



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**VARIACIÓN ANTIGENICA DE DIFERENTES AISLAMIENTOS DE INFLUENZA
PORCINA EN MÉXICO**

TESIS

Que para obtener el título de

Médico Veterinario Zootecnista

Presenta

Gerardo Juárez Dartiz

Asesores:

MVZ.MC. María del Carmen Mercado García

Dr. José Iván Sánchez Betancourt

México, D.F., 14 de Junio de 2013





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.

DEDICATORIAS

A mi mamá que ha estado conmigo en buenos y malos recuerdos durante mi formación como profesional, me ha orientado y apoyado. Gracias por todos los esfuerzos realizados para que yo pueda estar en el lugar en el que estoy, te quiero mucho aunque no lo demuestre.

A mi papá, por que se que cada día que no estuvo conmigo fue para darnos lo mejor a mis hermanas y a mí. Gracias por darme el ejemplo para ser alguien responsable, te quiero mucho.

A mis hermanas por que hicieron de cada día algo diferente con sus ocurrencias, las quiero.

A mi esposa por apoyarme a concluir este paso y por estar a mi lado, te amo.

A mi niña Leila, por ser un motivo para salir adelante y por alegrarme la vida tan solo con verla, TE AMO MI MÍ NIÑA.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia que me han formado profesionalmente y por tantos buenos momentos pasados durante mi estancia en esta gran institución.

Al Dr. José Iván Sánchez Betancourt por darme la oportunidad de formar parte del DMZC y de realizar el presente trabajo.

A la Dra. Ma. Del Carmen Mercado García, por su tiempo, apoyo, paciencia, conocimiento y consejos a nivel personal y profesional, sin ella no hubiera sido posible realizar este trabajo.

A Víctor Manuel Carrera Aguirre por hacerme compañía durante la realización de este trabajo, sus consejos y los buenos ratos.

A mi esposa Alejandra García Herrera, por impulsarme a seguir adelante y por estar conmigo en los buenos y malos momentos.

A Dios por darme la posibilidad de estar en el lugar que estoy y por lo que aún me falta por recorrer.

CONTENIDO

Resumen	1
I. Introducción	3
1. Antecedentes	3
2. Etiología	5
3. Mecanismos de variación genética (shift) y antigénica (drift)	6
4. Signología y hallazgos clínicos	8
5. Diagnostico	9
6. Respuesta inmune	10
7. Reportes en México	13
8. Vacunas y vacunación	15
II. Justificación	17
III. Hipótesis	17
IV. Objetivo	17
V. Material y métodos	18
1. Selección de muestras	18
2. Preparación y acondicionamiento de las muestras para el aislamiento viral	19
3. Replicación de virus	19
4. Colección de líquido corioalantoideo	20
5. Titulación de virus	21

6. Inactivación de virus	22
7. Preparación de las vacunas	22
8. Selección de animales	22
9. Inoculación	22
10. Toma de Muestras	23
11. Preparación de sueros	23
12. Inhibición de la hemoaglutinación (IH)	24
13. IH Homóloga	24
14. IH Heteróloga (Estudios de desafío cruzado)	25
15. Porcentajes de protección cruzada	25
VI. Resultados	27
VII. Discusión	31
VIII. Conclusiones	34
IX. Bibliografía	35

RESUMEN

GERARDO JUÁREZ DARTIZ. Variación antigénica de diferentes aislamientos de influenza porcina en México. (Bajo la supervisión de: MVZ.MC. Ma. Del Carmen Mercado García y Dr. José Iván Sánchez Betancourt).

La influenza porcina (IP) es una enfermedad respiratoria aguda e infecciosa del cerdo, causada por el virus de influenza tipo A de la familia *Orthomyxoviridae* que, además, actúa como agente primario del Complejo Respiratorio Porcino (CRP). El objetivo de este trabajo fue determinar el valor de relación antigénica entre los aislamientos del virus de Influenza Porcina obtenidos de muestreos en diferentes estados de la Republica Mexicana. Se trabajó con siete aislamientos virales de Influenza Porcina (IP), los cuales fueron previamente caracterizados. El virus recuperado de cada aislamiento sirvió para la elaboración de un suero hiperinmune por aislamiento y para las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación homóloga y heteróloga. De cada uno de los virus obtenidos se inocularon dos cerdos de raza York-Landrace de dos meses de edad, repitiendo a los siete y 14 días. Se realizaron cuatro muestreos de sangre. Se utilizó la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH) homóloga y heteróloga para detectar la presencia de anticuerpos específicos de cada aislamiento con su suero hiperinmune respectivo y la respuesta heteróloga contra los otros siete antígenos. Se considero un título positivo a partir de una dilución de **1:80**.

Los resultados demuestran que existe variación antigénica entre los diferentes aislamientos y, de todos los trabajados, el aislamiento viral uno fue el que presentó variación antigénica con un mayor número de aislamientos heterólogos. Con lo que se concluye que se están presentando variaciones antigénicas entre aislamientos de IP provenientes de diferentes partes del país. El conocer que existen estas variaciones servirá para producir inmunógenos que generen una respuesta más específica hacia las variedades de IP que estén circulando en la zona; y con esto se tendrán programas epidemiológicos más eficientes, con resultados que permitirán generar un control adecuado de la enfermedad.

I. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes

La influenza porcina (IP) es una enfermedad respiratoria aguda e infecciosa del cerdo, causada por el virus de influenza tipo A de la familia *Orthomyxoviridae*^{1, 2}, este virus es un agente primario del Complejo Respiratorio Porcino (CRP)^{3,4} donde participan varios agentes infecciosos de origen bacteriano como: *Salmonella sp*, *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*, *Pasteurella sp* y *S. suis* tipo 2 o virales como el PRRS, y Circovirus porcino tipo 2 (PCV – 2). Estos actúan como agentes infecciosos coinfectantes que pueden provocar un impacto clínico – productivo aun mayor en los cerdos.^{4, 5}

La primera descripción del padecimiento identificable como influenza la realizó Hipócrates en el año 492 a.C., después, durante la edad media se describió numerosos episodios relacionados con este mal. En América, la primera descripción de un tipo de problema respiratorio severo se documentó en Texcoco en 1552 y fue denominado “pestilencia catarral”, no obstante, la primera pandemia reconocida ocurrió en 1580.⁶

El nombre de influenza fue puesto y utilizado para llamar a esta enfermedad en Florencia, Italia, en el siglo XV, durante una terrible peste ocurrida en 1537, ya que los astrólogos atribuyeron el mal a una perniciosa influenza astral (*Malathia inflenxae per le stelle*)⁷.

El virus de la Influenza porcina (VIP) tipo A es el más peligroso, ya que no solo infecta a los humanos, sino que también a una gran variedad mamíferos y aves⁶.

La influenza porcina está considerada actualmente como una enfermedad de tipo emergente en cerdos, desde su primera descripción en 1930 por Shope et. al, en la forma respiratoria^{9,10}. El subtipo H1N1 de esa época se difundió de aves a humanos y a cerdos. Se estima que fue responsable de la muerte de 20 millones de personas en todo el mundo^{10, 11}.

