

171 2 y 3 m.

I N D I C E.

1. RESUMEN.....	pag. 1
2. INTRODUCCION.....	pag. 2
3. ANTECEDENTES.....	pag. 5
4. MATERIAL.....	pag. 8
5. METODOS.....	pag. 13
6. RESULTADOS.....	pag. 20
7. DISCUSION.....	pag. 37
8. CONCLUSIONES.....	pag. 39
9. BIBLIOGRAFIA.....	pag. 40



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION EN PRODUCCION DE
BIOLGICOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGA
CIONES PECUARIAS , EN EL DEPARTAMENTO DE MICROS
COPIA ELECTRONICA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL Y
EN EL DEPARTAMENTO DE PRODUCCION PORCINA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE
LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO.

RESUMEN .

En una granja porcícola de 500 vientres ubicada en el Estado de Puebla se observó a principios del mes de Octubre de 1978, un brote que en 8 días, infectó a todos los animales de engorda y destete.

Las características clínicas respiratorias del cuadro coincidían al de la Influenza porcina. Se colectaron muestras de pulmón de los animales muertos y de los mas afectados. Se descartó la presencia de alguna bacteria involucrada como agente causal y se corrieron pruebas tendientes al aislamiento de un posible Influenza virus. Las pruebas desarrolladas fueron: Inoculación de embriones de pollo y pases ciegos en los mismos; Inoculación en cultivos celulares secundarios de riñón de bovino; hemoadsorción y hemoaglutinación con glóbulos rojos de ganso; tinción negativa e inclusiones de células infectadas en resina para observación en microscopio electrónico; inmunofluorescencia directa con un conjugado específico; reproducción de la enfermedad en lechonas y confirmación del agente etiológico con inmunofluorescencia directa y con estudios histopatológicos.

Con esto se logró aislar un agente viral identificado como Influenza virus porcino, tipo A, nunca antes aislado o identificado en nuestro País.

I N T R O D U C C I O N .

Las enfermedades respiratorias de los cerdos, juegan un papel muy importante dentro de la porcicultura nacional, ya que representan el 51 % de los complejos morbosos que los afectan, como factor primario (21), además - que favorecen a la invasión de síndromes secundarios aumentando las pérdidas por mortalidad en las granjas.

Todo esto se refleja en la economía y producción del porcicultor, teniendo una baja en la ganancia de peso de sus animales y un considerable incremento de egresos en alimentación y tratamientos.

Por lo que la importancia económica y epizootiológica representan, las enfermedades respiratorias causadas por el virus de influenza porcina, desde la aparición del primer brote en 1918 en los Estados Unidos de Norteamérica, se han realizado innumerables trabajos de investigación al respecto en todo el mundo (1,2,3,4,5,6,7,8,10,20,23,28,29,32,33,39,43,48,49).

La enfermedad producida por el influenza virus también llamada, "Hog Flu" (11,13) se caracteriza por: presentarse de una manera súbita en la p^{ia}ra, sobre todo en otoño y principios de invierno, afecta principalmente a animales menores de un año, la morbilidad llega hasta un 100% y la mortalidad a un 4% pudiendo llegar hasta un 20% cuando el hato es afectado por infecciones secundarias (36). Los animales enfermos presentan descargas nasales y oculares (29), un cuadro clínico con fiebre de 40 a 41°C, tos severa, anorexia, postración y rápida recuperación (13).

El periodo de la enfermedad es corto, con una duración de 2 a 6 días; Los animales pueden morir después del día 4 de aparecida la enfermedad, presentando una respiración alterada, delirio, e incoordinación (13,29).

La distribución geográfica del virus de la influenza porcina es muy amplia, se encuentra diseminada en casi todo el mundo(3,8,9,11,12,13,14,20,23,28,29,32,33,38,39,43,47,48,49).

En México aun no se ha reportado la presencia del virus, aunque la aparición de brotes con características clínicas similares o iguales a la enfermedad, nos hacen sospechar de ella (21,36).

La influenza porcina fué reconocida como entidad nosológica en los Estados Unidos de Norte América por Koen en 1918 (11,13) que la relacionó con la pandemia humana. Shope en una serie de trabajos, reportó el haber aislado el virus de pulmones lesionados y demostró su importancia como etiología de la enfermedad (45,46).

