.
- Se realizó una segunda titulación del antígeno a partir de la suspensión de antígeno que se empleó en la prueba, para confirmar que contenían las 4 UH requeridas (control de antígeno).
- Se tapó la microplaca, agitando por unos segundos e incubó a temperatura ambiente por lo menos 30 minutos.

- Se adicionaron 25µl de una suspensión de glóbulos rojos al 1%, se agitó nuevamente y se incubó durante 30 – 45 minutos a temperatura ambiente.
- Se realizó la lectura cuando el control de glóbulos rojos formó un botón bien delimitado en el fondo del pozo.

Interpretación.- Para confirmar que la prueba se realizó satisfactoriamente, y que el control del antígeno presenta las 4 UH, el suero del control negativo no debió presentar un título de inhibición de la hemoaglutinación mayor a 1:4 y el suero control positivo presentó un título con la diferencia no mayor a una dilución del título previamente establecido.

- Los títulos de los sueros se determinaron tomando como referencia la dilución más alta del suero donde se observó el 100% de inhibición hemoaglutinante.
- Se consideró como positivos todos aquellos sueros que mostraron una inhibición franca en la dilución 1:16.
- Todos los resultados se registraron en las bitácoras y hojas de trabajo correspondientes.

Desafío.- En todos los grupos, excepto el grupo VI, se realizó el desafío a las 12 semanas de edad vía intranasal con un título de 10^6 DIEP₅₀/0.2ml.

Evaluación de los signos clínicos.- Después del desafío, se mantuvieron en observación los grupos de aves durante un mes, realizando al menos dos visitas por día hasta el final del periodo experimental.

Análisis estadístico.- Para evaluar la inmunogenicidad, se utilizaron las medias geométricas de los títulos de anticuerpos de cada uno de los grupos. Los diferentes grupos se compararon mediante un ANOVA utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS.

Signos Clínicos: En los grupos en los cuales se llevó a cabo el desafío se observó que el 100% de las aves presentaron los siguientes signos clínicos: estertores, tos, baja en el consumo de alimento y depresión durante las dos primeras semanas post-infección. No hubo mortalidad en ninguno de los grupos.

La respuesta inmune de las aves a las 8 y 12 semanas de edad del primer y segundo experimento, se muestran en los cuadros 1 y 2, respectivamente.

En el primer y segundo experimento, se observó una respuesta inmune a la primera vacunación, aumentando significativamente la respuesta después de la segunda vacunación en los grupos I, II, III y IV. En los dos experimentos, se observó que el grupo I tuvo una respuesta significativamente mayor ($p < 0.05$) tanto a la primera y segunda vacunación en comparación con los demás grupos.

Cuadro 1.- Resultados de la respuesta inmune expresados en medias geométricas (Experimento 1).

Grupos	4 Semanas de edad*	8 Semanas de edad*	12 Semanas de edad**	16 Semanas de edad
Grupo I (Vac A + Desafío)	0 ^a	316 ^b	7586 ^c	22909 ^d
Grupo II (Vac B + Desafío)	0 ^a	69 ^b	129 ^b	3162 ^c
Grupo III (Vac C + Desafío)	0 ^a	83 ^b	794 ^c	11481 ^d
Grupo IV (Vac D + Desafío)	0 ^a	69 ^b	363 ^c	5248 ^d
Grupo V (No Vac + Desafío)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	240 ^b
Grupo VI (No Vac ni Desafío)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

* La vacunación se realizó a las 4 y 8 semanas de edad.

** Desafío con cepa de baja patogenicidad.

Valores con diferentes literal dentro de cada grupo, son significativamente diferentes. $P < 0.05$. (Prueba: Kruskal-Wallis).

Cuadro 2.- Resultados de la respuesta inmune expresados en medias geométricas (MG) (Experimento 2).