La aparición de la enfermedad en los cerdos ocurren como una epizootia de neumonía altamente transmisible caracterizada por: tos seca, fiebre, disnea y anorexia. Los cerdos con mayor susceptibilidad son los que se encuentran en la etapa de crecimiento y finalización debido a la decreciente protección por parte de los anticuerpos maternos (inmunidad pasiva).¹²

La porcicultura actual permite, con facilidad, la transmisión del VIP de forma horizontal (de cerdo a cerdo), debido al confinamiento. La recuperación de los animales suele producirse de siete a diez días post infección, dependiendo en gran parte de la condición corporal del cerdo y del medio ambiente en el que se encuentre¹².

La IP se caracteriza por presentar una alta morbilidad y baja mortalidad a menos que se presenten coinfecciones bacterianas^{13, 14}.

Las lesiones generalmente se desarrollan con rapidez en el aparato respiratorio, en algunos casos puede provocar la muerte, por lo tanto, es probable que el curso, naturaleza y magnitud de la enfermedad varíen con la cepa, la edad del cerdo, el estado inmune del cerdo y las condiciones medio ambientales en las que este se encuentre¹.

Los cerdos pueden actuar como reservorios de cepas antiguas de influenza humana y ser posteriormente re-introducidas en la población humana^{14,15}.

2. Etiología

La influenza porcina es provocada por un virus con genoma ARN que pertenece a la familia *Orthomixoviridae* y se tipifica en 3 grupos: A, B, C. Los virus tipo A y B son capaces de causar brotes epidémicos estacionales en todo el mundo, el virus de influenza C no se ha asociado a epidemias, rara vez causa enfermedad en humanos.^{16, 17, 18,2}

Su genoma consta de ocho segmentos de ARN de cadena simple^{1, 18} y polaridad negativa⁶. Su envoltura lipídica se deriva de la membrana plasmática de la célula infectada^{19,6}, y contiene dos glicoproteínas o antígenos de superficie: Hemoaglutinina (H) y la Neuraminidasa (N).

La hemoaglutinina desempeña varias funciones como: la adherencia a la célula susceptible, fusión de membranas y trae como consecuencia de su proyección al exterior el reconocimiento antigénico que induce la respuesta inmune^{6,15}, además produce aglutinación de eritrocitos¹.

La neuraminidasa tiene como función principal catalizar el rompimiento del ácido siálico (AS) para liberar viriones de la célula infectada; también permite el transporte del virus a través de la capa de mucina del tracto respiratorio⁶.

Los lípidos de su envoltura hacen al virus altamente susceptible a los detergentes comunes utilizados como antivirales y por lo tanto son muy lábiles en las condiciones ambientales habituales, también al calor (56°C, 30min), y al tratamiento con ácidos (pH 3)¹⁹.

Las moléculas de proteína matriz cubren la cara interna de la envoltura, donde se encuentra un complejo helicoidal de moléculas de ARN asociado a la proteína (NP) y polimerasas (enzimas que inician la replicación)²⁰.

La proteína M2 es una proteína integral de envoltura viral que forma un poro o canal iónico encargado de controlar el pH intracelular.

Las mutaciones que ocurren en el gen que codifica esta proteína determinan la resistencia a los fármacos antivirales. El receptor celular para los virus de influenza es el Ácido Siálico (AS), que se encuentra en la porción distal que forma el glicocáliz de las células⁶.

3. Mecanismos de variación genética (shift) y antigénica (drift)

La influenza porcina es una enfermedad aguda recurrente que muta con facilidad por lo que frecuentemente aparecen nuevas variantes antigénicas de cada subtipo lo que obliga a incluir dichas variantes en las vacunas para brindar una adecuada protección²¹.

Los virus de influenza sufren constantes variaciones antigénicas en sus proteínas H y N, que les permiten escapar a la respuesta inmune del huésped^{21,22}.

Típicamente una RNA polimerasa viral exhibe una tasa de error de 1×10^{-3} a 1×10^{-5} , es decir, que introduce una mutación por cada mil o 100 mil nucleótidos copiados. Los virus de la influenza tipo A muestran el mayor número de mutaciones acumuladas a través del tiempo (antigenic drift), mientras los genomas de los virus de la influenza C tienen poca variabilidad, incluso si se han aislado con décadas de separación²³.

Los virus poseen mecanismos de mutación y recombinación que les permiten cambiar constantemente, adquiriendo mayor virulencia, capacidad de atravesar las barreras de susceptibilidad inter especies y resistencia a los fármacos antivirales²⁴.

Los cambios en los virus de influenza son producidos por dos mecanismos: variación antigénica o “drift” y cambio genético o “shift”. La variación antigénica o “drift”, se da por mutaciones puntuales e individuales en la sustitución de aminoácidos de las proteínas de la envoltura viral (H y N), modificando su composición amínica e identidad antigénica^{9,18,25,26}, mientras que en el cambio genético o “shift”, ocurre cuando un animal sufre una doble infección por más de un subtipo diferente y los segmentos genómicos virales se re asocian y desarrolla una nueva combinación en las proteínas de la envoltura (H y N) en una sola partícula viral^{9,25,27}.

Este reordenamiento ocurre habitualmente en los cerdos debido a que la temperatura normal de los cerdos se encuentra entre la temperatura más baja de las aves y la más alta entre los humanos.

En los últimos 100 años, han ocurrido al menos 5 cambios de subtipo de influenza A que han causado pandemias. Desde entonces circulan los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2, con variaciones anuales en la predominancia de cada una.²⁹

Entre los años pandémicos, existen periodos en que el virus causa anualmente brotes epidémicos aislados. Estos brotes son causados por virus con variaciones antigénicas que son parcialmente controlados por la inmunidad de la población²⁹.

4. Signología y hallazgos clínicos

La influenza porcina se caracteriza por la aparición brusca de fiebre, anorexia (total o parcial), disnea, tos seca, y postración de los animales. La infección en hembras gestantes puede producir el aborto. La recuperación de los animales es rápida y suele producirse en el curso de cinco a siete días. Tras el contagio, el virus llega a los pulmones donde se multiplica en el epitelio bronquial. En la actualidad, la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en todos los países productores de ganado porcino, cursando de forma enzoótica en México. La influenza cursa con alta morbilidad (próxima al 100%) y una baja mortalidad, (menos del uno por ciento) salvo que se produzcan complicaciones bacterianas. En las mucosas de las vías respiratorias altas es frecuente observar congestión y un exudado muco-fibrinoso de color blanquecino.

