UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ANÁLISIS SEROLÓGICO RETROSPECTIVO DEL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA SUBTIPO H1N2 EN LOS ÚLTIMOS SEIS AÑOS (2010-2015) EN LA REPÚBLICA MEXICANA

TESIS

Que para obtener el título de
Médica Veterinaria Zootecnista

Presenta

Carmen Adriana Gaitán Peredo

Asesores

Dr. José Iván Sánchez Betancourt

MC. María del Carmen Mercado García

Ciudad Universitaria, CDMX 2016

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

DEDICATORIA

A la vida misma por ponerme en este camino para la realización y culminación de este proyecto.

A mis padres, hermanos y a Sara por la paciencia, apoyo y cariño que me han brindado no sólo en la elaboración de la tesis, sino a lo largo de toda mi vida.

Y no podía dejar de dedicársela a Ruffles, mi gran compañero por sacarme una sonrisa en momentos de estrés y angustia.

AGRADECIMIENTOS

A todo el personal del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos de la UNAM, en especial a:

Mis asesores, al Dr. Iván por hacerse el tiempo para leer, resolver y aclarar mis dudas, a pesar de su apretada agenda. A la Dra. Carmen por sus consejos, regaños y enseñanzas las cuales me han permitido ser un mejor profesionista y persona. A la Dra. Esperanza por su ayuda para el cuidado y sangrado de los conejos, así como por brindarme palabras de aliento cuando las cosas no iban del todo bien. Al Sr. Inocente por enseñarme el movimiento dentro del laboratorio, por siempre tener palabras de ánimo, y por sus bromas que hacen que el tiempo pase muy rápido y no se sienta el cansancio.

A Rebe, Majo, Manuel y Lupita por su ayuda en todo momento y por siempre darme consejos tanto en lo profesional como en lo personal.

A mis amigos Arturo y Priscila por presionarme para acabar la tesis, preguntar por mis avances y por los buenos momentos.

A mis amigas de toda la vida Cori y Ligia por estar en la buenas, en las malas y en la mejores como lo es la culminación de este proyecto.

A todos ustedes muchas gracias, estaré por siempre agradecida y aunque la vida nos lleve por caminos diferentes los recordaré y agradeceré por siempre.

CONTENIDO

RESUMEN 1
INTRODUCCIÓN 2
Antecedentes de la enfermedad 2
Importancia económica 3
Agente etiológico 4
Estructura 6
Organización genómica del virus de influenza tipo A 8
Cambio antigénico y deriva antigénica 10
Replicación celular 11
Patogenia 13
Respuesta inmune 13
Signos clínicos y transmisión 14
Lesiones 15
Diagnóstico 16
Reportes de influenza porcina en la República Mexicana 23
JUSTIFICACIÓN 24
HIPÓTESIS 24
OBJETIVO GENERAL 24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS 25
MATERIAL Y MÉTODOS 26
Determinación del número de sueros 26
Replicación viral 27
Titulación viral 28
Inhibición de la hemoaglutinación (IH) 29
Sueros hiperinmunes 30

IH homóloga 31
IH heteróloga (Estudio de desafío cruzado)..... 32
Porcentajes de protección cruzada..... 32
Análisis de la Información 33
RESULTADOS 34
DISCUSIÓN 46
CONCLUSIONES 50
REFERENCIAS..... 51

Índice de gráficos, tablas y figuras

Figuras

Figura 1. Transmisión interespecies de influenza……..... 3
Figura 2. Microscopía electrónica de virus de influenza……. 4
Figura 3. Esquema del virus de influenza tipo A…….. 5
Figura 4. Estructura interna del virus de influenza tipo A……. 8
Figura 5. Cambio y deriva antigénica……. 11
Figura 6. Replicación celular del virus de influenza tipo A…… 12
Figura 7. Pasos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa…….. 19
Figura 8. Prueba de inhibición de la hemoaglutinación…… 20
Figura 9. Prueba de ELISA indirecta y competitiva……. 22

Tablas

Tabla 1**.** Principales funciones de los segmentos genómicos que conforman el virus de influenza tipo A ……..……..9

Tabla 2. Total de muestras por año 26
Tabla 3. Promedio y rango de títulos de anticuerpos obtenidos de la prueba de IH 34
Tabla 4.Resultados positivos y dobles positivos de la prueba de IH para los subtipos H1N1 y H1N2 del año 2010 35

Tabla 5.Resultados positivos y dobles positivos de la prueba de IH para los subtipos 36
Tabla 6.Resultados positivos y dobles positivos de la prueba de IH para los subtipos H1N1 y H1N2 del año 2012 37
Tabla 7.Resultados positivos y dobles positivos de la prueba de IH para los subtipos H1N1 y H1N2 del año 2013 39
Tabla 8.Resultados positivos y dobles positivos de la prueba de IH para los subtipos H1N1 y H1N2 del año 2014 41
Tabla 9.Resultados positivos y dobles positivos de la prueba de IH para los subtipos H1N1 y H1N2 del año 2015 42
Tabla 10.Resumen por año de muestras positivas para H1N1 y dobles positivas 43
Tabla 11.Resultados de la prueba de IH homóloga y heteróloga 45
Tabla 12.Resultados variación antigénica 45
Tabla 13.Diferencias en los aminoácidos del gen H de los subtipos trabajados ... 49

Gráficas

Gráfica 1. Resultados dobles positivos de la prueba de IH para el año 2010 35
Gráfica 2.Resultados dobles positivos de la prueba de IH para el año 2011 37
Gráfica 3.Resultados dobles positivos de la prueba de IH para el año 2012 38
Gráfica 4.Resultados dobles positivos de la prueba de IH para el año 2013 40
Gráfica 5. Resultados dobles positivos de la prueba de IH para el año 2014 41
Gráfica 6. Resultados dobles positivos de la prueba de IH para el año 2015 42
Gráfica 7.Resultados por año de las muestras positivas para H1N2 y dobles positivas 43

RESUMEN

GAITÁN PEREDO CARMEN ADRIANA. Análisis Serológico retrospectivo del virus de influenza porcina subtipo H1N2 en los últimos seis años (2010-2015) en la República Mexicana. Bajo la dirección de: Dr. José Iván Sánchez Betancourt y MC. María del Carmen Mercado García.

La influenza porcina es una enfermedad de distribución mundial, tendiendo una baja mortalidad pero una alta morbilidad de hasta 100%. En México en el año 2012 se reportó la presencia de un nuevo subtipo de influenza en cerdos, el H1N2. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de este subtipo en desde el año 2010 hasta 2015 en muestras del banco de sueros del DMZC, mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación considerando un resultado positivo a partir de un título de 1:80; así como conocer la variación antigénica entre el subtipo H1N2 aislado en el DMZC y H1N1 con genes porcinos. Se obtuvieron los antisueros específicos elaborados en conejo hacia cada uno de los virus para utilizar la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación con la finalidad de evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo homóloga y heteróloga de cada subtipo viral. Los resultados de los sueros de cerdo analizados indican que al menos desde el año 2010 existe evidencia serológica de la circulación del subtipo H1N2, ya que se encontraron 12 muestras para ambos subtipos el año 2010, siete para el año 2011, cinco para el año 2012, 17 para el 2013, tres para el 2014 y 16 para el 2015. Se descartaron los falsos positivos ya que los resultado de variación antigénica, (0.0833), indican que no están antigénicamente.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes de la enfermedad

El virus de influenza porcina se detecta por primera vez en 1918, en el estado de Illinois, Estados Unidos, en donde se presentó una epizootia con signos clínicos y lesiones patológicas similares a la enfermedad de influenza en humanos mejor conocida como “Gripe Española", la cual fue responsable de 30 millones de muertos en todo el mundo. (Karasin et al., 2002; Rodríguez, 1996). Sin embargo, no fue no sino hasta 1930 cuando el virus de influenza fue aislado en cerdos por el doctor Richard Shope, quien demostró que la enfermedad es causada por un virus y no por la bacteria llamada *Bacillus influenzae* como lo aseguraba el doctor Richard Pfeiffer en 1892 (Heather, 2006).

Existe otra hipótesis la cual afirmaba que se trataba de un virus de origen aviar que mutó y logró ser transmitido a los cerdos (Hinshaw, Webster; 1982) (Figura1). Los virus de influenza, en especial el tipo A, son capaces de infectar a una gran variedad de animales como son: humanos, cerdos, caballos, mamíferos acuáticos y aves. Estudios filogenéticos han demostrado que las aves acuáticas son la fuente de los virus de influenza en otras especies (Webster et al., 1982).

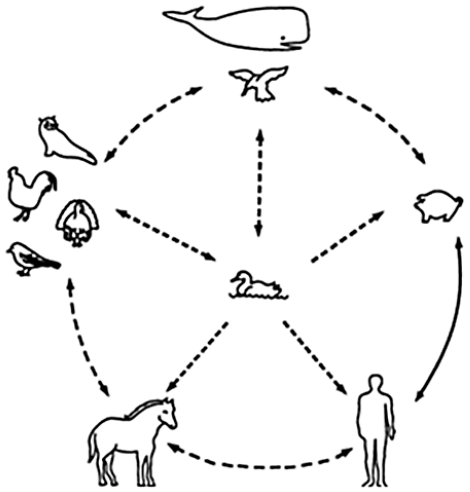


Figura 1. Transmisión interespecies de influenza

Fuente: Webster, et al, 1992

Debido a esta capacidad de infectar a diferentes especies la influenza ha despertado el interés a nivel mundial, y es hasta 2005 que la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), de manera conjunta con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) crean un organismo llamado OFFLU (**O**IE **F**AO In**flu**enza), el cual es el encargado de vigilar y controlar las infecciones causadas por la influenza; una enfermedad de distribución mundial (OFFLU 2015).

Importancia económica

La sinergia entre el virus de influenza porcina y otros agentes oportunistas como son: PRRS (Síndrome respiratorio y reproductivo porcino), *Mycoplasma hyponeumoniae, Pasteurella multocida, Haemophilus parasuis, Streptococcus suis y Bordetella bronchiseptica* (Álvarez, 2004), tiene efectos negativos en algunos parámetros productivos como son la ganancia de peso diaria, la conversión

alimenticia y la tasa de crecimiento. Ejemplo de lo anterior es la disminución de 41.1g diarios en la ganancia de peso, lo cual provoca que los animales tarden 16 días más en salir al mercado (Sánchez, 2010).

Por estas razones es de vital importancia invertir en medidas de bioseguridad y medicación preventiva para evitar la rápida propagación del virus.

Actualmente no existen reportes de las pérdidas económicas ocasionadas por el virus de la Influenza Porcina en México.

Agente etiológico

La influenza porcina es una enfermedad de origen viral, de baja mortalidad pero de alta morbilidad que, en algunos casos, puede alcanzar tasas de hasta el 100%. Esta enfermedad es causada por un virus RNA de la familia Orthomyxoviridae del género Influenzavirus que se clasifica en tres tipos A, B, C (Córdoba, Valdespin; 2010 ; Plonait, Bickhardtt; 2001; Straw et al. , 2002) (Figura 2) .