Grupos	4 Semanas de edad*	8 Semanas de edad*	12 Semanas de edad**	16 Semanas de edad
Grupo I (Vac A + Desafío)	0 ^a	603 ^b	1820 ^c	11481 ^d
Grupo II (Vac B + Desafío)	0 ^a	25 ^b	145 ^b	1445 ^c
Grupo III (Vac C + Desafío)	0 ^a	35 ^b	363 ^c	5754 ^d
Grupo IV (Vac D + Desafío)	0 ^a	35 ^b	178 ^c	2884 ^d
Grupo V (No Vac + Desafío)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	240
Grupo VI (No Vac ni Desafío)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

* La vacunación se realizó a las 4 y 8 semanas de edad.

** Desafío con cepa de baja patogenicidad.

Valores con diferentes literal dentro de cada grupo son significativamente diferentes. $P < 0.05$. (Prueba: Kruskal-Wallis).

DISCUSIÓN.

La vacunación sistematizada en las aves contra IA, que se ha empleado en el país desde el año de 1995 erradicó al virus de AP y había reducido la presencia de brotes del virus de BP, Sin embargo, a partir del año 2005 se reportó un incremento en los brotes por el virus de BP en estados que se consideraban libres ⁽⁷³⁾. La vacuna inactivada oleosa que se ha utilizado había mostrado ser eficaz y proveer protección al desafío con virus de campo ^(74, 75, 76). Esto también se ha observado en estudios previos con aves, en donde se observó que las vacunas inactivadas protegen contra signos clínicos y la muerte subsecuente ^(77 a 81).

De acuerdo con los resultados que se obtuvieron en este estudio, se observó que las cuatro vacunas que se utilizaron para la inmunización en las aves, estimuló la producción de anticuerpos, sin embargo se observó diferencias en cuanto a la respuesta inmune en las aves según la vacuna utilizada, en el primer y segundo experimento. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la respuesta inmune expresada en media geométrica (MG) de las aves del grupo I con relación a los grupos II, III y IV. Estas diferencias se observaron consistentemente en el primer y segundo experimento, excepto la semana 12 en el segundo experimento, en la cual solo se encontraron diferencias significativas en las aves del grupo I al comparar contra los títulos desarrollados en las aves del grupo II y III. De acuerdo a la norma mexicana donde se describen los requisitos mínimos para la elaboración de las vacunas empleadas para el control de la IA, señala que como mínimo se requiere de un 16% de masa antigénica en la formulación de la vacuna ⁽⁸²⁾. Los resultados de las diferencias en la respuesta inmune que se observaron en este estudio, pueden deberse a que las vacunas evaluadas pudieran tener diferentes porcentajes de masa antigénica en su formulación. Otro argumento sugiere que las vacunas utilizadas cuentan con carga antigénica diferente, ya que un estudio realizado con anterioridad, al evaluar una vacuna inactivada en una sola aplicación, se observaron niveles de anticuerpos muy bajos (MG=42), esto sugiere que la producción de anticuerpos primarios requiere de altas concentraciones de antígeno ⁽⁸³⁾, o bien esta variación en los títulos de anticuerpos para cada vacuna utilizada puede sugerir que para la formulación de las vacunas, se utilizan diferentes tipos de adyuvantes, lo cual puede incidir en la estimulación antigénica.

En recientes estudios se ha observado que el virus de IABP, ha sufrido constantes cambios en su información genética. El análisis filogénico nos muestra que 18 antígenos aislados recientemente (2002-2006) han sufrido importantes cambios en la secuencia del gen de la H comparado con el antígeno vacunal. ⁽⁷³⁾. Escorcía *et al* (2008), mostró que la acumulación de cambios genéticos en el

gen de la H permite la distinción entre nuevas y viejas cepas de virus de IA. La aparición de brotes de IA podría ser asociada a cambios antigénicos. El cual en cada cambio antigénico proporciona una evolución ventajosa para poder reinfectar al mismo hospedero ⁽⁸⁴⁾. Actualmente, para la elaboración de las vacunas inactivadas que se utilizan para el control de la IA en el país, se ocupa la “semilla de trabajo original”, la cual sigue siendo la misma desde el año de 1995. Los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que las aves que son inmunizadas con el biológico que se emplea para la prevención de la IA, no protege contra la presentación de signos clínicos ante un desafío con una cepa recientemente aislada, ya que las aves aún estando inmunizadas presentaron signos clínicos, principalmente estertores, tos y baja en el consumo de alimento. Es posible que la vacunación masiva de IA ha provocado cambios genéticos acelerados en la secuencia del gen de la H, como ha sugerido Lee *et al* en el 2004 ⁽⁶⁹⁾.