La enfermedad en los humanos ha tenido gran trascendencia desde la pandemia de 1918 en los Estados Unidos, Europa y el rebrote de 1957 en Asia; (8,13,14,39,40,44) de donde se aisló el virus tanto de humanos como de cerdos y animales silvestres (5,16,19,35,31,45,46,47,49) Smith y Col. en 1976 aislaron el virus de la influenza porcina a partir del tejido pulmonar de un humano (48).

El aislamiento del virus de influenza se ha hecho a partir de lavados nasofaríngeos, con hisopos frotando amígdalas y de pulmones afectados, encontrándolo con más facilidad en el día 2 de presentada la enfermedad (5,8,11,16,17,22,25,26,45,49).

El virus ha sido aislado en hurones, donde se ha demostrado que se adapta con mayor facilidad (5,8,12,16,32), también lo han aislado por pasajes ciegos de macerados de pulmón en ratones (14,17).

El virus de influenza produce una infección inaparente en hamsters, pero con pasajes seriados de macerado de pulmón, se adapta y produce la muerte del animal (18).

El uso de embriones de pollo ideado por Burnet, en 1940, inoculando el virus en saco amniótico y alantoideo ha sido el método mas utilizado por diferentes investigadores (11,19,20,27,28,30,31,33,34,37).

También se ha podido aislar en diferentes cultivos de tejidos como:

pulmón de embrión humano(4,38), riñón de embrión humano(25), pero la gran mayoría de trabajos reportan el uso de células de riñón de mono para el aislamiento primario del virus de influenza(25,44).

La enfermedad de influenza porcina ha sido reproducida experimentalmente en lechones de una semana a 3 meses de edad, inoculando únicamente el virus de la influenza porcina, manifestándose solo lagrimeo, tos y aumento en la temperatura hasta 41°C, uno o dos días, denominando a esta presentación "enfermedad filtrable" (31,37).

Actualmente el virus de la influenza porcina está clasificado dentro de los RNA-Orthomyxoviridae del género influenza virus, y de acuerdo con la nomenclatura dada por el comité internacional para la taxonomía de los virus en 1978(2) están divididos en tipo A al que pertenece la influenza porcina, tipo B y Tipo C, y en base a sus características antigénicas: Hemaglutininas(H) y Neuraminidasa(N). Los otros elementos de la nomenclatura están dados: por el hospedador del cual fué aislado, la localización geográfica, número de cepa y año en que fué aislado. Esta nomenclatura se aplica tanto para influenza virus de humanos, como de aves, caballos y cerdos.

ANTECEDENTES .

El día 8 de Octubre de 1978 se visitó la granja porcícola Tenoch, en el Edo. de Puebla. La granja contaba con un total de 500 vientros, el tipo de explotación es de cría y engorda con buenas instalaciones técnicas, en general limpia, bien ventilada y carente de humedad. El ali-mento se prepara allí mismo, ocasionalmente su les proporciona a los cerdos antibiótico en él mismo.

Se vacuna contra cólera regularmente.

El 27 de Septiembre de 1978 en un corral de engorda (animales de 20 a 60 kg), se observó tos en la mayoría de ellos, respiración abdominal agitada. Al día siguiente se encontraron afectados los corrales de destete con la misma sintomatología. El día 4 de Octubre del mismo año toda la granja estaba afectada, menos los sementales y las marranas viejas. A partir del día 6 de Octubre empezó a decrecer el problema y los animales afectados eran realmente pocos, presentando respiración abdominal (brinco) y ligero lagrimeo.

La morbilidad fué de un 98% y sólo murieron 3 animales.

Los cerdos se trataron con penicilina, excluyendo a los del área de engorda.

El día de la visita se tomaron 2 cerdos machos de 20 Kg y 2 de 7 días de edad como representantes de los más enfermos. Fueron sacrificados con anestesia por vía intraperitoneal el día 9 de Octubre a las 8 de la mañana y se procedió a practicar las necropsias.

H A L L A Z G O S : El estado general de los animales era bueno, limpios, pelo brillante; en comisura ocular interna se observó, en uno de los animales, coloración negra, con aspecto de mancha de aceite, que sugirió lagrimeo.

A la incisión primaria no se observaron cambios relevantes.