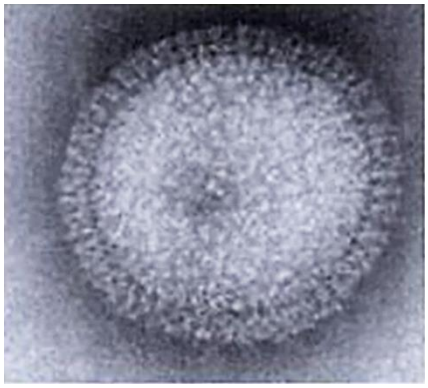


Figura 2. Microscopía electrónica del virus de influenza
Fuente: Córdoba, Valdespin 2010

Los virus de Influenza tipo A son capaces de infectar a una gran variedad de aves y mamíferos, incluyendo cerdos y humanos. Este tipo de virus se subdivide en subtipos con base a las glicoproteínas presentes en la superficie viral llamadas Hemaglutinina (H) y Neuraminidasa (N) que son los principales determinantes de patogenicidad de los virus de influenza (Córdoba, Valdespin; 2010; Gamblin, Skehel; 2010) (Figura 3).

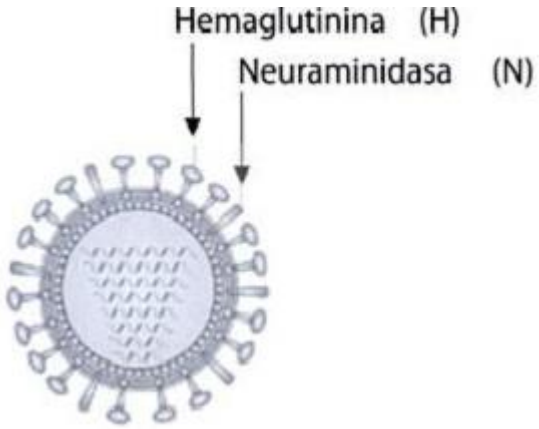


Figura 3. Esquema del virus de influenza tipo A
Fuente: Córdoba , Valdespin 2010

Existen 16 subtipos diferentes de H y 9 de N, que a su vez se subdividen en grupos por la similitud entre sus secuencias de aminoácidos (Gamblin, Skehel; 2010; Medina, García-Sastre; 2011).

Hemaglutinina

- Grupo 1: H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H13, H16.
- Grupo 2: H3, H4, H7, H10, H14, H15.

Neuraminidasa

- Grupo 1: N1, N4, N5 y N8.
- Grupo 2: N2, N3, N6, N7, y N9.

Debido a esta gran diversidad existe un sistema de nomenclatura establecido para cada subtipo aislado:

Tipo / Especie / Origen / Localización Geográfica / Identificación de Laboratorio / Año de Aislamiento/ (H y N) (Rivera, 2000; Straw et al., 2002).

La clasificación de los virus de Influenza tipo B y C se realiza únicamente por cepas (Córdoba, Valdespin; 2010; Neumann et al., 2009).

Los virus de tipo B infectan principalmente a los humanos y tienen un bajo potencial pandémico (Córdoba, Valdespin; 2010; Neumann et al., 2009).

Los virus de influenza tipo C son capaces de provocar enfermedades respiratorias pero su presentación es menor y no son capaces de infectar a los cerdos (Córdoba, Valdespin; 2010).

Estructura

La estructura viral es pleomórfica de un diámetro aproximado de 100nm; es un virus envuelto con glicoproteínas de aproximadamente 300nm que normalmente se proyectan partir de la superficie. Éstas son los antígenos principales de superficie (Plonait, Bickhardtt; 2001; Straw et al., 2002; Zimmerman et al., 2012) y son de dos tipos:

- Hemaglutinina (H)
- Neuraminidasa (N)

La Hemaglutinina es la responsable de la unión del virus a las células y es capaz de producir aglutinación en los glóbulos rojos, de ahí su nombre (Medina, García-Sastre; 2011).

La Neuraminidasa es la responsable de la elución enzimática del virus de los eritrocitos y juega un papel importante en la liberación del virus en las células infectadas.

Estás glicoproteínas se encuentran incluidas en una envoltura lipídica que rodea el centro de la partícula viral. Las moléculas de proteína de matriz (M) cubren la cara interna de la envoltura lipídica (Medina, García-Sastre; 2011).

El genoma viral es de RNA de cadena sencilla en sentido negativo, el cual es el molde a partir del cual se sintetiza el RNA mensajero viral. Los virus de influenza A y B poseen 8 segmentos y los virus de tipo C tan solo 7. Cada segmento del RNA está asociado a varias nucleoproteínas que impiden la formación de estructuras secundarias y a una RNA polimerasa por sus extremos 5’ y 3´ (Gramer, 2005; Neumann et al., 2009) (Figura 4).

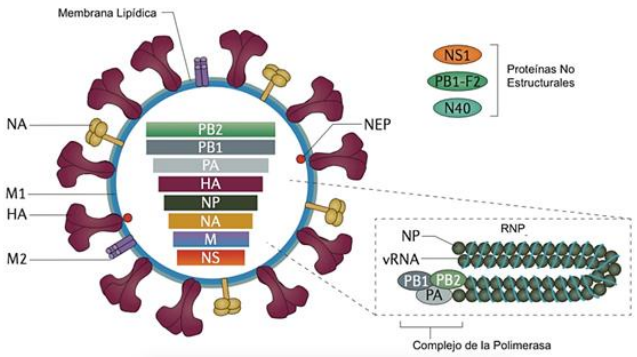


Figura 4. Estructura interna del virus influenza tipo A
Fuente: Modificado Mediana, García-Satre; 2011

Organización genómica del virus de influenza tipo A

Los ocho segmentos de RNA del virus de influenza tipo A codifican para 12 proteínas víricas (Carrera et al., 2014; Nelson, Holmes; 2007). En la tabla 1 se mencionan las funciones principales de cada segmento genómico.

Tabla 1. Principales funciones de los segmentos genómicos que conforman el virus de influenza tipo A (Carrera et al., 2014; Webster et al., 1992)

Número de Segmento Genómico	Nombre de la Proteína codificada	Función
1	Polimerasa Básica 2 (PB2)	Parte del Complejo Proteínico Viral. Participa en la replicación viral.
2	Polimerasa Básica 1 (PB1)	Parte del Complejo Proteínico Viral. Participa en la apoptosis y en la elongación del RNA viral que migró al núcleo.
	PB1-F2	Participa en la apoptosis, se cree que es una proteína pro-apoptótica
	N40	
3	Polimerasa Ácida	Participa en el complejo proteínico viral. Proteína interna de replicación viral. Se sospecha su participación como una proteína desenrolladora de hélice.
4	Hemaglutinina (H)	Unión del virus a los receptores celulares. Participa en el apoptosis.
5	Nucleoproteína (NP)	Tipo estructural. Es transportada al núcleo de la célula infectada donde se une y encapsida al RNA viral.
6	Neuraminidasa (N)	Rompe el ácido siálico. Facilita la liberación del virus.
7	Matriz 1 (M1)	Participa en el ensamblaje y unión del virus.
	Canal de iones Matriz 2 (M2)	Forma el canal iónico, controla el pH intracelular.
8	No estructural 1 (NS1)	Regulador del empalme del RNAm y participa en la traducción.
	No estructural 2 (NS2)	Funciona como transportador de las ribonucleoproteínas. Exporta el RNA viral del núcleo.

Cambio antigénico y deriva antigénica

Los virus de influenza son antigénicamente muy variables, esto en gran parte se debe a la presencia de un genoma segmentado. Existen dos mecanismos principales que determinan esta variabilidad: el reordenamiento antigénico (SHIFT) y la deriva antigénica (DRIFT) (Schmuke, García-Sastre; 2010; Van Reeth et al., 2012).

El “shift” ocurre cuando existe una redistribución de segmentos del genoma viral de dos cepas virales cuando se presenta una doble infección a una sola célula huésped. Esto conduce a un cambio a nivel de las proteínas principalmente en la superficie viral y esto puede conducir a la generación de un virus de tipo pandémico (Brown, 2000; Stine et al., 2002; Vana, Westover; 2008).

El “drift” se da por mutaciones puntuales e individuales en la substitución de aminoácidos de las proteínas de la envoltura viral H y N y en genes internos. Los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden alterar los sitios antigénicos sobre la molécula, haciendo posible que el virón escape al reconocimiento por el sistema inmune del huésped. De este modo son generados los virus de tipo estacional (Brown, 2000; Stine et al., 2002).

Estos son los dos principales mecanismos responsables de la alta variabilidad genética, que ha permitido la adaptación evolutiva de los virus de influenza a través de los años (Schumulke, García-Sastre; 2010) (Figura 5).

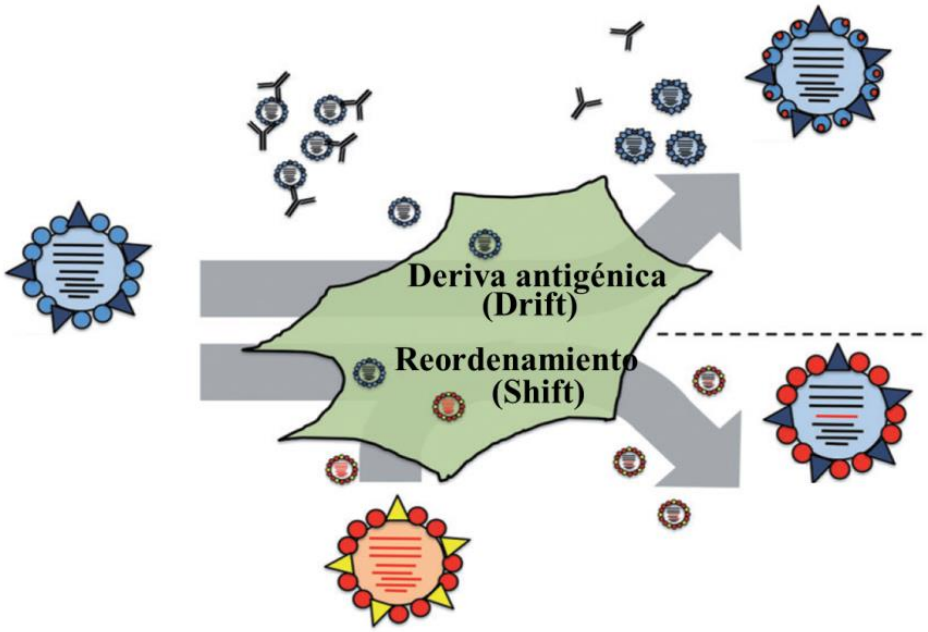


Figura 5. Cambio y deriva antigénica
Fuente: Modificado de Schmolke, García-Sastre; 2010

Replicación celular

Las hemoalgutininas del virus de influenza se unen a receptores específicos presentes en la membrana celular del huésped; estos receptores son el N-acetilnuramínico α 2,3 galactosa para las aves, el ácido N-acetilnuramínico α 2,6 galactosa para el ser humano y ambos para el cerdo.