Las lesiones pulmonares se caracterizan por una neumonía lobular catarral de coloración grisácea a rojo púrpura, presentando áreas de consolidación. En las áreas no neumónicas se observa enfisema y un moderado edema interlobular.^{11.}

En algunas ocasiones puede observarse pleuritis fibrinosa o fibrino-necrótica como consecuencia de complicaciones bacterianas secundarias principalmente cuando interviene *P. multocida*.^{11.}

Las vías respiratorias contienen un exudado mucopurulento, con presencia de neutrófilos, y los ganglios linfáticos bronquiales y mediastínicos aparecen edematosos pero rara vez congestionados. Pasados nueve días el virus no podrá ser localizado ni en tejidos ni en exudado pulmonar.^{29.}

5. Diagnóstico

El diagnóstico de la influenza porcina puede ser difícil de diferenciar de otro tipo de infecciones respiratorias si solamente nos basamos en signos clínicos, ya que estos pueden ser muy similares a otros cuadros^{29.}

En los brotes típicos puede hacerse un diagnóstico provisional con base en los hallazgos clínicos y patológicos. Pero debe confirmarse mediante aislamiento del virus o mediante la demostración de la presencia de anticuerpos específicos. Para el diagnóstico de laboratorio, se toman muestras de tráquea, pulmón y recientemente en semen. El virus también puede aislarse a partir de las secreciones nasales durante la fase febril o del tejido pulmonar de animales muertos durante la etapa aguda precoz.

El aislamiento se hace por inoculación en membrana corioalantoidea de embrión de pollo (SPF) de 9-11 días, recogiendo el líquido amniótico de los mismos después de 72 horas. Para su detección se utiliza la técnica de hemaglutinación específica^{1, 30,31}.

Puede hacerse un diagnóstico retrospectivo, partiendo de muestras de suero tomadas durante la etapa aguda y de convalecencia de la enfermedad, demostrando la presencia de anticuerpos específicos, usando la prueba de inhibición de la hemaglutinación^{1,30,31}.

Existen otras técnicas como son: inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación del agente causal. Para la identificación de anticuerpos específicos se tienen pruebas de fijación del complemento y pruebas inmunoenzimáticas (ELISA)²⁹.

6. Respuesta inmune

El VIP debe fusionarse con la membrana celular para poder entrar a ella y secuestrar su maquinaria genética para llevar a cabo su reproducción. Es aquí cuando el virus interactúa con el sistema inmune del hospedero³².

El sistema inmune innato es la primera defensa que el virus activa cuando se encuentra dentro del hospedero. Cuando esta se inicia, se secretan citocinas y quimiocinas como parte de la respuesta inmune inflamatoria, las cuales atraen a otras células, como neutrófilos al sitio de la infección.

Entre las citocinas que son inducidas, los interferones tipo I representan el mecanismo del sistema inmune innato más efectivo contra la propagación y replicación del virus.

La secreción de interferones tipo I no solo induce la transcripción de genes con actividad antiviral, sino que también activan a células dendríticas y otras células del sistema inmune, activando la respuesta inmune adaptativa^{33, 34}.

La protección mediada por anticuerpos se atribuye principalmente a aquellos que van dirigidos contra la hemaglutinina (HA). Se ha descrito que la inmunidad mediada por anticuerpos que van dirigidos contra la neuraminidasa (NA) es más débil, y aunque no previene la infección como es el caso de los anticuerpos anti HA, puede suprimir la replicación y por lo tanto reduce la morbilidad y la mortalidad³⁵.

El control de la infección mediada por anticuerpos puede funcionar por dos mecanismos: impidiendo la diseminación del virus y evitando la capacidad para infectar otras células del hospedero o impidiendo la maduración y liberación de nuevos viriones a partir de células infectadas.

Los anticuerpos que actúan de la primera forma se conocen como neutralizantes, mientras que los que median el segundo mecanismo de acción se conocen como inhibidores de la propagación.

La actividad virus neutralizante es mediada por anticuerpos específicos dirigidos contra la HA que previenen la unión de la célula hospedera o la fusión intraendosomal. Para esto, los anticuerpos deben unirse a las determinantes antigénicas alrededor del sitio de unión de la HA. La actividad de estos anticuerpos suele medirse mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH).^{24,36}

Los anticuerpos que se unen a sitios membranalmente proximales al sitio de unión al ácido siálico muchas veces muestran nula o muy poca actividad en las pruebas de IH. Sin embargo estos anticuerpos pueden mostrar aun así capacidad neutralizante, al inhibir la fusión intraendosomal.^{24, 36}

Por otro lado los anticuerpos que muestran actividad inhibidora de la propagación, ejercen su función durante el proceso del ensamblaje del virus en la membrana plasmática.

Las proteínas virales transmembranales se acumulan en “parches”, donde han sido desplazadas las proteínas transmembranales endógenas, y se van formando los viriones.

El reconocimiento de estas proteínas por anticuerpos específicos produce una reducción en la liberación de viriones. Una vez que la respuesta inmune por anticuerpos ha generado células B de memoria específicas, es de larga duración.^{24, 37}

La respuesta inmune que se genera después de una infección conduce a la formación de anticuerpos que se localizan en las mucosas y en el suero, los cuales desempeñan dos funciones principales: neutralización de la infección e interferencia en la liberación de nuevas partículas virales de la membrana de las células infectadas. A pesar de que en una infección se producen anticuerpos para contrarrestar las proteínas virales, los más importantes para limitar la infección se dirigen contra la HA y la NA.

En las secreciones respiratorias y en el suero se detectan los anticuerpos IgA e IgG, respectivamente. La concentración de anticuerpos contra la HA en el suero se correlaciona con la protección.²⁴

7. Reportes en México

En México se ha reportado la presencia del VIP subtipo H1N1 desde el año de 1982, durante un brote en una granja del Estado de Puebla,³⁸ el subtipo H3N2 se ha reportado que está presente en sueros porcinos desde el año 1979¹² mientras que el subtipo H1N2 se reportó recientemente en 2012.³⁹

Desde hace algunos años se ha comenzado a monitorear el VIP con lo que se ha evidenciado la presencia de los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2 en la República Mexicana.⁴⁰

En zonas rurales del estado de Yucatán, en el año 2005, se realizó un estudio de prevalencia de influenza, donde se tomaron 115 muestras de sangre de personas dedicadas a la crianza de cerdos y, por medio de la técnica de IH, se encontró una seroprevalencia de 26.9% a A/Beyern/7/95(H1N1), 40.8% a A/Sidney/5/97(H3N2), 1,7% a A/Swine/Wisconsin/238/97(H1N1) y 79.8% a A/Swine/Minnesota/593/99(H3N2). Cabe mencionar que en esas zonas el sistema de crianza de cerdos de traspatio es una actividad tradicional de la población. Este es el primer informe en México del predominio de anticuerpos al virus de la gripe de los cerdos en los humanos.⁴¹

También se ha evaluado la seroprevalencia en animales de diferentes sistemas de producción donde se encontró que el 77.8% fueron positivos al subtipo H1N1 y el 44% al H3N2.⁵

Otro estudio reporta la coexistencia de ambos subtipos en diferentes zonas productoras de México (noroeste, noreste, bajío, centro, sureste y Yucatán). En donde la zona centro tiene el segundo lugar en seroprevalencia para H1N1 (80%) y el primero para H3N2 (52%).⁴²

La IP ha pasado de ser un padecimiento estacional ocasionado por un genotipo viral estable, para convertirse en una enfermedad respiratoria de incidencia constante causada por múltiples genotipos que se encuentran bajo continuo cambio.⁴⁰

A mediados del 2009, aparece una nueva variante denominada A/H1N1-2009, y fue detectada en humanos. Los cerdos también son susceptibles a este virus y podría ser incluida en vacunas destinadas a esta especie.⁴³

Recientemente mediante la técnica de RT-PCR multiplex se evidenció la presencia de un nuevo subtipo en México, el H1N2.³⁹

8. Vacunas y vacunación

El uso de la vacuna contra la Influenza porcina (IP) se ha incrementado en años recientes por lo que es importante conocer el potencial de respuesta inmune que se puede esperar.⁴⁴

Para una óptima respuesta inmune después de la vacunación es mejor esperar que los anticuerpos de origen materno hayan declinado.⁴⁵

Debido a las diferencias antigénicas entre los virus circulantes, las cepas que componen las vacunas comerciales frente a influenza porcina también son diferentes incluso entre continentes.⁴⁶

A diferencia de Europa, en Estados Unidos también se producen vacunas autógenas que contienen cepas locales específicas (Olsen *et al.*, 2006).