En aparato respiratorio se observaron zonas grisáceas deprimidas y ligeramente firmes en pulmón, de tamaño variable entre 0.5 y 1.5 cms diámetro, distribuidas en forma difusa, de regular cantidad en todos los lóbulos, con ligera selectividad hacia los lóbulos anteriores (apical y cardiaco). Se observó congestión de cornetes nasales. En cavidad abdominal, el hígado se mostró pálido y los riñones ligeramente friables. En los demás órganos no se observaron cambios aparentes.

Diagnóstico postmortem: neumonía aguda y rinitis.

Se tomaron muestras de pulmón de los animales sometidos a necropsia y se corrieron pruebas bacteriológicas con el objeto de encontrar algún agente infeccioso (se descartó toda presencia de mycoplasma, haemophilus y pasteurella).

OBJETIVO .

Dadas las manifestaciones clínicas y epizootiológicas del caso — y habiendo descartado la presencia de bacterias como agente infeccioso, se sospechó de una enfermedad de etiología viral, por lo que la finalidad de la presente tesis fué la realización de estudios virológicos, tendientes al aislamiento e identificación del virus de la influenza porcina, con el objeto de determinar la presencia de la enfermedad en México.

M A T E R I A L .

1. PARA LA RECOLECCION DE MUESTRAS SOSPECHOSAS.

- a) Mechero
- b) Tijeras
- c) Pinzas de disección
- d) Bolsas de polietileno
- e) Cajas aislantes de poliuretano
- f) Hielo seco

2. PARA EL PREPARADO DEL INOCULO.

- a) Muestras sospechosas.
- b) Tijeras y pinzas de disección estériles.
- c) Mortero de porcelana con mango estéril.
- d) Vaso de precipitado de 100ml.
- e) Matraces de 250 ml.
- f) Barra magnética.
- g) Agitador magnético.
- h) Gasa estéril.
- i) Embudo de cristal estéril.
- j) Centífuga.
- k) Arena estéril.

3. PARA PRUEBAS DE HEMOAGLUTINACION.

- a) Microplacas(Mca.Reg. Flow 76-003 y 77-01).
- b) Micropipetas(Mca.Reg. .025 ml. Cenco).
- c) Microdilutores(Mca.Reg.Cenco 220-33, .025 ml).
- d) Suero libre de gama globulinas(Mca. Reg. Gibco).
- e) Probeta 100 ml.
- f) Matraz de 100 ml.
- g) Pipetas de 1 y 10 ml.
- h) Hisopos estériles.
- i) Agua destilada estéril.
- j) Hielo.
- k) Viales con virus aislado.
- l) Tubo de ensayo 15 ml.
- m) Agitador Vortax-(Gonia, Mod.K-550-G. (Mca.Reg.Sc.Ind.Inc.)).
- n) Glóbulos rojos de ganso lavados y diluidos 1:60.
- o) Solución salina fosfatada y buferada (PBS) pH 7.2

4. PARA LA INOCULACION DE EMBRIONES DE POLLO.

- a) Embriones de pollo de 10 días de edad.
- b) Macerado de pulmón afectado.
- c) Penicilina y estreptomycinina.
- d) Medio de crecimiento Hank.
- e) Jeringa de 1cc (tuberculina).
- f) Aguja hipodérmica No. 18 x 2 pulg.
- g) Vibrador, Vibrograbador, (Mca.Reg. Burgess Vibrocrafft, Inc. V-73.).
- h) Yodo (1%) en alcohol.
- i) Parafina(sellador).
- j) Ovoscopio.

5. PARA PASE EN EMBRION DE POLLO.

- a) Embriones de pollo de 14 días de edad, inoculados con muestra sospechosa.
- b) Ovoscopio.
- c) Tijeras y pinzas de disección.
- d) Quebradora de Huevo.
- e) Cajas de Petri medianas(90 mm).
- f) Mortero Tembrook.
- g) Tripsina versone.
- h) Matraz de 250 ml.
- i) Agitador.
- j) Magneto.
- k) Estreptomycinina y Penicilina.
- l) Gasa.
- m) Embudo.
- n) Centrífuga.
- o) Viales, Fco. de Scc.
- p) Jeringa de 1cc.(tuberculina).
- q) Aguja hipodérmica No. 18 x 2 pulg.
- r) Yodo (1%) en alcohol.
- s) Parafina(sellador).
- t) Campana de flujo laminar.
- u) Mechero.
- v) Algodón.
- w) Pipetas de 1,3,5 ml.
- x) Pipeta de 25 ml.(volumétrica).
- y) Jeringa de 20 cc.