Una vez que las hemoaglutininas se unen con alto grado de especificidad a los receptores de la membrana comienza el proceso de endocitosis; la cual se lleva a cabo por medio de cavidades denominadas endosomas teniendo como característica un pH ácido cercano a cinco. La acidificación del endosoma va a permitir la apertura de los canales iónicos activos asociados a la proteína M2 para permitir la liberación de las ribonucleoproteínas (RNP). Las RNP liberadas en el citoplasma se dirigen al núcleo celular para iniciar la transcripción del ácido

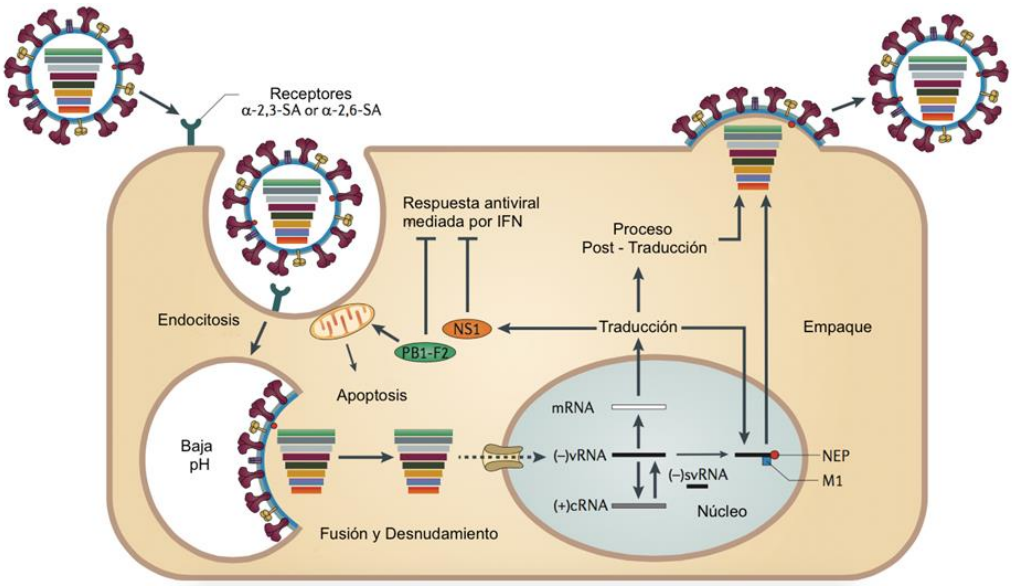
ribonucleico mensajero (RNAm); terminado este proceso el mRNA viaja al citoplasma llevando información genética para la síntesis del NP y M1.

La síntesis de proteínas virales externas se lleva a cabo en el retículo endoplásmico rugoso y es empaquetado en el Aparto de Golgi, para ser expulsado por una sola vesícula hacia la superficie de la célula infectada.

En el núcleo el genoma viral negativo produce copias de sí mismo pero en sentido positivo, después se une a las NP´s y M1 para formar segmentos individuales que dan origen a la nucelocápside. A partir de este momento la partícula viral puede tomar forma; la membrana celular ya tiene antígenos de superficie y la partícula viral recién formada ya podrá adquirirlos y ser expulsada finalmente por medio de gemación (Medina, García-Sastre; 2011) (Figura 6).

Figura 6. Replicación celular del virus de influenza tipo A

Fuente: Medina, García-Sastre; 2011



Patogenia

La patogénesis del virus de influenza porcina ocurre de una forma muy similar a la ocurrida en humanos. La replicación celular está limitada a las células epiteliales del tracto respiratorio. Los virus de influenza porcina tienen una clara predilección por el tracto respiratorio bajo, pero el virus puede ser aislado de tonsilas, linfondos e hisopados de la orofaringe (Straw et al., 2002; Zimmerman et al., 2012).

En la mayoría de los estudios experimentales los virus de influenza porcina pueden ser detectados desde un día postinoculación y pasar inadvertidos hasta los 7 días. La producción de citocinas por parte del cerdo infectado en la fase aguda de la enfermedad ha demostrado tener un papel fundamental en diferenciar si la infección será clínica o subclínica (Majno, Joris; 2004; Plonait, Bickhardatt; 2001; Straw et al., 2002).

Respuesta inmune

La interacción del virus con el sistema inmune comienza con la fusión de las membranas.

El sistema inmune innato es la primera defensa que el virus activa cuando se encuentra dentro del huésped, cuando este se inicia se secretan citosinas, quimosinas como parte de la respuesta inmune inflamatoria, las cuales van a atraer a los neutrófilos al sitio de infección (López et al., 2004; Epstein et al., 1993).

El interferón de tipo I es la citosina que representa el mecanismo del sistema inmune innato más efectivo contra la propagación y replicación del virus. La

secreción de dicho interferón va a inducir la activación de las células dendríticas iniciando así la respuesta inmune adaptativa (Epstein et al., 1993).

El control de la infección mediada por anticuerpos puede llevarse a cabo por los anticuerpos neutralizantes los cuales van dirigidos a la Hemoaglutinina, lo que va provocar que no exista una unión de la célula hospedera con el virus y/o la formación del endosoma; para esto, los anticuerpos deben unirse a los determinantes antigénicos alrededor del sitio de unión de la HA. La actividad de estos anticuerpos suele medirse mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (Pérez, 2009).

Signos clínicos y transmisión

Los brotes de influenza son caracterizados típicamente por fiebre muy alta (40.5-41.5°C), anorexia, postración, los animales se amontonan, taquipnea, respiración abdominal y disnea (Plonait, Bickhardtt; 2001; Straw et al., 2002; Zimmerman et al., 2012).

Esta enfermedad tiene un periodo de incubación de 1-3 días. Es de alta morbilidad, de hasta 100%, pero baja mortalidad usualmente de menos del 1% en infecciones sin complicaciones (Van Reeth et al., 2006).

Además del estado del sistema inmune existen otros factores que determinan el desarrollo clínico de la enfermedad como son: edad, condiciones climáticas, así como de las infecciones en curso. Infecciones secundarias con bacterias como: *Actinobacillus pleuropneumoniae, Pasteurella multocida, Mycoplasma hyopneumoniae, Haemophilus parasuis, Streptococcus tipo 2* pueden agudizar

tanto la severidad como el tiempo de la enfermedad (Carrera et al., 2014; Rodríguez et al., 1996; Sánchez et al., 2010; Straw et al., 2002).

Productores y veterinarios han reportado que después de un brote de influenza dentro de la piara se ven afectados los siguientes parámetros: aumento en la infertilidad, abortos, mortinatos, camadas pequeñas y débiles (Carrera et al., 2014; Rodríguez et al., 1996; Sánchez et al., 2010; Straw et al., 2002).

La transmisión de este virus puede ser por vía:

- Directa: Por medio de aerosoles o contacto directo entre animales portadores, o en granjas con una alta densidad de población.
- Indirecta: Por medio de fómites entre granja y granja (Plonait, Bickhardtt; 2001; Straw et al., 2002; Zimmerman et al., 2012).

Lesiones

Las lesiones macroscópicas de la infección viral pura consisten en congestión traqueal y bronquial, así como en una bronquitis catarral, que puede llegar a producir colapso pulmonar, estas zonas se encuentran en la porción craneoventral pulmonar (Trigo, 1998).

La infección viral causa necrosis de células epiteliales bronquiales y alveolares, lo cual se complica con la llegada de neutrófilos y edema que producen bronquitis.

Cuando la infección termina, el epitelio bronquioalveolar se regenera con facilidad. A menudo las lesiones son enmascaradas por una neumonía exudativa grave, debido a una infección bacteriana secundaria (Trigo, 1998).

Durante la necropsia se puede observar hiperemia en la mucosa de la faringe y la laringe; bronquios y bronquiolos con exudado y dilatados; tejido pulmonar rojo e irregular con áreas de edema. Histológicamente se observa degeneración y necrosis en el epitelio de bronquios y bronquiolos. Sin embargo, el virus de influenza porcina no presenta una lesión patognomónica, por lo cual es necesario aislar el virus o demostrar la presencia de anticuerpos específicos (Rodríguez et al., 1996; Trigo, 1998). El virus de influenza porcina es capaz de atravesar la barrera transplacentaria, provocando deficiente desarrollo pulmonar en el feto y en algunos casos abortos (Rodríguez et al., 1996).

Diagnóstico

El diagnóstico de influenza porcina puede ser difícil de diferenciar de otro tipo de enfermedad de tipo respiratorio si solo nos basamos en signos clínicos. Así mismo, los signos clínicos generados por la enfermedad no se asocian a un subtipo en particular por lo que la subtipificación del virus debe determinarse con pruebas específicas dentro del laboratorio (González et al., 1990).

Dentro de dichas pruebas se encuentran:

- Aislamiento viral

El virus de influenza porcina puede ser aislado a partir de secreciones nasales y/o tejido pulmonar de animales que han sido sacrificados o han muerto en la fase aguda de la enfermedad (Morilla, 2005).

El aislamiento se puede realizar en cultivo celular en la línea Madin-Darvy Canine Kidney (MDCK) o en embriones de pollo libres de patógenos específicos (SPF) de 9 a 11 días de edad, inoculados por vía cavidad alantoidea, incubados a 35± 2 °C por 72 horas. El virus no mata generalmente a los embriones, después del tiempo de incubación se colecta el líquido alantoideo para evaluar su capacidad de aglutinar glóbulos rojos de ave, la cual es evidencia presuntiva de la presencia de virus de influenza. Para confirmar el subtipo se determina por medio de la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH) confrontando el antígeno aislado con sueros específicos para cada subtipo (Morilla, 2005).

- ELISA DE CAPTURA

La ELISA de captura de antígeno, la cual permite la detección de virus o antígenos virales en muestras clínicas utilizando dos anticuerpos específicos diferentes para capturar el virus presente en dicha muestra (Segalés et al., 2014).

- TÉCNICAS MOLECULARES

Se basan en la detección de un segmento específico de DNA o RNA en una muestra.

- Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). Se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia. Está prueba genera resultados cualitativos. El propósito de la PCR es copiar millones de veces una secuencia específica de un ADN blanco por una catálisis llevada a cabo por una enzima llamada ADN polimerasa de tal forma que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas de forma fiel. Si en lugar de utilizar como sustrato ADN de tipo genómico se

utiliza ADNc (ADN complementario), el cual proviene de un RNA se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription PCR). Debido a la transcriptasa reversa se lee como ADN complementario (ADNc), una vez obtenido el ADNc se realiza un PCR punto final de forma convencional. Esta conversión se logra mediante una reacción controlada por la transcriptasa reversa, la cual es una enzima capaz de convertir el RNA en una molécula de ADNc. Naturalmente los retrovirus lo utilizan para convertir su genoma de RNA en ADN y duplicarse en millones de partículas virales (Herschhorn, Hizi; 2010). En la PCR ocurren tres etapas:

A) Desnaturalización: Las cadenas de ADN o ADNc son calentadas y separadas a una temperatura aproximada de 95°C durante 20-30 segundos, estás variables van a depender de:
    a. La secuencia de los templados.
    b. La cantidad de G-C; ya que si es alta tardará más tiempo para romper los enlaces porque en este apareamiento está formado por 3 enlaces.

    Al término de esta etapa tendremos cadenas separadas que servirán como templado.

B) Hibridación.- Los primers se alinean al extremo 3´ del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria; se formará el complejo templado-primers. Para ello se tiene que utilizar la Tm (temperatura de hibridación o Melting temperatura) la cual oscila entre 50-60°C.

C) Extensión.- La Taq Polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y comienza su función catalítica agregando DNTP´s para crear las cadenas completas de ADN. La extensión se realiza en dirección 5´-3. La temperatura a la cual se lleva este paso es aproximadamente de 72°C.

Al final del ciclo se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número totales de pares de bases (Daum et al., 2002; Saiki et al., 1988; Tamay de Dios et al., 2013; Zanberg et al., 1999) (Figura 7).