Como ya se menciono anteriormente, los virus han mostrado variación antigénica a través de los años, este es un punto importante a considerar, ya que esto puede derivar una explicación, que a pesar de que las vacunas utilizadas en este estudio son capaces de provocar una respuesta inmune humoral no son efectivas al prevenir la aparición de signos clínicos. Es conveniente recordar que los anticuerpos generados por las vacunas utilizadas bloquean ciertos receptores y que una vez que existe variación antigénica con las nuevas cepas de la IA, ocupan receptores que no han sido bloqueados, favoreciendo la adherencia del virus a las células susceptibles y ocasionando la infección y el desarrollo de signos clínicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo sería conveniente hacer un estudio de las variaciones antigénicas que presenta la cepa “semilla trabajo”, utilizada para la elaboración de las vacunas y frente a las variaciones antigénicas de los virus de campo para después a partir de esto, utilizar una nueva semilla para la elaboración de vacunas.

En éste estudio no se pudo realizar la evaluación de las vacunas con el virus de AP, ya que en el momento de la planeación de este estudio no se contaba con los recursos.

CONCLUSIONES.

En todas las vacunas se observó que la respuesta inmune no fue capaz de evitar la presencia de signos clínicos en las aves.

El virus ha sufrido ya una variación antigénica por lo que será necesario reformular una nueva vacuna con cepas actuales divergentes que circulen a nivel de campo.

Las vacunas que se utilizaron en el primer y segundo experimento mostraron el desarrollo de la respuesta inmune humoral.

Entre las vacunas hubo diferencias en cuanto a la respuesta inmune, esto en el primer y segundo experimento.

Estas diferencias pueden sugerir que la masa antigénica que viene en cada una de las vacunas no es la apropiada de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-055-ZOO-1995, Requisitos mínimos para la elaboración de vacunas emulsionadas inactivadas contra la influenza aviar subtipo H5N2.

Se sugiere que se continúen haciendo evaluaciones con estas vacunas y haciendo desafíos con cepas de AP o bien con cepas de campo circulantes, para evaluar el nivel de protección antigénica y aparición de signos clínicos.

ANEXO.**PBS.**

(SOLUCIÓN SALINA FOSFATADA BUFFERADA) AL 0.01 M, pH 7.2.

Cloruro de Sodio	8.5 g.
Fosfato de Sodio Dibásico	1.33 g.
Fosfato de Sodio Monobásico	0.22 g.
Agua destilada cbp	1 lt.

Esterilizar en autoclave o filtro (0.22 μ m).

Almacenar a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN ALSEVER´S.

Citrato de Sodio	8 g.
Ácido Cítrico	0.55 g.
Cloruro de Sodio	4.2 g.
Dextrosa	20.5 g.
Agua destilada cbp	1 lt.

Esterilizar en autoclave o filtro (0.22 μ m).

Almacenar a 4 °C.

GLOBULOS ROJOS AL 1%.

Colocar 2.5 ml de solución Alsever´s en una jeringa estéril, y coleccionar principalmente de vena radial la misma cantidad de sangre, inmediatamente mezclar las dos soluciones meticulosamente. Posteriormente colocar esta mezcla en un tubo para centrifugar y añadirle 10 ml aproximadamente de PBS mezclar estas dos y centrifugar a 1800 rpm durante 4 minutos a una temperatura de 4 °C y al término de esto sacar con cuidado la solución sobrenadante y añadirle nuevamente 10 ml aproximadamente de PBS y mezclar hasta que se disuelva todo el fondo y repetir la centrifugación hasta que se vea la solución sobrenadante totalmente transparente, ya logrado esto con una micropipeta se toma 1 ml de los eritrocitos separados en el fondo y se colocan en 99 ml de PBS, en caso de que se observe hemólisis repetir desde la toma de glóbulos rojos.