6. PARA LA INOCULACION DE CULTIVOS CELULARES.

- a) Cultivos secundarios de riñón de bovino
- b) Campana de flujo laminar (Mca.Reg. Veco S.A)
- c) Congelador a -70°C . (Mca.Reg.Revco Inc)
- d) Estufa húmeda, con CO_2 , 37°C (Mea.Reg.)
- e) Botellas de dilución de leche.
- f) Botellas de Roux
- g) Macerado de pulmón sospechoso.
- h) Penicilina, estreptomycin
- i) Pipetas de 1,2 ml
- j) DEAE-dextran
- k) Medio Eagle para cultivo celular.
- l) Suero libre de gamma globulinas (Mca.Reg.Gibco. USA)
- m) Solución salina buferada PES, 7.2 pH.

7. PARA PASE DE CELULAS INFECTADAS CON EL VIRUS.

- a) Cultivos secundarios de riñón de bovino infectados con virus (MOBK)
- b) Botellas de dilución de leche
- c) Antibióticos.
- d) Campana de flujo
- e) Jeringa de 20 cc
- f) Centrífuga
- g) Balanza
- h) Revco -70°C
- i) Viales de 5 cc.
- j) Microscopio invertido (Mca.Reg. Leitz)
- k) Medio Eagle de crecimiento
- l) Pipetas de 5 y 10 ml
- m) Tubo de centrifuga 50 ml (polipropileno).

8. PARA LA INOCULACION DE LECHONES.

- a) Lechones de $2\frac{1}{2}$ meses de edad, Landrace.
- b) Jeringa de 1 cc.
- c) Aguja 22x32, 11/4 inch.
- d) Virus aislado
- e) Algodón
- f) Alcohol 96°C
- g) Marcador rojo.

9. PARA NECROPSIA Y RECUPERACION DE PULMONES AFECTADOS.

- a) Pistola de percusión
- b) Cuchillo
- c) Frasco de vidrio 1 Lt. de capacidad.
- d) Bolsas de plástico
- e) Pinzas de disección
- f) Hielo picado
- g) Caja aislante de poliuretano
- h) Revco Freezer

10. PARA ESTUDIO HISTOPATOLOGICO.

- a) Formol 50%
- b) Pulmón afectado
- c) Fijadores (acetona)
- d) Histoquinete.
- e) Microtomo
- f) Plancha de secado
- g) Colorantes (Hematoxilina Eosina, tricrómica)
- h) Balsamo de Canadá
- i) Portaobjetos y cubreobjetos
- j) Microscopio óptico

11. HEMOADSORCION.

- a) Cultivo secundario de células de riñón de bovino (MOBK) en botellas de dilución de leche, infectadas con el virus aislado..
- b) Cultivo secundario de células de riñón de bovino (MOBK) en botellas de dilución de leche, no infectadas, como testigo.
- c) Alicuotas del virus aislada.
- d) Glóbulos rojos de ganso macho lavados y diluidos 1:60
- e) Microscopio invertido (Mca.Reg. Leitz).

12. PARA OBSERVACION EN MICROSCOPIO ELECTRONICO.

- a) Cultivo secundario de células de riñón de bovino (MOBK) infectados con el virus aislado en botella de dilución de leche.
- b) Cultivo secundario de riñón de bovino (MOBK) no infectadas en botella de leche, como testigo.
- c) Glutaraldehído al 3% como fijador.