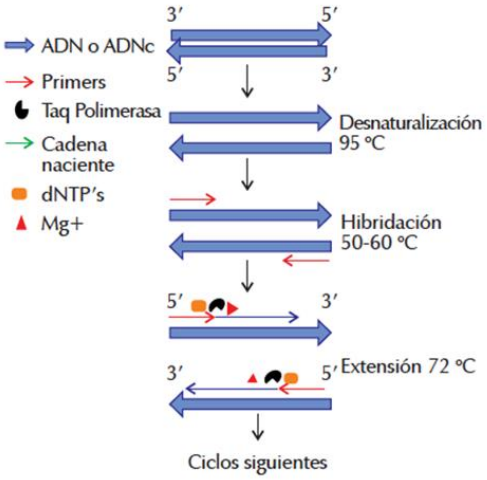


Figura 7. Pasos de un ciclo de PCR
Fuente: Tamay et al, 2013

Una variante del PCR es el PCR múltiple o multiplex el cual puede ser utilizado para la tipificación de subtipos, la cual permite la detección simultánea de genomas diferentes en una sola reacción mediante el empleo de dos o más pares de primers. Los primers deberán reaccionar a una temperatura de fusión (Tm) similar dentro de un rango de ±5°C (Daum et al., 2002; Zangenberg et al., 1999).

- Pruebas Serológicas
    - Inhibición de la Hemoaglutinación (IH). Es considerada una prueba estándar para la OIE, es altamente sensible, específica ya que únicamente reconoce a anticuerpos dirigidos para la hemaglutinina viral, se basa en la capacidad del virus para hemoaglutinar eritrocitos de ave, bovino o cuyo esto dependerá del virus de interés. (Terrestrial Animal…2015) (Figura 8).

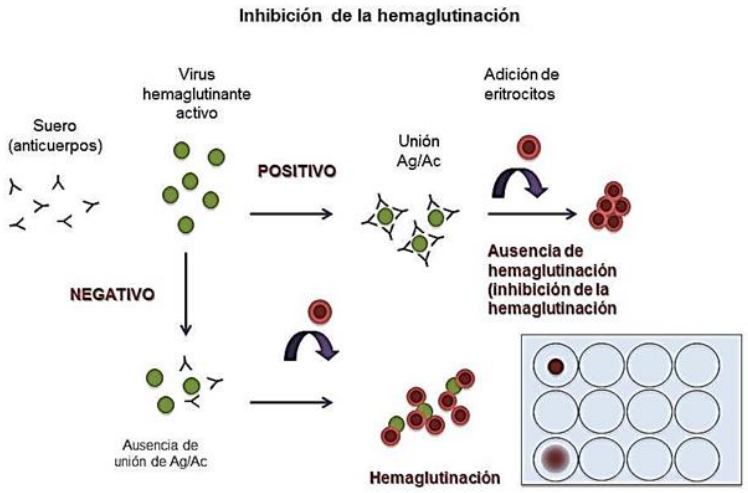


Figura 8. Prueba de inhibición de la hemaglutinación
Fuente: Segalés Martínez; 2014

Existen dos métodos para la realización de esta prueba:

- Método alfa: Se realizan diluciones decrecientes de virus y se enfrentan a cantidades constantes de suero.

- Método beta: Es el más comúnmente utilizado, se realizan diluciones decrecientes del suero y se enfrentan a cantidades constantes de virus (Del Castillo, Gómez; 2006).

- ELISA. Esta prueba se basa en la detección de anticuerpos específicos. El tipo de ELISA más común es la de tipo indirecta la cual se fija un antígeno conocido a una microplaca. Se añade suero y si los anticuerpos específicos frente al antígeno están presentes en el suero, reaccionarán con el antígeno y quedarán fijados a la microplaca. Posteriormente se añade un anticuerpo conjugado con una enzima frente a IgG o IgM de cerdo y se incorpora un sustrato para la enzima. Si el suero contiene anticuerpos específicos se observa una reacción de color; si no, los pocillos permanecen sin color. Los resultados se leen mediante un espectrofotómetro. Está técnica permite una semicuantificación de los anticuerpos si se incluye una control positivo con una cantidad conocida de anticuerpos. Las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro se pueden utilizar para calcular un coeficiente que va a indicar una positividad, nos ayudará a establecer un rango de muestras positivas y negativas. Otro tipo de ELISA utilizada es la de tipo competitivo en donde no es necesario tener conjugados específicos de especie; el inconveniente de esta prueba es que solo nos dirá si es positivo o negativo (Segalés, Martínez; 2014) (Figura 9).

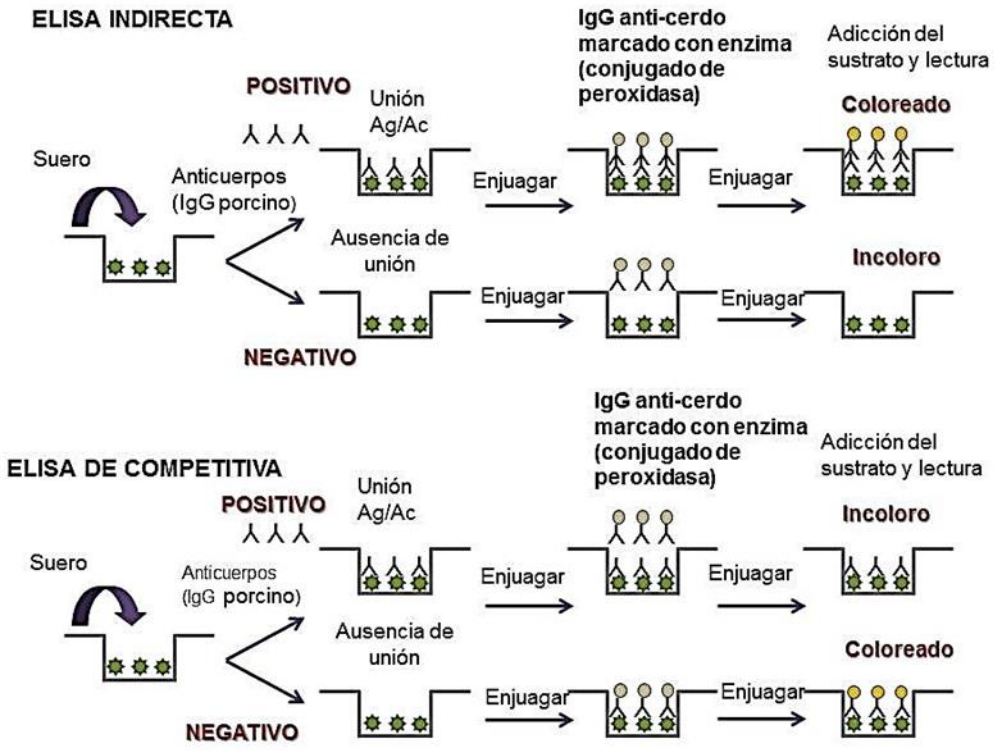


Figura 9. Prueba de ELISA indirecta y competitiva
Fuente: Segalés, Martínez; 2014

- INMUNOFLUORESENCIA INDIRECTA. Esta prueba se basa en una reacción antígeno-anticuerpo, que se revela con el uso de un anticuerpo anti-IgG del cerdo marcado con un fluorocromo. Esta técnica permite la titulación de los anticuerpos (Segalés, Martínez; 2014).

Reportes de influenza porcina en la República Mexicana

En México el aislamiento viral del subtipo H1N1 se realizó por primera vez en el año 1982 durante un brote en el Estado de Puebla (Ramírez, 1982), mientras que el subtipo H3N2 fue aislado años anteriores, en 1979.

Carreón NR y colaboradores realizaron un estudio con sueros recolectados entre los años 2003 y 2004 y se encontró que la seroprevalencia para la zona del Bajío de la República Mexicana para el subtipo H1N1 fue de 56% y para el subtipo H3N2 de 46% (Carreón, et al., 2005) .

Un estudio del año 2008 determinó la seroprevalencia del virus de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 en la región del Bajío del país, mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación, obteniendo los siguientes resultados: 81.32% de seroprevalencia para el subtipo H1N1, el estado donde se encontró una mayor seroprevalencia fue en Jalisco con 81.8%. Mientras que la seroprevalencia obtenida para el subtipo H3N2 para la misma región fue de 38.97% (Ávalos, 2008).

El subtipo H1N2 fue reportado en el año 2012, donde se encontró una seroprevalencia de 80.26% por medio de la técnica de IH (Lara, et al., 2012).

JUSTIFICACIÓN

El subtipo viral H1N2 ya ha sido reportado en EUA, Canadá y México. Sin embargo en la República Mexicana se sigue considerando como un virus exótico por esta razón la vacunación está prohibida, por lo que es de vital importancia demostrar que se encuentra circulando de forma activa en la población porcina mexicana.

HIPÓTESIS

La técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación demostrará la existencia de una seroprevalencia mayor al 50% del virus de influenza porcina subtipo H1N2 en la República Mexicana en los últimos cinco años.

OBJETIVO GENERAL

Identificar la presencia de anticuerpos hacia el subtipo H1N2 en sueros obtenidos del DMZC entre los años 2010-2015.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar, mediante la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación, la presencia de anticuerpos hacia el virus de Influenza Porcina H1N2 (A/swine/MexMich/DMZC/2014 (H1N2)).
2. Identificar la seroprevalencia del virus H1N2 (A/swine/MexMich/DMZC/2014 (H1N2)) en sueros provenientes de diferentes estados de la República Mexicana obtenidos del banco de sueros del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos de la Facultad de Medicina y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (DMZC-FMVZ-UNAM) de los últimos 6 años (2010-junio2015).
3. Determinar el valor de relación antigénica entre los subtipos H1N1 (A/swine/Mexico/EdoMex/52/2010(H1N1) y H1N2 (A/swine/MexMich/DMZC/2014 (H1N2)

MATERIAL Y MÉTODOS

Determinación del número de sueros

Para la determinación del número de muestras (sueros) que fueron utilizados en este estudio se hizo un conteo del número total de muestras ingresadas para el diagnóstico serológico de influenza porcina desde el año 2010 hasta junio del 2015.

El total de muestras contabilizadas fueron:

Tabla 2. Total de muestras por año.

Año	Número de Muestras
2010	345
2011	568
2012	1310
2013	1218
2014	1664
2015 (junio)	2946
Total muestras	**8051**

Al tener una variación tan grande entre los años, se decidió considerar al total de muestras como el universo de trabajo, es decir 8051 muestras en total. Para obtener un número de muestras representativas se hizo la siguiente fórmula (ASTM International 2014):

$$\sqrt{n} + 1 = número\ de\ muestras$$

Dónde:

n= 8051

Resultando así:

$$\sqrt{8051} + 1 = 90.72\ muestras$$

Resultando 90.72 muestras por año, por lo que se redondeó el valor a 100 muestras por año.

Replicación viral

La replicación viral se hizo con el virus (A/swine/Mexico/EdoMex/52/2010 (H1N1) y el aislamiento realizado en el Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos en la UNAM A/swine/MexMich/DMZC/2014 (H1N2) en embriones de pollo (EP) libres de patógenos específicos (SPF) de entre 9 a 11 días de edad, cada embrión fue inoculado vía cavidad alantoidea con 200µL.

El procedimiento para la replicación viral en EP fue el siguiente:

1. Se revisó a la llegada la viabilidad de los EP se descartaron los muertos y débiles.
2. Con un lápiz se trazó una línea por encima de la cámara de aire.
3. Se desinfectó con alcohol al 70% y se perforaron.
4. Los embriones fueron inoculados a través del orificio con una jeringa de insulina con 200µL. Fueron inoculados 10 EP por cada subtipo viral.