Las vacunas de influenza para cerdos se basan en virus inactivado suspendido en un adyuvante oleoso, algunas vacunas son bivalentes con ambos subtipos, H1N1 y H3N2; otras contienen solo uno de éstos.

Se han usado otro tipo de vacunas a base de ADN viral usando el subtipo H1N1. Algunas otras incluyen un adenovirus con ADN recombinante que expresa los genes que codifican para la hemaglutinina H3 y la nucleoproteína del virus de influenza subtipo H3N2.⁴⁶

Las vacunas con un solo serotipo, H1N1 o H3N2, no protegen al cerdo contra la replicación viral del subtipo H1N2, pero se ha demostrado que la aplicación de una vacuna bivalente con H1N1 y H3N2, brinda una sólida protección contra el subtipo H1N2 en pruebas de desafío. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los anticuerpos maternos (para H1N1 y H3N2), no protegen al lechón contra una infección por el subtipo H1N2, en contraste con la protección que se observa en cerdos que desarrollan inmunidad activa.⁴⁶

Estas vacunas han cambiado muy poco pero, a pesar de ello, inducen cierto nivel de protección frente a cepas víricas más recientes (aparecidas en los años noventa) (Van Reeth *et al.*, 2001) e incluso frente al virus H1N1 responsable de la pandemia del año 2009 (Vincent *et al.*, 2010).

II JUSTIFICACIÓN

Debido a que el virus de influenza es altamente mutable y a los cambios genéticos y antigénicos entre los subtipos virales que se han observado durante los últimos años, es necesario conocer la variabilidad antigénica de los virus de influenza porcina que circulan actualmente en México, y que pudieran provocar en algún momento un riesgo en la salud animal y pública.

III HIPÓTESIS

Dada la variabilidad genómica del virus de influenza se podrá identificar, por medio de pruebas cruzadas de inhibición de la hemoaglutinación, si siete aislamientos virales de influenza porcina que circulan actualmente en México tienen relación antigénica.

IV OBJETIVO

Determinar el valor de relación antigénica entre siete aislamientos del virus de Influenza porcina que están circulando actualmente en México mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.

V MATERIAL Y MÉTODOS

1. Selección de muestras

El estudio se realizó con virus aislados a partir de muestras de órganos de cerdos, obtenidas de rastros de diferentes estados de la republica mexicana.

Cuadro 1. Nomenclatura y procedencia de los aislamientos virales utilizados

Numero de aislamiento	Muestra	Procedencia	Nomenclatura
1	Pulmón, tráquea, tonsila.	Estado de México	Influenza A virus (A/swine/Mexico/Mex19/2010(H1N1)) hemagglutinin (HA)
2	Pulmón	Veracruz	Influenza A virus (A/swine/Mexico/Ver29/2010(H1N1)) hemagglutinin (HA)
3	Pulmón	Veracruz	Influenza A virus (A/swine/Mexico/Ver31/2010(H1N1)) hemagglutinin (HA)
4	Pulmón	Querétaro	Influenza A virus (A/swine/Mexico/Qro35/2010(H1N1)) hemagglutinin (HA)
5	Pulmón	Veracruz	Influenza A virus (A/swine/Mexico/Ver37/2010(H1N1)) hemagglutinin (HA)
6	Pulmón	Michoacán	Influenza A virus (A/swine/Mexico/Mich40/2010(H3N2)) hemagglutinin (HA)
7	Pulmón	Estado de México	Influenza A virus (A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2)) hemagglutinin (HA)

2. Preparación y acondicionamiento de la muestra para el aislamiento viral.

- Las muestras se mantuvieron en congelación hasta el momento de ser procesadas.
- Se realizó un macerado, utilizando un mortero o una licuadora estéril, colocando una parte de muestra por nueve partes de Medio mínimo esencial (MEM) sin suero.
- Una vez realizado el macerado se filtro de manera no estéril por membranas de pre filtro, 1.2, 0.8, 0.65, 0.45 y 0.22 micras; este último filtrado se paso por una membrana de 0.22 micras utilizando material estéril y en una campana de flujo laminar. El resultado del último filtrado se utilizó para inocular embriones de pollo.
- Todo el proceso de filtración se realizó con refrigerantes.
- Cada aislamiento se inoculó en al menos cinco embriones de pollo de 9-11 días de edad, incluyendo los que fueron inoculados con los virus de referencia H1N1 y H3N2 y los controles negativos que fueron inoculados con solo medio de cultivo.

3. Replicación de virus

- Todo se realizó en campana de flujo laminar.
- Con ayuda del ovoscopio se marco la cámara de aire y la posición del embrión. Los embriones que habían muerto fueron eliminados.

- Se desinfecto con alcohol el área donde se encuentra la cámara de aire.
- Se realizó una pequeña perforación del lado opuesto del embrión.
- Los embriones fueron inoculados a través del orificio por medio de una jeringa para insulina con 200µl:
 - i. 5 por cada aislamiento.
 - ii. 5 para el control positivo de H1N1
 - iii. 5 para el control positivo de H3N2
 - iv. 5 con medio como control negativo
- Se cubrió el orificio con pegamento blanco.
- Se dejaron incubar en estufa de cultivo a 37°C.
- A las 24 horas se revisaron los embriones. Los embriones muertos fueron eliminados ya que se considera que su muerte fue debida a la manipulación durante la inoculación y no debido al efecto del virus.
- Se revisaron diariamente hasta las 72 horas y a los embriones que murieron a partir de las 48 horas se les colecto el líquido corioalantoideo en tubos vacutainer estériles.

4. Colección del líquido corioalantoideo.

- Se limpio el área de la cámara de aire con alcohol.
- Se corto el cascarón siguiendo la línea que indica la ubicación de la cámara de aire.
- Se extrajo el líquido corioalantoideo de cada embrión y se deposito de manera individual en tubos vacutainer estériles.
- Esta colección se realizó por medio de micropipetas de 1000 µl.