Almacenar a 4 °C.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Swayne DE and Suarez DL; High pathogenic avian influenza. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 2000 ; 19 :463-482.
2. Senne DA Avian Influenza in North and South America, 2002–2005. *Avian Diseases: March 2007*, Vol. 51, No. s1, pp. 167-173.
3. Brown IH. Summary of Avian Influenza Activity in Europe, Asia, and Africa, 2006–2009. *Avian Diseases.* 2010, Vol. 54, No. s1, pp. 187-193.)
4. Swayne DE, Senne DA, Beard CW. Avian influenza In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4th ed, 1998; pp. 150-155.
5. Cuevas, E. Detección de Orthomixovirus y Paramixovirus en anátidos de la laguna Chinconahuapan, Estado de México. FMVZ, UNAM. Tesis de Maestría, Octubre 2007.
6. Field B, *Fundamental virology.* 2^a edición, Ed. Ranvers press. New York. 1991.
7. Hernández, A. Estudio de la Patogenia del virus de Influenza Aviar (H5N2) altamente patógeno mediante inmunohistoquímica. Tesis de maestria. UNAM. 1998.
8. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev* 1992; 56:152-179.
9. Sangsiriwut, K. et al; Surveillance for Reassortant Virus by Multiplex Reverse Transcription-PCR Specific for Eight Genomic Segments of Avian Influenza A H5N1 Viruses. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45 (5) :1637-1639.
10. Parrish CR, Kawaoka Y. The Origins of new pandemic viruses: the acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 2005; 59: 553-586.
11. García S A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, Palese P, Muster T. Influenza A virus Lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 1998; 252:324-330.
12. Donelan NR, Basler CF, García SA. Recombinant influenza A virus expressing an RNA-binding-defective NS1 protein induces high levels of beta interferon and is attenuated in mice. *J. Virol.* 2003. 77:13257-13266.
13. Swayne DE, Halvorson DA; Influenza. En: Saif VM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE editors; *Diseases of poultry.* Iowa: Blackwell Publishing, 2003: 135-160.
14. Lamb R and Krug R; Orthomyxoviridae the viruses and their replications. En: Knipe DM; Howley PM, editors. *Fundamental virology.* Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 725-762.

15. Ramírez, G; Haematological and histological findings in birds experimentally infected with highly pathogenic H5N2 avian influenza virus. *Acta Veterinaria hungarica*, 2005; 53(4):463-499.
16. Ferguson NM, Galvani AP, Bush RM. Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature* 2003; 422:428-433.
17. Webster RG, Hulse DJ. Microbial adaptation and change: avian influenza. *Rev. Sci. Tech.* 2004. 23:453-465.
18. Webster RG and Kawaoka Y. Influenza: an emerging and reemerging disease. *Semin. Virol* 1994; 5:103-111.
19. Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol* 2000; 74:3-13.
20. Campaña Nacional Contra la Influenza Aviar. NOM-044-ZOO-1995 (revisada el 01.05.08) disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx>.
21. Flores A y col. Editor. "La Influenza Aviar en México". Memoria. México, Querétaro: Subsecretaría de Agricultura y Ganadería. Dispositivo nacional de emergencias de sanidad animal (1995). México.
22. Suarez D, Schultz S. Immunology of avian influenza virus: a review. *Dev. Com. Imm.* 2000; 24: 269-283.
23. Steinhauer D. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenic of influenza virus. *Virology*. 1999; 258 (1): 1-20.
24. Allan WH, Alexander DJ, Pomeroy BS, Parson G. Use of virulence index test for avian influenza viruses. *Avian Dis.* 1977. 21:359-363.
25. OIE Manual of Diagnostic, Tests and Vaccines for Terrestrial Animals in OIE web site: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00037.htm May. 2005.
26. Collins RA, Ko LS, So KL, Ellis T, Lau LT, Yu AC, Detection of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza subtype H5 (EurAsian lineage) using NASBA. *J. Virol. Methods.* 2002. 103:213-225.
27. Webster RG, Bean WJ, Goren OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992;56:53-179.
28. Murphy BR, Webster RG. Orthomyxoviruses. En: Knipe DM, Howley PM, ed. *Fields virology* vol. 1. 3a. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:1397-1445.
29. Kawaoka Y, Yamnikova S, Chambers TM, Lvov DK, Webster RG. Molecular characterization of a new hemagglutinin subtype H14 of influenza virus A. *Virology* 1990;179:759-767.