5. Se cubrió el orificio con pegamento blanco y se dejaron incubar a 37±2°C por 72 horas.
6. Diariamente se revisaron los EP. Los muertos a las 24 horas fueron descartados por traumatismo.
7. Se colectó el líquido alantoideo de los embriones muertos a las 48 horas así como los que sobrevivieron a las 72 horas, de la siguiente manera:
    a. Se desinfectó con alcohol al 70% la cámara de aire y se cortó por la línea marcada previamente.
    b. Se colectó con puntas estériles el líquido alantoideo procurando obtener líquido cristalino y sin yema.
    c. Se depositó en tubos de vidrio estériles de manera individual.
    d. El fluido recolectado se centrifugó a 3500 rpm a 4°C durante 10 minutos.

Titulación viral

Los fluidos obtenidos fueron titulados por medio de la técnica de hemoaglutinación en microplaca, de la siguiente manera: Se colocaron 50µL de Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) a todos los pozos de una placa en fondo en “U”, se colocaron 50µL del virus en el pozo uno y se realizaron diluciones dobles seriadas desde 1:2 hasta 1:4096. Posteriormente se colocaron 50µL de eritrocitos de ave al 0.5% a toda la placa, la lectura se realizó hasta que el control de eritrocitos sedimentó. El título viral se ajustó a 8 Unidades Hemoalgutinates (UHA) para la realizar la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.

Inhibición de la hemoaglutinación (IH)

1. Tratamiento de los sueros

Una vez recolectadas todas las muestras fueron adsorbidas con caolín en tubos de vidrio estériles. Cada tubo fue identificado y se depositaron las siguientes cantidades:

- 100µL de suero
- 200µL de caolín
- 200µL de eritrocitos de ave al 5%

Quedando a una dilución de 1:5. Las muestras se dejaron en refrigeración a 4±2°C durante 24 horas para que tanto el caolín como los eritrocitos de ave sedimentaran.

Una vez transcurridas las 24 horas los sueros se centrifugaron a 1500rpm por 10 minutos y se realizó la prueba de IH con los sobrenadantes

2. Procedimiento
    1. Se utilizaron microplacas en fondo “U” de 96 pozos.
    2. En todos los pozos de la placa se colocaron 50µL de Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS).
    3. Se depositaron 50µL de cada uno de los sueros de la fila “1A” a la “1H”.
    4. Se realizaron diluciones dobles seriadas de la fila 1 a la 12 (desde 1:10 hasta 1:20480).

5. Se colocaron 50µL de antígeno de virus de influenza porcina con 8UHA de la fila 2 a la 12. A la fila 1 no se le agregó antígeno por ser el control de suero. Se dejó un control de virus (50µL de PBS + 50µL de antígeno H1N2 o H1N1).
6. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
7. Se adicionaron 50µL de eritrocitos de ave al 0.5% a toda la placa. Se consideró un control de eritrocitos (50µL de PBS + 50µL de eritrocitos de ave al 0.5%).
8. Se dejó a temperatura ambiente hasta que el control de eritrocitos sedimentó para poder realizar la lectura.

3. Lectura

El título de cada suero se dio en el último pozo donde se observó sedimentación. Se consideraron positivas las muestras con títulos mayores o iguales a 1:80 (Zimmerman et al., 2012; Sánchez et al., 2012), esta prueba se realizó para ambos subtipos H1N1 y H1N2.

Los títulos fueron transformados a logaritmo base 10 para su análisis estadístico.

Sueros hiperinmunes

Se obtuvieron 7 conejos libres de anticuerpos contra influenza. Antes de la inoculación se realizó un muestreo sanguíneo, a través de la vena marginal de la oreja, para asegurar que los animales fueran negativos a la presencia de anticuerpos en contra de los virus de influenza porcina subtipos H1N1 y H1N2.

Se dividieron en 3 grupos:

Grupo 1: Tres conejos inoculados con el subtipo H1N1.

Grupo 2: Tres conejos inoculados con el subtipo H1N2.

Grupo 3: Un conejo control negativo.

Bajo condiciones de esterilidad, dentro de la cabina de seguridad biológica, se preparó el inóculo de la siguiente manera; 1mL de hidróxido de aluminio previamente esterilizado y 1mL de virus H1N1 o H1N2 ajustado a 256UHA. En total se prepararon 4 dosis por virus. Los conejos fueron inoculados vía intramuscular con un intervalo de 8 días entre cada inoculación y alternando de lado para disminuir la incidencia de abscesos subcutáneos provocados por el hidróxido de aluminio. Se consideraron 2 sangrados, uno a los 15 días de la primera inoculación, para verificar que existiera la presencia de anticuerpos y la segunda ocho días después de la última inoculación. Este protocolo se realizó con la aprobación número 512 del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CIUAE-FMVZ/UNAM).

IH homóloga

La prueba se utilizó para detectar la presencia de anticuerpos específicos hacia cada aislamiento con su suero hiperinmune respectivo por medio de la prueba de IH. Las diferentes diluciones dobles de los sueros se pusieron en contacto con el virus en cantidades constantes (8 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 fueron dobles seriadas iniciando desde 1:10 hasta 1:20480 y se consideró un título positivo a partir de una dilución de 1:80. La lectura se realizó tomando el último pozo donde se observó sedimentación.

IH heteróloga (Estudio 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 8 UHA.

Después de 1 hora se realizó la lectura.

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 (VP) fueron calculados para cada uno de los aislamientos usando la ecuación de Archetti and Horsfall (1950) que se describe a continuación:

Los títulos fueron usados para establecer los valores de r1 y r2. r = valor de relación antigénica, en donde r1= título heterólogo #2 / titulo homólogo #1, y

r2 = título heterólogo / homólogo #2. Los porcentajes de protección antigénica (PPA) que tengan un valor de 0 serán 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 fue multiplicado por 100 para convertirlo en porcentaje.

r = valor de relación antigénica

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

r1 = título heterólogo #2 / titulo homólogo #1

r2 = título heterólogo #1 / titulo homólogo #2

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

Cuando el valor de relación antigénica (VRA) sea menor a 1 los aislamientos virales están no relacionados antigénicamente. Si el VRA es mayor a 1 los aislamientos virales están relacionados antigénicamente (variación antigénica) (Sánchez et al., 2012).

Análisis de la Información

Una vez obtenidos los títulos de cada uno de los sueros; se registró toda la información en una base de datos y se convirtió en logaritmo base 10 (log10) para su análisis estadístico. Con los datos obtenidos se realizaron cuadros y gráficas que permitieron identificar el número de muestras positivas para H1N1 y para H1N2 y las muestras que fueron positivas para ambos son mencionadas como muestras dobles positivas.

A los sueros hiperinmunes se les realizaron las pruebas de IH homóloga y heteróloga para poder determinar la relación antigénica entre ambos subtipos por medio de la ecuación de Archettii y Horsafall.

RESULTADOS

En la tabla 3 se observan los resultados obtenidos en la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación dirigida al virus A/swine/MexMich/DMZC/2014(H1N2) y A/swine/Mexico/EdoMex/52/2010 (H1N1) realizada a los sueros seleccionados.

Tabla 3. Promedio de títulos de anticuerpos obtenidos de la prueba de IH hacia los subtipos de IP H1N1 y H1N2 desde 2010 hasta 2015.

	H1N1		**H1N2**	
Año	**Promedio (media)**	**#positivos***	**Promedio (media)**	**#positivos***
2010	2.2071	87	1.2047	12
2011	2.7339	97	1.1143	7
2012	2.2284	86	1.1264	5
2013	2.3697	73	1.2468	18
2014	2.1469	84	1.0903	3
2015	1.9031	70	1.3341	16

*Se consideró un título positivo a partir de 1:80, los resultados fueron transformados a log base 10

Se observa que el año donde se tuvo un promedio mayor de títulos de anticuerpos contra el subtipo H1N1 fue en el año 2011 con 2.7399 (log10) y 97 de las 100 muestras trabajadas fueron positivas, no obstante para el subtipo H1N2 la media observada en los años trabajados fue muy similar teniendo como nivel más alto el año 2015 con 1.3341 (log10) y el año con mayor número de muestras positivas fue 2013.

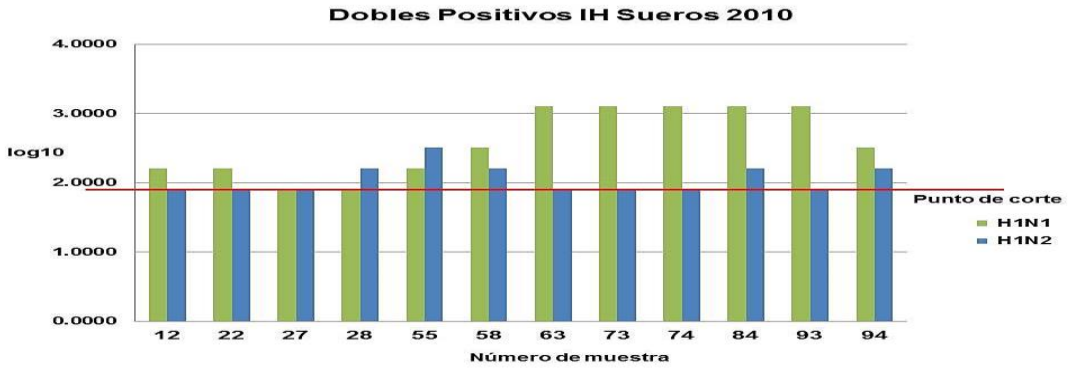
En la tabla 4 se presentan los resultados de los sueros que fueron positivos en el año 2010, donde se observa un 87% de muestras positivas para el subtipo H1N1 mientras que para el subtipo H1N2 fue de 12%, mismo porcentaje para las muestras que resultaron positivas para ambos subtipos. En la gráfica 1 se observa únicamente las muestras que fueron dobles positivas, considerando un punto de

corte en 1.9030 (1:80), expresando como log10, además se observa que los títulos más altos fueron para el subtipo H1N1.

Tabla 4. Resultados de los sueros positivos y dobles positivos de la prueba de IH para los subtipos H1N1 y H1N2 del año 2010.

Año	Núm. Total de Muestras	H1N1	H1N2	Dobles		
		%Positivos	%Positivos	H1N1	H1N2	% Total Dobles Positivos
2010	100	87	12	2.2040	1.9030	12
				2.2040	1.9030	
				1.9030	1.9030	
				1.9030	2.2040	
				2.2040	2.5050	
				2.5050	2.2040	
				3.1070	1.9030	
				3.1070	1.9030	
				3.1070	1.9030	
				3.1070	2.2040	
				3.1070	1.9030	
				2.5050	2.2040	
			Promedio	2.5802	2.0535	
			Desviación estándar	0.4991	0.2029	

Gráfica 1. Resultados de los sueros dobles positivos de la prueba de IH para el año 2010.



Para el año 2011 se obtuvo 97% de muestras positivas para H1N1, 7% para H1N2 y para las muestras que dieron positivas tanto para H1N1 como para H1N2 fue de 7%. En el caso de las muestras dobles positivas el título más alto para H1N1 fue de 2.8062 con dos muestras y para H1N2 de 3.1072.