- Los líquidos colectados fueron centrifugados a 3500 rpm durante diez minutos.
- Las muestras fueron tituladas en placas de 96 pozos utilizando eritrocitos de ave al 0.5%, para eliminar los sobrenadantes que son negativos y alícuotar los positivos.
- Si no existía actividad aglutinante a partir del primer pase, se procedió a repetir todos los pasos anteriores para realizar un segundo pase.⁴⁷

5. Titulación de virus

Se realizaron titulaciones de cada aislamiento a través de la prueba de hemoaglutinación de la siguiente manera:

- Se colocó 50µl de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con un PH de 7 a 7.2 en una placa de micro titulación de 96 pozos con fondo en “U”.
- Se colocó 50µl de virus en el primer pozo y se realizaron doce diluciones dobles seriadas desde dos hasta 4096.
- Se colocó 50µl por pozo de una suspensión de eritrocitos de ave al 0.5% (previamente preparados con PBS) en toda la placa donde se colocaron las diluciones de los aislados, además de al menos una hilera de control de eritrocitos, y se dejó incubar a temperatura ambiente hasta que sedimentaron los eritrocitos en la hilera control observándose los botones y posteriormente se realizó la lectura.

Para la preparación del virus utilizado para inocular a los cerdos, cada aislado se ajustó a un título de 128 a 256 Unidades hemoaglutinantes (UH).

El título del virus se ajusto a 8 UH para la realización de las pruebas de Inhibición de la hemoaglutinación (IH).⁴⁰

6. Inactivación del virus

Los virus con un titulo de 128 a 256 UH fueron inactivados con luz UV a una longitud de onda de 300nm durante media hora. Se comprobó la inactivación al inocular embriones de pollo SPF (Specific Pathogenic Free) de 9-11 días y no observar muerte embrionaria ni actividad aglutinante hasta 72 hrs posteriores.⁴⁸

7. Preparación de las vacunas

Una vez inactivados los aislamientos, se prepararon dos tipos de vacunas, una para aplicación intramuscular y otra para aplicación intranasal. Para la primera, un ml de cada virus se mezclo con un ml de hidróxido de aluminio, en una relación 1:1, bajo condiciones de esterilidad, dentro de una campana de flujo laminar, para su aplicación intramuscular (dos ml). Para la Vacuna intranasal se dejó un ml del virus inactivado sin hidróxido de aluminio.

8. Selección de animales

Los cerdos fueron traídos del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la UNAM con un peso promedio de 12 kg y 15 semanas de edad en condiciones óptimas de salud.

9. Inoculación

Se inocularon dos cerdos por cada aislamiento viral, un ml por vía intranasal y dos ml vía intramuscular en la tabla del cuello. En total fueron cuatro inoculaciones semanales por cerdo y cuatro muestreos posteriores a cada inoculación.

10. Toma de muestras

Se realizó un muestreo previo a la primera inoculación de cada uno de los cerdos para comprobar que no presentaban anticuerpos contra el VIP.

Las muestras se colocaron en tubos sin anticoagulante para que se formara el coagulo y obtener así el suero. Se usaron agujas calibre 20 y 1.5 pulgadas. La punción se efectuó en las venas cava anterior o yugular externa. Para el primer caso, los animales permanecieron de pie o en decúbito dorsal, la aguja se inserto en la región del encuentro, paralelamente a la tráquea, con una dirección cráneo caudal y ventro-dorsal hacia la línea media. Para puncionar la yugular exterior se requirió que el animal estuviera de pie, y la aguja se inserto sobre el surco de la yugular, aproximadamente 10 cm antes de la región del encuentro.^{49,50}

11. Preparación de sueros

Para eliminar el coagulo las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm por diez minutos separando el sobrenadante en tubos vacutainer identificados y en condiciones estériles. Los sueros se mantuvieron en congelación hasta el momento de coleccionar todas las muestras.

Antes de realizar la prueba de IH, los sueros fueron inactivados a 56°C por 30 minutos. Posteriormente fueron adsorbidos en microplacas de plástico de 96 pozos fondo plano agregando:

50µl de cada suero

100µl de caolín

100µl de eritrocitos de ave al 5%

Quedando el suero diluido 1:5. Las muestras se dejaron en refrigeración a 4°C para ser trabajados al día siguiente.⁵¹

12. Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH)

Esta prueba se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Snyder (1989).

- Se utilizaron placas de micro titulación de 96 pozos de fondo en “U”.
- Se colocó 50 µl de PBS en toda la placa.
- Se colocó 50 µl de cada uno de los sueros en la fila “1”.
- Se realizaron diluciones dobles seriadas de la fila “1 a 12”.
- Se colocó 50µl de antígeno de VIP previamente diluido con ocho UH de la fila “2 a 12”, incluyendo un control de virus (50µl de PBS + 50µl de antígeno), y se dejó incubar a temperatura ambiente por 30min.
- Se colocó 50µl de suspensión de eritrocitos de ave al 0.5 % a toda la placa, incluyendo un control de eritrocitos (50µl de PBS + 50µl de suspensión de eritrocitos de ave al 0.5%), y se dejó incubar a temperatura ambiente hasta que sedimentaron los eritrocitos para poder realizar la lectura.
- Las diluciones de los sueros fueron a partir de 1:10 hasta 1:20480 y se consideraron positivas aquellas muestras con un título mayor o igual a 1:80.⁵¹

13.IH Homóloga

La prueba se utilizó para detectar la presencia de anticuerpos específicos de cada aislamiento con sus sueros hiperinmunes respectivos por medio de la Prueba de IH.

Las diferentes diluciones dobles de los sueros se pusieron en contacto con el virus en cantidades constantes (ocho UH) para que se llevara a cabo una reacción antígeno-anticuerpo y el virus fuera neutralizado por anticuerpos específicos. La reacción fue evidenciada por medio de eritrocitos de ave, los cuales en ausencia de anticuerpos aglutinaron (suero negativo) y en presencia de anticuerpos sedimentaron (suero positivo). Las diluciones de los sueros iniciaron con 1:10 hasta 1:20480 y se considero un título positivo a partir de una dilución de 1:80. La lectura se realizó tomando la dilución inversa a donde comenzó a observarse la aglutinación de cada uno de las muestras.⁵²

14.IH Heteróloga (Estudios de desafío cruzado)

Se realizó el ensayo de inhibición de la hemoaglutinación empleando la técnica descrita anteriormente, utilizando diferentes diluciones de anticuerpos, confrontadas con los virus heterólogos a una concentración de ocho UH. La lectura se realizó una vez que el control de eritrocitos sedimentó.⁵²

15.Porcentajes de protección cruzada

El porcentaje de protección obtenido con los desafíos de virus homólogos y heterólogos fue calculado de la siguiente manera.

Los valores de protección fueron calculados para cada una de los aislamientos usando la ecuación de Archetti and Horsfall (1950) que se describe a continuación:

Los títulos de cada suero fueron usados para establecer los valores de r1 y r2.

Donde:

r = valor de relación antigénica,

r1= titulo heterólogo #2 / titulo homólogo #1.

r2 = titulo heterólogo / homólogo #2.