- d) Solución buffer de fosfatos, pH 7.2, 1 N.
- e) Solución de tetraóxido de osmio (OSO₄) al 2%
- f) Alcohol etílico en concentraciones ascendentes de 50%, 70%, 80%, 90% y 100%.
- g) Araldita (resina sintética para inclusion)
- h) Ultramicrotomo (Mca.Reg. Postes Bluro, Mts.)
- i) Uranilo, citrato de plomo
- j) Rejillas portaobjetos de cobre
- k) Microscopio electrónico de transmisión (Mca.Reg.Phillips,EM-300)

13. PARA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA.

- a) Tubos de Leighton con laminilla; sembrados con cultivo secundario de MBK inoculados con el virus aislado.
- b) Tubos de Leighton con laminillas; sembrados con cultivo secundario de MBK, no infectados.
- c) Solución salina bufferada y fosfatada (PBS) 7.2 pH.
- d) Agua deionizada estéril.
- e) Acetona.
- f) Conjugado de influenza porcina SIV diluido 1:60
- g) Estufa húmeda CO₂ a 37°C
- h) Microscopio de luz ultravioleta para inmunofluorescencia (Reichert Austria Reg.).

M E T O D O S .

Una vez recolectadas las muestras sospechosas del brote de la granja Tenoch, se procedió a preparar un lote de inóculo en la siguiente forma:

Se trabajó en completa asepsia, bajo mechero y en una campana de flujo laminar.

Las muestras de pulmón fueron primero cortadas con tijeras, luego en un mortero de porcelana se trituraron con ayuda de arena estéril y el mango del mortero, se vació el macerado de pulmón en un matraz de 250 ml y se añadió tripsina versene Vol/Vol, con la ayuda de una barra magnética 3/8 y agitador magnético se agitó durante 15 minutos 2 veces recuperando el sobrenadante.

Se centrifugó a 1500 RPM por 10 minutos añadiendo antibióticos, y se recuperó el sobrenadante, éste fué envasado en frascos de 5 ml, quedando un volúmen final de 1.5 ml en cada alícuota. Se hicieron pruebas de esterilidad en caldo nutritivo, caldo tioglicolato, agar sangre y sabaud.

Se congelaron a -70°C en un congelador Revco.

PARA LA INOCULACION EN EMBRIONES DE POLLO Y PASE EN EMBRION DE POLLO.

Se utilizaron 40 huevos fértiles provenientes de la granja experimental del I.N.I.P.-SARH., de Texcoco Edo. de México, se incubaron durante 10 días, seleccionandose 20 huevos fértiles de tamaño uniforme .

Se ovoscopiaron marcando el límite de la cámara de aire, se desinfectaron con una solución yodada y con la ayuda de un vibrador de punta se hizo un orificio pequeño en el vértice superior del huevo, se volvió

a desinfectar con la solución yodada, una vez hecho el orificio se tomó una alícuota de la muestra sospechosa y se inoculó, vía saco amniótico. Se aplicaron 0.2 ml a cada huevo y después de volver a desinfectar se selló con cera. Los huevos testigo fueron inoculados con agua estéril deionizada.

Se incubaron a 35°C durante 5 días, se eliminaron los embriones muertos y los vivos fueron refrigerados a 4°C por 24 horas.

Se desinfectaba el área de la cámara de aire en el huevo con la solución yodada, se rompía el cascarón de la cámara de aire, la membrana se quitaba con pinzas estériles y el líquido amniótico fue cosechado con pipeta al igual que el líquido alantoideo. Una vez cosechado el líquido fue centrifugado a 1000 RPM durante 15 minutos.

A partir del líquido cosechado se corrieron pruebas de hemoaglutinación en tubo y placa.

De los huevos que fueron recuperados 5 días post infección, la mitad fueron procesados como ya mencionamos y la otra mitad además el líquido, se recuperaron las membranas en una caja de Patri estéril y con la ayuda de un mortero Tembrook se trituraron hasta que obtuvimos un macerado uniforme, estas se centrifugaron a 1000 RPM durante 15 minutos y se les corrieron pruebas de hemoaglutinación.

Si la muestra cosechada era negativa a esta prueba, se hicieron 3 pases sucesivos y si resultaba negativa se eliminaba.

INOCULACION EN CULTIVOS CELULARES.

Los cultivos celulares empleados fueron hechos a partir de riñones de bovino, mantenidos en medio de cultivo Eagle enriquecido con 2% de suero libre de gama globulinas, sembrados en botellas de dilución de leche.

Los cultivos fueron mantenidos en una estufa con atmósfera de CO₂ a 33°C.

Se utilizaron 5 botellas de dilución de leche, que tuvieran un monoestrato con un 100 % de confluencia.