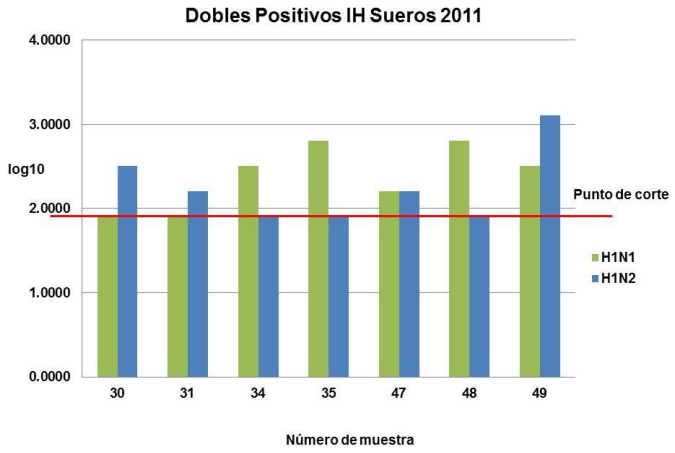
En la gráfica se observa que cuatro de siete muestras dobles positivos tiene un título mayor par H1N2 (Tabla 5 y Gráfica 2).

Tabla 5. Resultados de los sueros positivos y dobles positivos de la prueba de IH para los subtipos

H1N1 y H1N2 del año 2011

Año	**Núm. Total de Muestras**	**H1N1**	**H1N2**	**Dobles**		
		%Positivos	**%Positivos**	**H1N1**	**H1N2**	**% Total Dobles Positivos**
2011	100	97	7	1.9031	2.5051	7
				1.9031	2.2041	
				2.5051	1.9031	
				2.8062	1.9031	
				2.2041	2.2041	
				2.8062	1.9031	
				2.5051	3.1072	
			Promedio	2.3761	2.2471	
			Desviación estándar	0.3830	0.4407	

Gráfica 2. Resultados de los sueros dobles positivos de la prueba de IH para el año 2011.

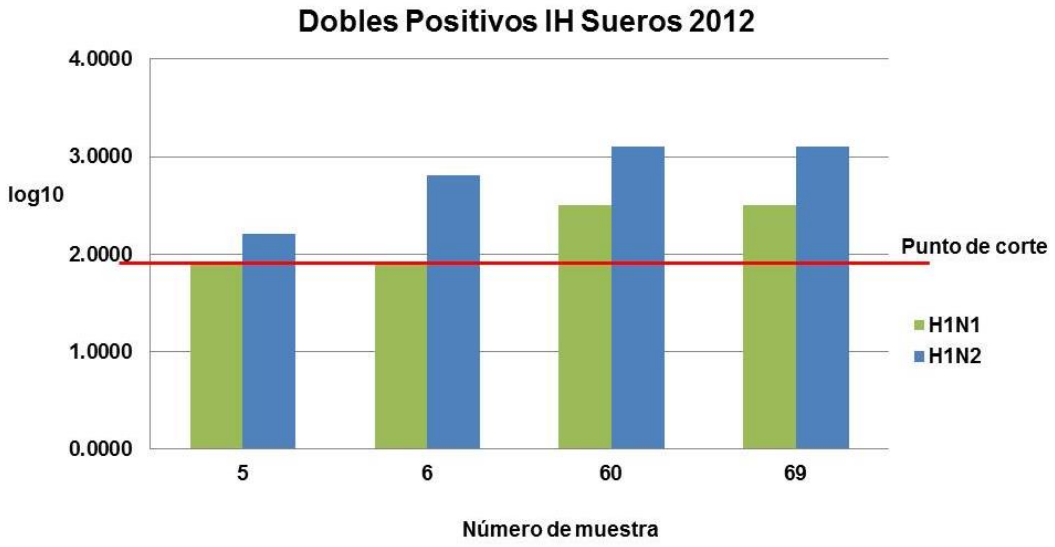


En el año 2012 se obtuvieron 86% de muestras positivas para el subtipo H1N1, para el subtipo H1N2 se obtuvo el 5% y para las muestras que son dobles positivas se obtuvo un 4%; es decir qué, existe en este año una muestra que es solo positiva a H1N2 pero negativa para H1N1. En este año se observa que para todas las muestras dobles positivas el título para el subtipo H1N2 es superior con respecto a H1N1 (Tabla 6, Gráfica 3).

Tabla 6. Resultados de los sueros positivos y dobles positivos de la prueba de IH para los subtipos H1N1 y H1N2 del año 2012.

Año	Núm. Total de Muestras	H1N1	H1N2	Dobles		
		%Positivos	%Positivos	H1N1	H1N2	% Total Dobles Positivos
2012	100	86	5	1.9031	2.2041	4
				1.9031	2.8062	
				2.5051	3.1072	
				2.5051	3.1072	
			Promedio	2.2041	2.8062	
			Desviación estándar	0.3476	0.4257	

Gráfica 3. Resultados de los sueros dobles positivos de la prueba de IH para el año 2012.

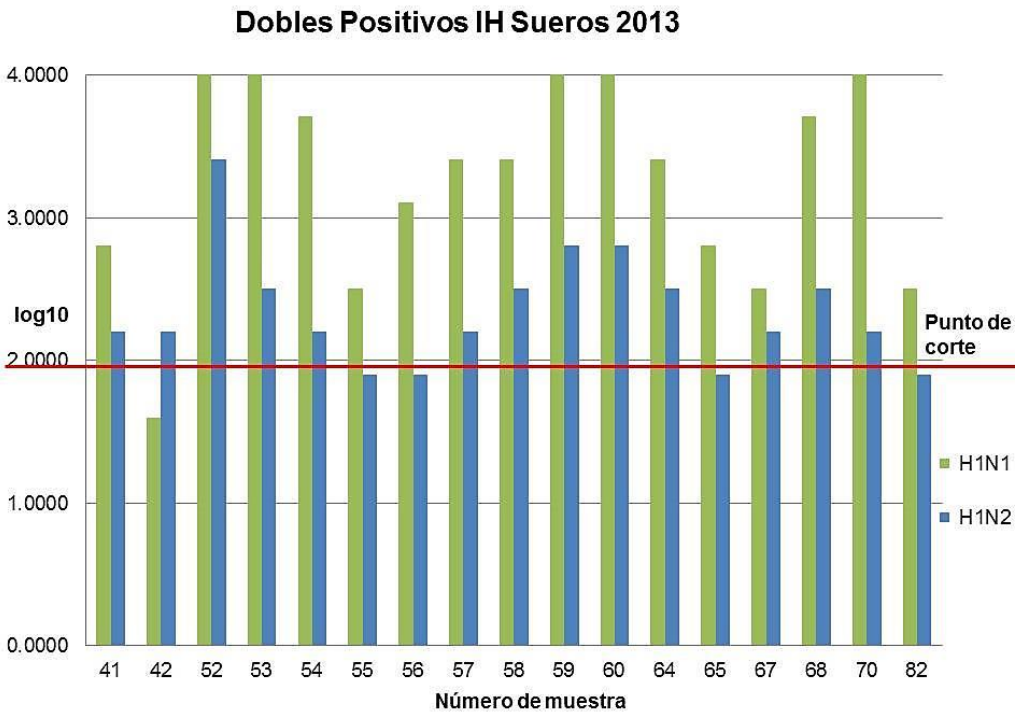


En las muestras analizadas del año 2013 se obtuvieron los siguientes resultados: 73% de muestras positivas para H1N1, 18% de muestras positivas para H1N2 y 17% para muestras dobles positivas, se observa el mismo comportamiento que en el año anterior con una muestra positiva para H1N2 pero no para H1N1. En la gráfica se observa que para el año 2013 los títulos fueron más altos para el subtipo H1N1, esto presenta en 16 de 17 muestras dobles positivas (Tabla 7, Gráfica 4).

Tabla 7. Resultados de los sueros positivos y dobles positivos de la prueba de IH para los subtipos H1N1 y H1N2 del año 2013.

Año	Núm. Total de Muestras	H1N1	H1N2	Dobles		
		%Positivos	%Positivos	H1N1	H1N2	% Total Dobles Positivos
2013	100	73	18	2.8062	2.2041	17
				1.6021	2.2041	
				4.0103	3.4082	
				4.0103	2.5051	
				3.7093	2.2041	
				2.5051	1.9031	
				3.1072	1.9031	
				3.4082	2.2041	
				3.4082	2.5051	
				4.0103	2.8062	
				4.0103	2.8062	
				3.4082	2.5051	
				2.8062	1.9031	
				2.5051	2.2041	
				3.7093	2.5051	
				4.0103	2.2041	
				2.5051	1.9031	
			Promedio	3.2666	2.3458	
			Desviación estándar	0.7149	0.3999	

Gráfica 4. Resultados de los sueros dobles positivos de la prueba de IH para el año 2013.

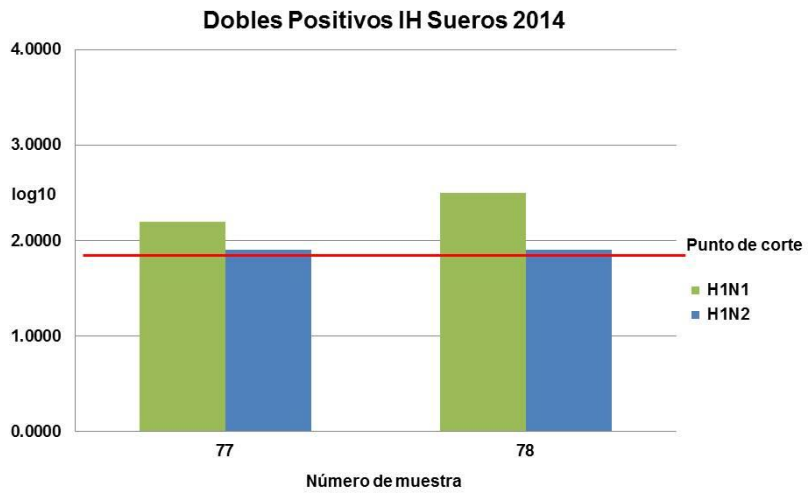


De un total de cien muestras analizadas para el año 2014, se obtuvo un 84% de muestras positivas para H1N1, 3% para H1N2 y 2% de muestras dobles positivas. Al igual que en el año 2012 y 2013 existe una muestra que es positiva para H1N2 pero negativa para H1N1. En este año las dos muestras dobles positivas presentan un título superior para el subtipo H1N1 (Tabla 8, Gráfica 5).

Tabla 8. Resultados de los sueros positivos y dobles positivos de la prueba de IH para los subtipos H1N1 y H1N2 del año 2014.

Año	Núm. Total de Muestras	H1N1	H1N2	Dobles		
		%Positivos	%Positivos	H1N1	H1N2	% Total Dobles Positivos
2014	100	84	3	2.2041	2.5051	2
				1.9031	1.9031	
			Promedio	2.0536	2.2041	
			Desviación estándar	0.2128	0.4257	

Gráfica 5. Resultados de los sueros dobles positivos de la prueba de IH para el año 2014.

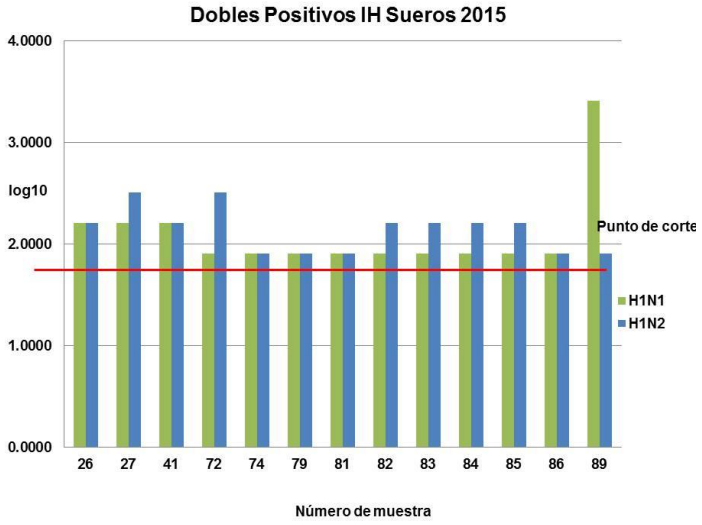


En el año 2015 se obtuvo un 70% de muestras positivas para H1N1, 16% para H1N2 y 12% para las muestras dobles positivas, esto quiere decir que 4 muestras (4%) son positivas a H1N1 pero negativas a H1N2. En la gráfica se observa que solo una muestra de las dobles positivas obtuvo un título superior para H1N1 (Tabla 9, Gráfica 6).