Los porcentajes de protección antigénica (PPA) que tuvieron un valor de 0 fueron reemplazados con el valor 0.01 para poder realizar los cálculos mediante la multiplicación de los valores de r (r1 x r2), del cual el resultado fué multiplicado por 100 para convertirlo en porcentaje.

r = valor de relación antigénica

$$r = \sqrt{r1 \times r2}$$

r1 = titulo heterólogo #2 / titulo homologo #1

r2 = titulo heterólogo #1 / titulo homologo #2

$$r = 100\sqrt{r1 \times r2}$$

Cuando el valor de relación antigénica (VRA) sea menor a uno los aislamientos virales están relacionados antigénicamente. Si el VRA es mayor a uno los aislamientos virales no están relacionados antigénicamente (variación antigénica).^{52, 53}

VI. RESULTADOS

1. Aislamientos virales

Se trabajaron con un total de siete aislamientos virales los cuales previamente fueron tipificados y subidos al GenBank cuya nomenclatura fue presentada en el cuadro 1. (Avalos et.al. 2012).⁵⁴

Los virus fueron adaptados a través de inoculaciones sucesivas en embriones de pollo, de nueve a once días edad, hasta que alcanzaron un título de entre 128 y 256 UH. El título de los virus fue ajustado a 128-256 UH para la inoculación de los animales para la elaboración de los sueros hiperinmunes, y a ocho UH para la realización de las pruebas de IH Homóloga y Heteróloga,.

Los cerdos fueron inoculados durante cuatro semanas y se obtuvieron cuatro muestreos posteriores a cada inoculación. Se utilizó los resultados del último muestreo para la realización de las pruebas de relación antigénica.

Para realizar la prueba de IH cruzada se estandarizo el título de cada uno de los aislamientos a ocho UH y se confrontaron con cada uno de los antisueros. Los resultados del último muestreo se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Títulos de la respuesta homóloga y heteróloga de cada aislamiento del VIP con su antisuero específico mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.

AV	1	2	3	4	5	6	7
1	40	640	320	320	320	640	640
2	80	20	40	40	160	320	640
3	40	20	80	20	640	160	320
4	80	80	320	160	320	80	640
5	40	320	160	320	80	80	320
6	40	320	320	320	160	2480	2560
7	40	80	160	320	80	160	320

Donde se observa que los animales que fueron inoculados con el aislamiento dos presentaron los títulos más bajos (1:20), mientras que con el aislamiento seis el título homólogo fue el más alto (1:2480).

Los títulos de la IH presentados en el cuadro 2 fueron transformados en valores r_1 y r_2 y se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3. Valores de r_1 y r_2 obtenidos de los diferentes aislamientos de VIP confrontados con los antisueros generados.

Aislamiento	1	2	3	4	5	6	7
1	1	16	8	8	8	16	16
2	4	1	2	2	8	16	32
3	0.5	0.25	1	0.25	8	2	4
4	0.5	0.5	2	1	2	0.5	4
5	0.5	4	2	4	1	1	4
6	0.01	0.12	0.12	0.12	0.06	1	1.03
7	0.12	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1

*Todos los valores que estén por encima de la diagonal corresponden a r_1 y todos los valores que estén por debajo de la diagonal corresponden a r_2 .

Donde se observa que los valores más altos corresponden a r1, particularmente los encontrados con el aislamiento 1 con respecto al resto de los aislamientos. Mientras que para r2 los valores más altos corresponden al aislamiento 5 con respecto al aislamiento 2 y 4.

Los valores de r1 y r2 fueron sustituidos en la fórmula de Archetti & Horsfall (1950) para calcular el valor de relación antigénica (VRA) que se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Valores de relación antigénica entre los diferentes aislamientos de influenza porcina.

Aislamiento	1	2	3	4	5	6	7
1	1.00	8.00*	2.00*	2.00*	2.00*	0.51	1.41*
2		1.00	0.71	1.00	5.66*	1.44*	2.83*
3			1.00	0.71	4.00*	0.51	1.41*
4				1.00	2.83*	0.25	2.00*
5					1.00	0.25	1.00
6						1.00	0.72
7							1.00

*Indica variación antigénica.

Los valores de relación antigénica muestran la especificidad de los anticuerpos generados por el virus homólogo ya que el resultado tiene un valor de uno. Por el contrario en la confrontación con el resto de los virus, es decir, virus heterólogos, se muestran valores diferentes a uno con lo cual se identifica la variación antigénica.

Con respecto a los resultados encontrados, se observó que donde se presentó una mayor variación antigénica fue en el aislamiento uno con respecto a los otros aislados y donde se presentó mayor relación antigénica fue en el aislamiento seis con respecto a los demás.

VII. DISCUSIÓN

La influenza es una enfermedad altamente contagiosa capaz de ocasionar una morbilidad del cien por ciento y una mortalidad del uno por ciento, de rápida diseminación en poblaciones de animales susceptibles en condiciones de hacinamiento.^{13,14}

El riesgo constante de la presentación de las pandemias por los virus de influenza tipo A son un riesgo latente a nivel mundial que generan una gran preocupación a las autoridades de salud debido a que existen subtipos virales en donde cada especie puede ser afectada por uno o varios subtipos virales, pero también un mismo subtipo viral con algunas diferencias en sus genes puede ser capaz de infectar a otra especie.

En México se contaba solo con reportes de los subtipos H1N1 y H3N2. En un estudio realizado en 2012 utilizando la técnica de RT-PCR se evidenció la presencia del subtipo H1N2 que no se había reportado en México.³⁹

En el presente estudio se demostró que existe variación antigénica entre los diferentes aislamientos obtenidos de diferentes estados de la Republica Mexicana utilizando la prueba de inhibición de la hemoaglutinación

La prueba de IH se ha utilizado para realizar una gran cantidad de estudios epidemiológico tanto en cerdos como en otras especies; uno de ellos fue llevado a cabo en Yucatán con pollos de traspatio donde, además de utilizarla como método

diagnóstico, se evidenció que existe variación antigénica entre los diferentes aislamientos de Bronquitis infecciosa.

Utilizando la prueba de IH para confrontar respuestas homólogas y heterólogas utilizando también el método de Archetti y Hosfall, como lo llevado a cabo en este estudio.⁵⁵

Un estudio realizado en Argentina en influenza humana, mediante el uso de IH, demostró que algunos aislamientos presentan respuesta específica con sus antisueros homólogos y menos específica con los antisueros de las cepas vacunales, lo que obliga a modificar las vacunas constantemente dependiendo la variedad del virus que este circulando en ese momento. Lo que apoya lo encontrado en este estudio, donde de los siete aislamientos virales que se trabajaron, en cinco de ellos se encontró variación.⁵⁶

Archetti y Hosfall (1950) encontraron variabilidad antigénica en VIP, observando *in ovo* una neutralización incompleta del virus utilizando sueros inmunes con virus heterólogos. A pesar de que en este estudio no se realizaron ensayos de neutralización viral podemos inferir que los resultados encontrados utilizando la técnica de IH, apoyan lo encontrado por Archetti y Hosfall, debido a la alta correlación de los resultados que se presentan entre ambas técnicas.⁵³

Un estudio realizado en 2004 utilizó la técnica de IH para identificar diferencias entre aislamientos virales de ojo azul, la cual evidenció que los virus presentan diferencias antigénicas entre ellos y a través de esta técnica es posible identificar el virus que este circulando en esos momentos en alguna granja.