30. Ford SM, Grabenstein JD. Pandemics, avian influenza A (H5N1), and a strategy for pharmacists. *Pharmacotherapy* 2006;26:312-322.
31. Maragon S, Capua I. Control of avian influenza in Italy: from “Stamping-out”-strategy to emergency and prophylactic vaccination. In: Proc. Internat. Conf. on Avian Influenza, Paris, Francia. 2005, p. 29.
32. Lee W. The 2004 outbreak of highly pathogenic avian influenza (H7N3) in British Columbia. *Cahnet Bull.* 2004. 9:4-10
33. Henzler DJ, Kradel DC, Davison S, Ziegler AF, Singletary D, Debok P. Epidemiology, production losses, and control measures associated with an outbreak of avian influenza subtype H7N2 in Pennsylvania (1996-98). *Avian Dis.* 2003. 47:1022-1036.
34. Pearson JE. International standards for the control of avian influenza. *Avian Dis.* 2003. 47:972-975.
35. Capua I, Marangon S. The use of vaccination as an option for the control of avian influenza. *Avian Pathol.* 2003. 32:335-343.
36. Altstein AD, Gitelman AK, Smirnov YA, Piskareva LM, Zakharova LG, Pashvykina GV, et al. Immunization with influenza A NP-expressing vaccinia virus recombinant protects mice against experimental infection with human and avian influenza viruses. *Arch. Virol.* 2006. 151:921-931.
37. Sambhara S, Kuricch A, Miranda R, Tumpey T, Rowe T, Renshaw M, Arpino R, Tamane A, Kandil A, James O, Underdown B, Klein M, Katz J, Burt D. Heterosubtypic immunity against human influenza A viruses, including recently emerged avian H5 and H9 viruses, induced by FLU-ISCOM vaccine in mice requires both cytotoxic T-lymphocyte and macrophage function. *Cell. Immunol.* 2001. 211:143-153.
38. Glueck R. Review of intranasal influenza vaccine. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2001. 75:5656-5662.
39. Tizard RI. Vacunación y vacunas. *Inmunología Veterinaria 5ta. Edición*, McGraw-Hill Interamericana 1998; 285-305.
40. Hansson M, Nygren PA, Stahl S. Design and production of recombinant subunit vaccines. *Biotechnol. Appl. Biochem* 2000; 32, 95–107.
41. Sears SD, Clements ML, Betts RF, Maassab HF, Murphy BR, Snyder MH. Comparison of live attenuated H1N1 and H3N2 cold-adapted and avian-human influenza A reassortant viruses and inactivated virus vaccines in adult. *J. Infect. Dis.* 1988. 158(6): 1209-1219.
42. Nichol K, Live attenuated influenza virus vaccines: new options for prevention of influenza. *Vaccine.* 2001.19:4373-4377.