Tabla 9. Resultados de los sueros positivos y dobles positivos de la prueba de IH para los subtipos H1N1 y H1N2 del año 2015.

Año	Núm. Total de Muestras	H1N1	H1N2	Dobles		
		%Positivos	%Positivos	H1N1	H1N2	% Total Dobles Positivos
2015	100	70	16	2.2040	1.9030	12
				2.2040	1.9030	
				1.9030	1.9030	
				1.9030	2.2040	
				2.2040	2.5050	
				2.5050	2.2040	
				3.1070	1.9030	
				3.1070	1.9030	
				3.1070	1.9030	
				3.1070	2.2040	
				3.1070	1.9030	
				2.5050	2.2040	
			Promedio	2.5803	2.0535	
			Desviación estándar	0.4992	0.2029	

Gráfica 6. Resultados de los sueros dobles positivos de la prueba de IH para el año 2015.

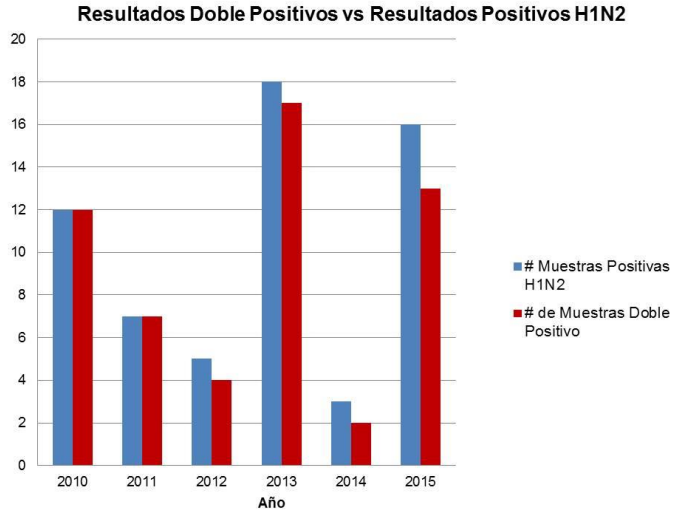


En la gráfica 7 como en la tabla 10 se observa que desde el primer año trabajado se encuentran muestras positivas para el subtipo H1N2, pero cabe señalar que a partir del año 2012 se obtuvieron muestras que únicamente fueron positivas para H1N2 y negativas para H1N1, considerando un punto de corte de 1.9030 (1:80) para ambos subtipos.

Tabla 10. Resumen por año de muestras positivas para H1N2 y dobles positivas.

Año	# muestras positivas H1N2	# de muestras doble positivo
2010	**12**	12
2011	**7**	7
2012	**5**	4
2013	**17**	17
2014	**3**	2
2015	**16**	13

Gráfica 7. Resultados por año de las muestras positivas para H1N2 y dobles positivas.



Determinación de los valores de relación antigénica entre ambos subtipos

Después de seguir el calendario de inmunización de los conejos, a los 8 días después de la última inoculación se sangraron para la obtención de sangre y suero. Con el suero se realizó la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, como se describió anteriormente tanto homóloga como heteróloga. Los conejos 1,2 y 3 fueron inoculados con el subtipo viral H1N2 y 4,5 y 6 con el subtipo H1N1, el conejo 7 fue el control negativo.

La prueba de IH homóloga se utilizó para detectar la presencia de anticuerpos específicos de cada virus con su suero hiperinmune respectivo. Los sueros se enfrentaron con el virus para que existiera una reacción antígeno-anticuerpo y el virus fuera neutralizado, esto fue evidenciado con glóbulos rojos de ave al 0.5%. La lectura se realizó considerando la dilución inversa donde se observó aglutinación, se consideró a partir de 1:80 como positivo.

La IH heteróloga se utilizó la misma técnica confrontando esta vez con su virus heterólogo. Se utilizaron los mismos criterios para la lectura. (Tabla 11)

El porcentaje de protección fue calculado para cada uno de los sueros usando la ecuación de Archetii and Horsafall. (Tabla 12)

Tabla 11. Resultados de la prueba de IH homóloga y heteróloga.

	Suero 1 H1N1	Suero 2 H1N1	Suero 3 H1N1	Suero 1 H1N2	Suero 2 H1N2	Suero 3 H1N2
Virus H1N1	320	320	160	40	20	40
Virus H1N2	80	80	80	2560	1280	1280

Tabla 12. Resultados variación antigénica.

Resultados Variación Antigénica	
Número de Suero	Resultado VRA
1	0.0625
2	0.0625
3	0.125
Promedio	0.0833

Con los resultados de relación antigénica podemos decir que los subtipos A/swine/MexMich/DMZC/2014 (H1N2) y (A/swine/Mexico/EdoMex/52/2010 (H1N1) son diferentes, ya que presentan un valor menor de 1, lo cual indica que antigénicamente se trata de otro subtipo.

DISCUSIÓN

La infección ocasionada por los virus de influenza en los cerdos está caracterizada por presentar una baja mortalidad y una alta morbilidad, de hasta el 100% (Zimmerman et al., 2012; Straw et al., 2002; Cheng, Poon; 2007).

El cerdo juega un papel fundamental en la epizootia del virus de influenza por poseer la capacidad de ser un hospedero de virus provenientes tanto de aves como de humanos. Lo anterior lo coloca como un sistema capaz de generar nuevas variantes virales (Cheng, Poon; 2007).

La técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH) se considera una prueba de diagnóstico estándar para la OIE (Terrestrial Animal…2015), no solo para influenza porcina, sino también para la detección de anticuerpos contra otras enfermedades, tal es el caso de Ojo Azul, Parvovirus porcino o en aves en la enfermedad de Newcastle (NOM-013-ZOO-1994; NOM-052-ZOO-1995), por mencionar algunas. La prueba de IH es una prueba sencilla, de bajo costo y no requiere de un equipo especializado. Sin embargo, una desventaja es que la presencia de inhibidores específicos de tipo proteico en algunos sueros puede constituir una desventaja en el momento de la realización, pero para ello se han implementado acciones para reducir este efecto como lo son: la inactivación con calor a 56±2°C por 30 minutos o el adsorber el suero con caolín y glóbulos rojos al 5% (Ramírez et al., 1996). A pesar de estas posibles desventajas un estudio presentado en el IPVS del año 2006 señaló que la prueba de IH es lo suficientemente específica para diferenciar entre los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2

sin que exista una relación cruzada (Reeth et al., 2006), lo cual concuerda con los resultados presentados en este trabajo.

En el presente estudio se demostró la presencia del virus de influenza porcina subtipo H1N2 desde por lo menos el año 2010 y se observó una mayor circulación a partir del año 2012, mismo año donde Lara y colaboradores (Castro et al., 2012) realizan el primer reporte dentro de nuestro país. Es posible hacer esta declaración ya que a pesar de que no se contó con una muestra únicamente positiva para H1N2, sino que se encontraron en el año 2010 un total de 12 muestras dobles positivas tanto para H1N1 como para H1N2, no existe la presencia de relación cruzada entre ambos virus, por lo tanto no se trata de sueros falsos positivos. Esto se logró confirmar con la generación de los sueros hiperinmunes, evaluando la relación antigénica la cual tuvo un valor promedio de 0.0833, este valor fue calculado con la ecuación de Archettii y Horsafall misma que desde su publicación en 1950 (Archetti, Holsfall;1950) ha sido utilizada en innumerables ocasiones para establecer los valores de relación antigénica entre varios aislamientos o muestras de interés, tal es el caso del Rubulavirus porcino (Riaño,2011) o en otras especies como el caso del Calicivirus en gatos (Johnson,1992), por mencionar algunos ejemplos.

Adicionalmente para confirmar que en efecto existe una diferencia importante entre ambos virus a pesar de pertenecer a la misma clasificación de la hemaglutininas, se realizó la secuencia del gen H. Encontrado que existen diferencias entre los aminoácidos de ambos virus, en total se encuentran 120 diferencias entre los aminoácidos; siendo de mayor interés las que ocurren en los

epítopos, los cuales para el virus de influenza tipo A son 4 y se encuentran en esta posiciones (Rui et al., 2015; Lining, Jiang Zhu; 2015):

- Sa: El grupo se encuentra en las posiciones 128, 129,156 a la 167.
- Sb: Se localiza de la posición 187 a la 189.
- Ca: En las posiciones 140 a 145, 169 a 173,206 a 208, 224,225 y 240 a la 248.
- Cb: Se localiza de la posición 77 a la 82.

En la tabla 11 se muestran las diferencias existentes entre los aminoácidos del gen H de ambos subtipos y su posición. Las filas marcadas de color magenta muestran las regiones antigénicas correspondientes a la región Sa, los cambios se encuentran en las pociones 129,156,158,159,166, la región Ca en color naranja los cambios de los aminoácidos se encuentran en las posiciones 144,145,169,170,172,173, 206,242,243. Para los epítopos Sb y Cb no existen diferencias.

POSICIÓN	H1 (H1N2)	H1 (H1N1)
3	V	A
4	K	M
6	L	V
10	C	Y
14	A	T
15	T	A
16	Y	N
20	I	L
53	S	R
60	L	K
62	K	R
64	I	V
68	Q	H
71	N	K
74	V	I
78	I	L
85	D	E
86	L	S
88	I	F
89	S	T
90	K	A
91	E	S
100	P	S
102	P	S
103	E	D
11	H	D
113	T	I
114	D	N
129	K	E
136	K	N
137	E	T
144	T	E
145	I	A
146	T	N
147	-	R
150	S	T
151	V	A
152	S	A
154	S	A
156	N	A

POSICIÓN	H1 (H1N2)	H1 (H1N1)
158	K	V
159	S	N
166	L	I
168	P	L
169	T	V
170	G	G
172	N	G
173	G	N
174	L	S
183	T	I
185	D	N
186	K	S
206	V	I
210	P	S
211	N	T
212	I	S
213	R	A
216	R	Q
217	A	S
220	H	Q
221	T	N
222	T	A
223	N	D
227	S	F
229	V	G
230	S	T
232	H	R
236	R	K
238	T	E
242	V	A
243	K	T
249	E	D
251	E	T
252	G	A
254	I	M
261	L	V
266	T	K
268	I	T
272	N	T
276	I	V

POSICIÓN	H1 (H1N2)	H1 (H1N1)
277	A	V
284	L	M
285	S	K
288	F	S
294	T	I
296	N	D
297	A	T
299	M	V
300	D	H
301	E	D
304	A	T
305	K	T
310	Q	K
315	S	T
322	V	I
342	V	A
348	T	I
372	V	I
382	Q	R
390	N	D
416	K	H
419	R	K
421	M	I
435	I	V
454	F	Y
467	K	R
468	G	S
489	N	D
491	E	T
495	S	N
510	S	A
525	M	T
526	E	R
527	V	I
528	Y	F
530	V	I
543	F	L
544	L	V
546	A	S
551	C	S

Tabla 13.Diferencias en los aminoácidos del gen H de los subtipos trabajados

CONCLUSIONES

Los resultados nos demuestran que al menos desde el año 2010 existe evidencia serológica de la presencia de un nuevo subtipo de influenza porcina, H1N2.