Lo que también ocurre en el caso de IP, como lo demuestran los resultados de este estudio, donde se encontró diferencias en los títulos al confrontar los sueros obtenidos con los virus homólogos y heterólogos.⁵⁷

Se ha reportado que el virus de la parotiditis o paperas (paramixovirus) presenta variación antigénica relacionada con el reconocimiento de anticuerpos así como afinidad por diferentes tipos celulares. Se reconocen variaciones en secuencias de nucleótidos de los genes HN y P (fosfoproteína). En el caso de IP, debido a las variaciones que se reportan en sus proteínas de superficie H y N es posible encontrar la afinidad de los sueros con su virus homólogo, como lo encontrado en este trabajo.^{58, 59}

En 2004, en un estudio realizado por Sánchez BJI, utilizando la prueba de IH, se analizó la relación que existe entre diferentes aislamientos y sueros de cerdos infectados de forma natural. Los resultados demostraron un reconocimiento variable de los anticuerpos para cada uno de los aislamientos del Rubulavirus porcino. Con lo que concluyó, que existe variación antigénica entre cada uno de ellos, como ocurre en el caso de IP.⁵⁷

Así mismo, Riaño CV (2011), realizó un estudio infectando cultivos celulares con diferentes virus de ojo azul para obtener anticuerpos específicos. Utilizando la prueba de IH confrontó sueros de conejo con virus homólogos y virus heterólogos de aislados de ojo azul. Concluyó que existe variabilidad antigénica entre los diferentes aislamientos usados, lo que también concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, utilizando el virus de influenza.⁵²

VIII. CONCLUSIONES.

- Existen variaciones antigénicas entre aislamientos del VIP.
- Se pudo determinar la relación antigénica que existe entre aislamientos procedentes de diferentes estados de la República Mexicana.
- Se evidenció la confiabilidad de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación como herramienta en el laboratorio para el diagnóstico de influenza porcina.
- El conocer que existen variaciones antigénicas entre aislamientos del VIP permitirá elaborar inmunógenos que generen una respuesta más específica hacia el tipo o tipos de VIP que estén circulando en la zona en un periodo determinado. Con lo cual se podrá llevar a cabo un programa epidemiológico más eficiente, con resultados favorables y sobre todos se generará la información necesaria para un control adecuado de la enfermedad.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Straw EB, D'Alaires, Mengeling LW and Taylor JD. Diseases of swine 8 edit. Ames, Iowa U.S.A 2000: 277-290.
2. Ducatez M.F., Webster R.G., Webby R.J. animal influenza epidemiology. Vaccine. 2008; 26: 67-69.
3. Trujillo OME. Carreón NR, Mercado GC, Quezada MF. Determinación de anticuerpos contra el virus de influenza H1N1 Y H3N2 en sueros porcinos. Memorias de XXXIX Congreso Nacional de 2004. Julio 28 – agosto -1; Mazatlán (Sinaloa) México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2004: 181.
4. Dee SA. The porcine respiratory disease complex. Are subpopulations important? Journal Swine Health and production. 1996; 4: 147- 149.
5. Lozano HMA, Mercado GC, Carreón NR, Jimenez NJL. Evidencia serología de los subtipos H1N1 Y H3N2 del virus de influenza porcina en tres diferentes sistemas de producción en México. Memorias de XLI Congreso nacional de 2006. Agosto 16 – 19; Ixtapa (Guerrero) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2006: 251.
6. García Juan, ramos C. La influenza, un problema vigente de salud pública. Salud Pública de México. 2006; 48: 244-267.
7. Cevallos M. la influenza de las estrellas. Breve historia de divulgación de la ciencia ¿Cómo ves? 2003; 51: 10-17.

8. Carreón NR, Chapa –Bezannilla J, Martínez OC, Pacheco R, Palacios JM. La infección por el virus de la influenza porcina en México. Memorias del XL Congreso Nacional de 2005 julio 25-29; León (Guanajuato) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2005:198.
9. Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary Microbiology*. 2000; 74: 29-46.
10. Avalos GP, Mendoza ES, Macías M, Trujillo ME, Sánchez JI. Seroprevalencia del virus de influenza porcina en el Bajío de la República Mexicana. Memorias del XLIII Congreso Nacional de 2008. Julio 23-26; Morelia (Michoacán) México. México (DF): asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2008. 170.
11. Morilla GA, Jin YoonK, Zimmerman JJ. Enfermedades víricas emergentes del cerdo 1ª ed. Barcelona, España: Grafica IN Multimédica, 2004.
12. Jiménez L, Mercado C, Carreón R, Herradora M. Determinación de anticuerpos contra el virus de H3N2 en cerdos de diferentes sistemas de producción en México. Memorias del XLI Congreso Nacional de 2006. Agosto 16-19; Ixtapa (Guerrero) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2006:200.
13. Vincent L. A review of swine influenza diagnostics. *Journal Swine Health and Production*. 1998; 6 (1): 33-34.
14. Trujano M, Palacios JM. Impacto epidemiológico del virus de influenza en porcinos. Memorias del XL Congreso Nacional de 2005 julio 25-29; León

- (Guanajuato) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en cerdos, AC, 2005: 144-146.
15. Thacker E, Janke B. swine Influenza Virus: Zoonotic potential and vaccination Strategies for the control of Avian and Swine influencias. *The Journal of Infectious Diseases* 2008; 197: 19-24.
 16. Straw EB, Silve D Allaire, Mengeling LW, Taylor. DJ. *Diseases of swine*. 9a ed. Iowa: States Press Iowa, 2005: 469-482.
 17. Gramer M. Defining swine Influenza virus. *Journal swine health and production*. 2005: 13(3): 157-160.
 18. Gramer M. Influenza Virus: Basic Virology and Pigs, peoples, and poultry: influenza as a Zoonotic Disease.
 19. Franck, F. *Virología Veterinaria* Edit. Acriba. 2da edic. 1992: 490-495.
 20. Straw B, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. *Enfermedades del cerdo*. Intermedica. 8ª ed. Tomo I. Buenos Aires Argentina. 2001: 161 – 168.
 21. García GJ, MVZ, PhD; Celso Ramos, QBP, Dr en C. La influenza, un problema vigente de salud pública. Artículo de revisión. *Salud pública Méx*. V.48 N.3 Cuernavaca mayo/junio 2006.
 22. Sánchez BJI, Trigo TFJ. La influenza en medicina veterinaria, *Revista digital Universitaria* 1 de abril de 2010, volumen 11 numero 04, ISSN: 1067 – 6079. Disponible en URL: <http://www.revista.unam.mx/vol.11/num4/art39/art39.pdf>
 23. Salazar MI, López OO, León AG, Ramírez GJE, Castro MME. El origen de la variabilidad genética de los virus de la influenza. 30/mayo/2010.