43. Fodor E, Devenish L, Engelhardt GO, Palese P, Brownlee GG, Garcia SA. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J. Virol.* 1999. 73:9679-9682.
44. Muster T, Subbarao EK, Enami M, Murphy BR, Palese P. An Influenza A virus containing influenza B virus 5' and 3' noncoding regions on the neuraminidase gene is attenuated in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. 88:5177-5181.
45. Suarez DL, Lee CW, Swayne DE; Avian Influenza vaccination in North America: strategies and difficulties. *Dev. Biol. (Basel)*; 2006;124:117-124.
46. Watanabe T, Watanabe S, Neumann G, Kida H, Kawaoka Y. Immunogenicity and protective efficacy of replication-incompetent influenza virus-like particles. *J. Virol.* 2002. 76:767-773.
47. Watanabe T, Watanabe S, Ito H, Kida H, Kawaoka Y. Influenza A virus can undergo multiple cycles of replication without M2 ion channel activity. *J. Virol.* 2001. 75:5656-5662.
48. Arenas A, Carranza J, Perea AA, Miranda A, Maldonado A, Hermoso M. Type A influenza viruses in birds in Southern Spain: Serological survey by enzyme immunoassay and hemagglutination inhibition test. *Avian Pathol.* 1990. 19(3):539.
49. Swayne DE, Beck JR, Mickle TR; Efficacy of recombinant fowl pox vaccine in protecting chickens against highly pathogenic Mexican-origin H5N2 avian influenza virus. *Avian Dis.* 1997;41:910-917.
50. Bear CW. Avian Influenza antibody detection by immunodiffusion. *Bull WHO* 1970. 42:779-785.
51. Loza-Rubio E, Diosdado VF, Hernández MA, Banda RB, Morilla GA, García GJ. Diagnóstico serológico de influenza aviar por medio de una técnica de microinmunodifusión (MIDG) en agar. *Tec. Pec. Méx.* 1997. 35(3):165-169.
52. Jin M, Wang G, Zhang R, Zhao S, Li H, Tan Y, Chen H. Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Nucleoprotein as Antigen for Detection of Antibodies to Avian Influenza Virus. *Avian Dis.* 2004. 48:870-878.
53. Shafer AL, Katz JB, Eernisse KA. Development and validation a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of type A influenza antibodies in avian sera. *Avian Dis.* 1998. 42(1):28-34.
54. Cullinane AA, Osborne M, Jackson T, Brennan C, Nelly M, A comparative study of antigenicity of two equine influenza vaccines in young thoroughbred horses. In: Van Reeth K. editors. *Symposium on Animal Influenza Viruses.* Ghent, Belgium: European Society of Veterinary Virology, 1999;53.
55. Easterday BC, Beard CW. Avian Influenza. In: Hofstad MS, Barnes BW (eds). *Disease of Poultry*, 8th ed. Iowa State University Press. Ames. 1984. pp. 482-496.

56. Beard CW, Isolation and Identification of Avian Patogens In. Hitcher SB, Domermuth CH, Purchase HG, Williams JE (eds). Am. Assoc. Avian Pathol, Kennett Square, PA. Pp 67-69, 1980.
57. Woolcock RP, Cardona JC, Comercial immunoassay kits for the detection of influenza virus type A: Evaluation of their use with poultry. *Avian Dis.* 2005. 49:477-481.
58. Landry ML, Cohen S, Ferguson D. Comparison of Binax NOW and Directigen for rapid detection of influenza A and B. *J. Clin. Virol.* 2004. 31: 113-115.
59. Mullis K, Faloona S, Scharf R, Saiki, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1986. 51:263.
60. Lee CC, Wu X, Gibbs RA, Cook RG, Muzny DM, Caske CT. Generation of CDNA probes directed by amino acid sequence: cloning of urate oxidase. *Science.* 1988. 239:1288.
61. Dibkaer K, Munch M, Handberg KJ, Jorgensen PH. Application and evaluation of RT-PCR-ELISA for the nucleoprotein and RT-PCR for detection of low-pathogenic H5 and H7 subtypes of avian influenza virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2004. 16:51-56.
62. Banks J, Speidel E, Alexander DJ. Characterization of an avian influenza A virus isolated from human an intermediate host necessary for the emergence of pandemic influenza viruses. *Arch. Virol.* 1998. 143:781-787.
63. Wood GW, McCauley JW, Bashiruddin JB, Alexander DJ, Deduced amino acid sequence at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Arch. Virol.* 1993: 130:209-217.
64. Fouchier RA, Bestebroer TM, Herfst S, Van Der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J. Clin. Microbiol.* 1998. 38: 4096-4101, 2000.
65. Payungporn S, Chutinimitkul S, Chaisingh A, Damrongwantanapokin S, Baranathai C, Amonsin A, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Single step multiplex real-time RT-PCR for H5N1 influenza A virus detection. *J. Virol. Meth.* 2006. 131:143-147.
66. Kessler N, Ferraris O, Palmer K, Steel A. Use of the DNA Flow-Thhru chip, three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza viruses. *J. Clin. Microbiol.* 2004. 42: 2173-2185.
67. Townsend MB, Dawson ED, Mehlmann M, Smagala JA, Dankbar DM et al. Experimental evaluation of the Fluchip diagnostic microarray for influenza virus surveillance. *J. Clin. Microbiol.* 2006. 44: 2863-2871.
68. Subsecretaria de Agricultura y Ganadería. La influenza aviar en Mexico. SAGAR-DINESA. 1997. p. 11.