La positividad detectada en las muestras se debe a la circulación activa del virus, ya que por los resultados de la prueba de variación antigénica, se descartan falsos positivos. Esta prueba nos indica que los subtipos H1N1 (A/swine/Mexico/EdoMex/52/2010(H1N1) y H1N2 (A/swine/MexMich/DMZC/2014 (H1N2) no están relacionados antigénicamente, esto además sustentado con la comparación entre la secuencia del gen H de los subtipos mencionados en la cual aunque se trate de la misma Hemaglutinina se encuentran diferencias significativas.

Por lo anterior es de vital importancia llevar a cabo estudios epidemiológicos como filogenéticos para conocer el impacto que puede tener la circulación de este subtipo viral en la República Mexicana.

REFERENCIAS

- Álvarez FM, Rodríguez BJ, Cipriano CA, Rodríguez GL, Ayora TG, Segura CJ. 2004, Perfil Serológico del virus de Influenza Porcina, Mycoplasma hyopneumoniae y Actinobacilus pleuropneumoniae, en granjas de Yucatán, *Mex.Rev. Vet.* 35(4):295-305.
- Archetti I, Horsfall FL. 1950. Persistent antigenic variation of Influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous innmue serum. *J.Exp Med* 92(5): 441-462
- Ávalos Guzmán Paulina.2008. Resultados. *Determinación de la Seroprevalencia de Influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 en los estados de Jalisco, Guanajuato y Michoacán* [Tesis de licenciatura]. Ciudad de México: FMVZ, UNAM.
- Brown IH. 2000. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary Microbiology*, 74:29-46.
- Carrera AVM, Mercado GC, Trujillo OE, Mendoza SE, Isa HP, Paz L F, Arias OC, Sánchez BI. 2014. Cambios genéticos en los genes internos del virus de influenza porcina aislados en México. *Revista México Veterinaria* 1(1)
- Castro PF, Cortes FR, Echeveste GAR, Lara PJ, Lozano DB, Quezada MF, Sarfati MD, Soto PE. 2012. Identificación de un nuevo subtipo de influenza porcina (H1N2) en México, Memorias AMVEC XLVII 2012 Guadalajara Jalisco, trabajos libres 172

- Cheng T K, Poon L L. 2007Biology of influenza a virus. *Sci, 1102:1-*25.
- Córdoba VJL, Valdespin GJL, Ponce de León RS. 2010. La Epidemia de influenza A/H1N1 en México. México: Editorial Médica Panamericana.
- Daum T. Luke, Canas C. Linda, Schadler A. Cassandra, Ujimori A.H. Veronica, Huff B. William, BRNAes J. William, Lohman L. Kenton.2002. A Rapid Single-Step Multiplex Reverse Transcription-PCR Assay for the Detection of Human H1N1, H3N2 and B Influenza Viruses. *Journal of Clinical Virology*, 25(3):345-350.|
- Castillo CE, Gómez AF.2006. *Texto y Cuaderno de trabajo Laboratorio de Virología.* Distrito Federal, México: FMVZ UNAM.
- Gamblin SJ, Skehel JJ. 2010. Influenza Hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem* 85(37): 28403–28409.
- García GJ, Ramos C. 2006. La influenza, un problema vigente de salud pública. *Salud Pública de México*, 48 (3):244-267.
- Geo V, Westover MK.2008. Origin of the 1918 Spanish influenza virus: A comparative genomic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47:1100-1110.
- González CT, Ramírez MH, Stephano HA, Espino RG. 1990. 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 la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos AC, Puerto Vallarta Jalisco, México

- Gramer M R.Defining swine influenza virus. 2005. *Journal of Swine Health and Production*, 2005; 13(3):157-160.
- Guido M, Joris I. 2004. *Cells, tissues and disease: Principles of general pathology.* USA: *Department of Pathology. University of Massachusetts Medical School*. Oxford University Press,
- Heather L, Van Epps. 2006. Influenza: exposing the true killer. *J Exp Med* 203(4):803.
- Herschhorn A, Hizi A, 2010. Retroviral Reverse Transcriptases. *Cell Mol Sci*, 67(6):2717-47.
- Hinshaw VS, Webster RG.1982. The natural History of Influenza A Viruses, Basic and Applied Influenza Research. En: Beare AS. *Basic and Applied Influenza Research*. Boca Ratón, Florida, EUA: CRC Press: 79-104.
- *Instituto de Biotecnología* [diciembre 2015]. Cuernavaca, Morleos, México: UNAM. www.ibt.unam.mx [consulta: 25 feb 2016]
- Joaquín Segalés, Jorge Martínez, Joaquim Castellá, Laila Darwich, Mariano Domingo, Enric Mateu, Marga Martín, Marina Sibila.2014. *Manual de diagnóstico laboratorial porcino*. NJ, USA: Intervet International B.V White Station.
- Johnson RP.1992. Antigenic change in feline calicivirus during persistent infection.1992. *Can J Vet Rev* 56(4):326-33?

- Karasin AI, Landgraf J, Swenson S, Erickson G, Goyal S, Woodruff M, Scherba G, Anderson G, Olsen CW. 2002. Genetic Characterization of H1N2 Influenza A Virus Isolated from Pigs throughout the United States. *J Clin Microbiol* 40:1073-1079.
- Komadina Naomi, Mc Verna Jodie, Hall Robert, Leder Karin.2012. A Historical Perspective of Influenza A (H1N2) Virus. *Emerging Infectious* Diseases, 20 (1):6-12.
- Lara-Puente J, Quezada-Monroy F, Echeveste-García de Alba R, Sarfati-Mizrahi D, Soto-Priante E, Lozano Dubernad B. 2012. Detección de Anticuerpos por IH contra los subtipos H1N1, H3N2 Y H1N2 de influenza porcina (2006-2012) en México. Memorias AMVEC XLVII 2012 Guadalajara Jalisco, trabajos libres 207
- Lining He, Jiang Zhu.2015. Computational tools for epitope vaccine design and evaluation Science Direct, Elsevier, and 11:103-112.
- Medina AR, García-Sastre A. 2011. Influenza A viruses: new research developments. *Nature Reviews Microbiology* 9 590-603.
- Schmulke M, García-Sastre A.2010. Evasion of Innate and Adaptive Immune Responses by Influenza A Virus. *Cell Microbiol*. 12(7):873-880.
- Morrilla González A., 2005. *Manual para el control de enfermedades infecciosas de los cerdos*. 2°edición. México: El manual moderno.
- Nelson I. Martha, Holmes C. Edward.2007.The evolution of epidemic influenza. *Nature publishing group*, 8:196-205.

- Neumann Gabriele, Noda Takeshi, Kawaokal Yoshihiro, Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus.2009. *HHS Public access*. 459 (7249):931-939.
- OFFLU [Febrero 2015]. Estados Unidos de Norteamérica: OIE FAO. www.offlu.net [última consulta 11junio 2015].
- Perket Jeffery.2011. Making contact with the sequencing´s fourth generation. *Biotechniques,* 50(2):93-95.
- Plonait H, Bickhardtt K.2001. *Manual de las Enfermedades del Cerdo*. España: Acriba S.A.
- Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC, Rodríguez TJ.1996. Hemoaglutinación e Inhibición de la Hemoaglutinación del paramixivirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. *Vet Mex,* 27,257-259.
- Ramírez SMA. 1982. Aislamiento e identificación del virus de influenza porcina en México.13:103.
- Reeth K.Van, Labarque G., Kyriakis C.S., Pensaert M. 2006. Specificity of the hemagglutination inhibition (IH) test for the detection of infection with European H1N1, H3N2 and H1N2 swine influenza virus: Lessons from experimental studies Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 1:263.
- Riaño Cruz Verónica Pruedencia.2011.Identificación de variación antigénica del rubulavirus porcino mediante la técnica de inhibición de

la hemoaglutinación [Tesis de licenciatura]. Ciudad de México: FMVZ-UNAM.

- Rivera CE.2000 .La influenza en el hombre y en los animales. Memorias del XXV Convención Anual Asociación Nacional Especialistas Ciencias Avícolas. Cancún, Quintana Roo, México.
- Rodríguez TJ, Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC.1996. Muestreo serológico a nivel de rastro para detectar anticuerpos contra el virus de influenza porcina. *Vet. Mex* 27(1):17-21.
- Rui Xu, Damian C. Ekiert, Jans C. Krause, Rong Hai, James E, Crow Jr, Ian A. Wilson 2015. Structural Basis of Preexisting Immunity to the 2009 H1N1 Pandemic Influenza Virus. *Science*.
- Saiki KR, Gelfand HD, Stoffel S, Scharf JS, Higuchi R, Horn TG, Mullis BK, Erlich AH.1988 Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science.* 239:487-491.
- Sánchez BI, Ávalos GP, López Charretón S, Arias C, Trigo TF, Beltrán FR, OME. 2012. Panorama de la Influenza Porcina en México. Memorias 3° Precongreso Científico IASA-Amvec
- Sánchez MDM, Carreón NR, Palacios AJM. 2010. Comparación de dos métodos diagnósticos para la detección del virus de influenza porcina. *Revista Veterinaria México* 41(1): 45-58.
- Stine D, Anderson G, Liem A, Keil D, Mc Corkendale D.2002. Recent observations of swine influenza disease and prophylaxis in US swine herds. Memorias de XXXXVII Congreso Nacional Puerto Vallarta

Jalisco, México, Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2022:43-46

- Straw EB, D´Allaire S, Mengeling LW, Taylor JD. 2002. *Enfermedades del Cerdo.* 8° Edición. Buenos Aires, Argentina: Intermedica.
- *Swine Influenza the Center for Food Security and Public Health* [ultima actualización junio 2014]. Iowa, EUA: Iowa State University Institute for International Cooperation in Animal Biologics .www.cfsph.iastate.edu/ICAB [consulta: 5 dic 2015].
- Tamay de Dios L, Ibarra L, Velasquillo C. 2013 Fundamentos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y de la PCR en Tiempo Real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2):70-78.
- Terrestrial Animal Health Code Vol. 1 General provisions. World Organization for Animal Health OIE, 20th Edition. Paris, Francia.
- Trigo TF.1998. Capítulo 2 Aparato respiratorio. En: Trigo Tavera Francisco J. *Patología Sistémica Veterinaria.* Tercera Edición. México: Mc Graw Hill Interamericana.
- Van Reeth K, Brown IH y Olsen CW. 2012. Influenza Virus. En: *Diseases of Swine*, 10th Ed. Wiley-Blackwell Eds, pp. 557-571.
- Van Reeth K. Annebel DV, Constantinos K. Pensaert M. 2006. Influenza in birds, pigs and humans old theories versus current viewpoints. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 1:26-33.

- Webster GR, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. 1992. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiological Reviews* 56(1): 152-79.
- Zangenberg G., Saiki K. R., Reynolds R.1999. Multiplex PCR: Optimization Guidelines, PCR Application Protocol for Functional Genomics, *Academic Press,* 73-90
- Zimmerman JJ, Karriker AL, Ramirez A, Schwartz JK, Stevenson G. 2012. *Diseases of Swine*. 10th Edition. Iowa, EUA: Jon Wiley &Sons Inc.