24. Pérez TM. Estudio de la respuesta de anticuerpos en pacientes infectados por el virus de la influenza A H1N1 durante el periodo de la pandemia abril-mayo 2009. (tesis de licenciatura). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2010.
25. Stine D, Anderson G, Liem A, Keil D, McCorkendale D. Recent observations of swine influenza disease and prophylaxis in US swine herds. Memorias de XXXVII Congreso Nacional de 2002; Pto. Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2002: 43-46.
26. Arbeláez A, Calderón D, Rincón M, Lora A, Marcela Mercado. Improvement of two diagnostic methods for detection of influenza swine virus. Revista de la Facultad de Ciencias. 2008; 65 – 74.
27. Geo Vana, Kristi M. Westover. Origin of the 1918 Spanish influenza virus: A comparative genomic analysis. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2008; 47: 1100 – 1110.
28. Carreón, NR. Diagnostico de influenza porcina, una necesidad actual. Los porcicultores y su entorno. 2005, 45 Mayo – Junio: 56 – 62.
29. González CT, Ramírez MH, Stephano HA, Espino RG. Evaluación serológica del virus de la influenza porcina en cerdos de 10 granjas de 5 Estados de la República Mexicana. Memorias XXV Congreso Nacional de 1990 agosto 15 – 18; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 1990: 148-149.

30. Carreón NR, Rodríguez TJ, Ramírez MH, Mercado GC, Hinojosa RC. Detección de anticuerpos contra el virus de Influenza Porcina en diferentes Estados de la República Mexicana. XXXII Congreso Nacional de 1997 agosto 10 – 13; Ixtapa Zihuatanejo (Guerrero) México. México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 1997. 93 – 94.
31. Morilla, G.A. Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos. 2ª ed. México, D.F: Manual Modernos, 2005
32. Kuiken, T and Taubinger JK. Pathology of human influenza revisited. Vaccine, 2008. 26 suppl 4: p. D59 – 66.
33. Aldridge, J.R., Jr., et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. Proc Natl Acad Sci USA, 2009. 106 (13): p. 5306-11.
34. Lopez CB, et al., TLR-independent induction of dendritic cell maturation and adaptive immunity by negative-strand RNA viruses. J Immunol, 2004. 173: p.6882-9.
35. Epstein S, et al., Beta 2-microglobulin-deficient mice can be protected against influenza infection by vaccination with vaccine-influenza recombinants expressing hemagglutinin and neuraminidase. Journal of immunology, 1993. 150 (5484-5493).
36. Mozdzanowska K., et al., A pulmonary influenza virus infection in SCID mice can be cured by treatment with hemagglutinin-specific antibodies that display

- very low virus- neutralizing activity in vitro. *Journal of Virology*, 1997. 71: p. 1906-1910.
37. Gerhard W. The role of the antibody response in influenza virus infection. *Curr top Microbiol Immunol*, 2001. 260: p. 171-90.
38. Ramírez SMA. Aislamiento e identificación del Virus de Influenza Porcina en México. 1982: 13: 103.
39. Castro PF, Cortes FR, Echeveste GAR, Lara PJ, Lozano DB, Quezada MF, Sarfati MD, Soto PE. Laboratorio Avi.Mex, S.A de C.V. identificación de un nuevo subtipo de influenza porcina (H1N2) en México. 8/10/12.
40. Carrera AVM. Estudio serológico retrospectivo (2000-2009) de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 en el distrito Federal. (tesis de licenciatura). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2010.
41. Talavera G, Burgos J, Armas A. Serologic evidence of human and swine influenza in mayan persons. *Emerging Infectious disease*. 2005: 11(5); 158-160.
42. Carreón NR, Mercado GC, Trujillo OME, Chávez RS. Coexistencia serológica de los subtipos H1N1 y H3N2 del virus de influenza porcina en diferentes zonas de México. *Memorias de XL Congreso Nacional de 2005 julio 25-29; León (Guanajuato) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2005: 197.*
43. Palacios JM. Epidemiología de la influenza porcina. *Acontecer Porcino*. 2009, 96 junio-agosto: 12-14.

44. Rosales F, García RA, Espejo R, Mercado GC, Aguilera A, Intervet México S.A de C.V., Rancho Covadonga., Estimulo de anticuerpos de 2 vacunas comerciales (H1N1 + H3N2) y uso de 2 sistemas de vacunación en primo vacunación de cerdas de reemplazo. Influenza porcina;
45. Rosales F, Vargas A, Mendoza S, Mercado C, Magallón L, Aguilera A, Aguilar F, Martens M. Inmunogenicidad al subtipo H1N1 del virus de la influenza porcina después de la vacunación bivalente (inactivada) y el papel de los anticuerpos maternos a 3 edades de vacunación.
46. Meritxell SG, Gred EMV, Jordi CIF. Actualización sobre influenza porcina. In Suis – N° 72, Nov. 2010.
47. Mercado GC. Método de prueba, área de virología, aislamiento viral influenza porcina (IP) en embrión de pollo. 1ª edición. Departamento de Producción Animal: cerdos. 2007.
48. González D.D., desinfección de semillas de alfalfa con luz ultra violeta de onda corta (tesis profesional). Cholula, Puebla. México: Universidad de Las Américas, Puebla. 13 -01 -2006.
49. Herradora L. MA, metodología diagnóstica en cerdos, capítulo 5. Disponible en el sitio: <http://fmvzenlinea.fmvz.unam.mx/course/search.php?search=Metodolog%C3%ADa+diagn%C3%B3stica+en+cerdos>
50. Coll MT, Morillo AA. Extracción de sangre en cerdas, cerdos de cebo y lechones en maternidad, técnicas clínicas. Disponible en el sitio: www.ivis.org

51. Mercado GC. Método de Prueba: Inhibición de la Hemoaglutinación: Influenza porcina (IP). 2a ed. 5 pag. Depto. de Med. y Zoot de Cerdos, FMVZ, UNAM. 2012.
52. Riaño Cruz V. identificación de variación antigénica del Rubulavirus porcino mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación. (tesis de licenciatura). México (DF), México: Universidad Nacional Autónoma de México. 2011.
53. Archetti I, Horsfall FL. Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. J. of Exp. Med. 92, 441 – 462, 1950.
54. Avalos Guzmán P. Identificación de variantes del virus de la influenza porcina en México con la técnica de RT – PCR RFLPS. (tesis de maestría). México: FMVZ. UNAM. 2012.
55. Gutiérrez REJ, Gough R, Zapata VDM. Caracterización antigénica de un virus de la bronquitis infecciosa, aislado en pollos de traspatio en Yucatán, México. Vet. Mex. 1998: 29(4).
56. Savy LV, Baumesiter GE, Ponteiro VA. Estudio antigénico de influenza A (H3N2) circulantes en la Argentina y su relación con las cepas vacúnales. Medicina, Vol. 59 – N° 3, 1999; 59:225-230.
57. Sánchez BJI. Evaluación de las afecciones reproductivas y caracterización del Rubulavirus porcino (tesis de maestría). México: FMVZ. UNAM. 2004.
58. Galazka AM, Robertson SE, Kraighner A. Mumps and mumps vaccine: a global review. Bull. World Health org. 1999; 77: 3-14.

59.Santos - Lopez G, Cruz C, Pazos N, Vallejo V, Reyes-Leyva S, Tapia
Ramírez J. Two clones obtained from urabe AM9 mumps virus vaccine
differ in their replicate efficiency in neuroblastoma cells. *Microb. Inf.* 2006;
8:332.339.