69. Lee CW, Senne DA, Suarez DL, Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. *J. Virol.* 2004; 78:8372-8381.
70. Halvorson DA. The control of H5 or H7 mildly pathogenic avian influenza-a role for inactivated vaccine. *Diseases of poultry.* 2002. 31:5-12.
71. Lee CW, Suarez DL. Avian Influenza virus: prospects for prevention and control by vaccination. *Anima Health Res.* 2005. 6:1-15.
72. Rovozzo GC, Burke CN; *A Manual of Basic virological techniques*; Ed. Prentice-Hall, Inc, Englewood Cliffs, N.J.; 1973: 87-93.
73. Escorcía M, Vázquez M, Méndez ST, Rodríguez-Rapón A, Lucio E, Nava GM; Avian Influenza: Genetic evolution under vaccination pressure; *Virol J.* 2008; 5:15.
74. Brugh M and Stone HD; Immunization of chickens against influenza with hemagglutinin-specific (H5) oil emulsion vaccine. *Proc. 2nd Int Symp. Avian Influenza*, Georgia Center for Counting Education, Athens, Georgia. 1986; 283-292.
75. Halvorson DA, Karunakaran D, Abraham AS, Newman JA, Sivanandan V and Poss PE, *Proc. 2nd Int. Symp. Avian Influenza*, Georgia Center for Counting Education, Athens, Georgia. 1986; 283-292.
76. Stone HD, Brugh M, Hopkins SR, Yoder HW, and Beard CW; Preparation of inactivated oil-emulsion vaccines with avian viral or mycoplasma antigens. *Avian Dis.* 1978; 22:666.
77. Brugh M, Beard CW, Stone HD; Immunization of chickens and turkeys against avian influenza with monovalent and polyvalent oil emulsion vaccines. *Am. J. Vet. Res.* 1979; 40:165-9.
78. Taylor J, Weinberg R, Kawaoka Y, Webster RG, Paoletti E, Protective immunity against avian influenza induced by a fowl-pox virus recombinant. *Vaccine*; 1988; 6:504-8.
79. Beard CW, Schnitzlein WM, Tripathy DN. Protection of chickens against highly pathogenic avian influenza virus (H5N2) by recombinant fowlpox viruses. *Avian Dis.* 1991; 35:356-9.
80. Webster RG, Kawaoka Y, Taylor J, Weinberg R, Pearson J, Rivera E, Paoletti E. Efficacy of nucleoprotein and haemagglutinin antigens expressed in fowlpox virus as vaccine for influenza in chickens. *Vaccine*; 1991; 9:303-8.
81. Crawford J, Wilkinson B, Vosnesensky A, Smith G, García M, Stone H, Perdue ML, Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. *Vaccine* 1993; 17:2265-74.
82. Norma Oficial Mexicana NOM-055-ZOO-1995, Requisitos mínimos para la elaboración de vacunas emulsionadas inactivadas contra la influenza aviar subtipo H5N2.

83. Gerhard W; The analysis of the monoclonal immune response to influenza virus. III. The relationship between stimulation of virus primed precursor B-cells by heterologous virus and reactivity of selected antibodies. *J. Immunol.* 1978; 120:1164-1168.
84. Carrat F, Flahault A; Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine* 2007; 28:25(39-40):6852-62.