Tres botellas se inocularon, cada una con 1.0 ml de la muestra sospechosa (alícuotas) con adición de DEAE-Dextrán. A las botellas de control solo se les añadió DEAE-Dextrán. Esto se hizo para el primer pase.

Se mantuvieron durante 4 días a 33°C en la estufa de CO₂ y todos los días fueron revisadas para detectar efecto citopático.

Esto se hizo de igual forma variando únicamente la cantidad de DEAE Dextrán (de 0.5 ml, 0.4 ml, 0.3 ml y 0.2 ml) utilizando 2 botellas de dilución de leche con células para cada dilución, quedando siempre un control.

PASE EN CULTIVO CELULAR.

Se emplearon células de riñón de bovino en cultivo secundario mantenidas en medio Eagle enriquecido con 2% de suero libre de gamma globulinas.

Las botellas infectadas fueron revisadas y en el momento de detectar inicios de efecto citopático fueron congeladas a -70°C durante 30 minutos, con el objeto de romper las células y de obtener una mayor liberación de virus. Se centrifugaron a 1000 RPM durante 10 minutos en centrifuga refrigerada a 4°C, se recuperó el sobrenadante y fue envasado en alícuotas de 1.5 ml, volumen final. En cada pase se hizo prueba de esterilidad bacteriológica en caldo nutritivo, caldo tioglicolato, agar sangre y saboreau. Además que se corrieron pruebas de hemoaglutinación en tubo y placa.

Las alícuotas se almacenaron en un congelador Revco a -70°C.

Una vez cosechado el sobrenadante y habiendo pasado por estas pruebas se volvieron a infectar botellas de dilución de leche conteniendo cultivo secundario de células de riñón de bovino con un monoestrato a 100% de confluencia y se procedió de igual forma a lo anterior, a que hubiera

efecto citopático, congelación, centrifugación y almacenamiento.

Para la obtención de una buena cantidad de virus se inocularon 4 botellas de Roux, conteniendo monoestratos de células de riñón de bovino a 100% de confluencia, con el 2º y 5º pase celular infectado, ya que tuvieron los títulos hemoaglutinantes mas altos (+1:1024), al detectar principios de efecto citopático (18 horas) fueron congeladas a -70°C en un congelador Revco, por un periodo de 2 horas, se descongelaron y se centrifugaron a 1000 RPM durante 15 minutos, en centrífuga refrigerada a 4°C.

Se cosechó una cantidad total de 300 ml de la cual fué adicionada Vol/Vol. con PS (peptona sacarosa) como soporte para ser liofilizada. Se corrieron pruebas bacteriológicas en caldo nutritivo, caldo tioglicolato, agar sangre y sabureau. Se le añadió 3 ml de penicilina-estreptomicina.

El líquido fué envasado en completa esterilidad y se liofilizó 1.5 ml en cada frasco.

El liofilizado se almacenó en cámara fría a 4°C.

A partir del liofilizado se corrieron todas las pruebas inmunológicas tendientes a la identificación del virus aislado.

PRUEBA DE HEMOADSORCION.

Con 2 botellas de dilución de leche conteniendo células de riñón de bovino y un monoestrato de 100% de confluencia, se infectó una de ellas con virus aislado y la otra se dejó como control. Se incubó durante 18 horas en estufa húmeda con CO₂ a 37°C.

A las 18 horas se quitó el medio de cultivo y se lavó con PBS 7.2pH, se le agregó 1 ml de glóbulos rojos de ganso macho, previamente lavados en PBS a una concentración final de 1:60 y se incubó durante 30 minutos, el me

dio fué eliminado y las botellas se observaron al microscopio invertido.

OBSERVACION DEL VIRUS AL MICROSCOPIO ELECTRONICO.

Utilizando células de riñón de bovino con un monoestrato a 100% de confluencia (cultivo secundario), en botellas de dilución de leche. Se infectaron 2 botellas con 1 ml del virus y 0.3 de DEAE-Dextran y 2 botellas con la adición de DEAE-Dextran en igual cantidad a los infectados - como testigo. Se incubaron en estufa húmeda de CO₂ a 37°C, y a las 48 horas post inoculación se observaron con un 40% de efecto citopático. El medio de las botellas fué decantado, se lavó el monoestrato con PBS, 7.2 pH y con la ayuda de una espátula de vidrio se levantó cuidadosamente - cada monoestrato y se suspendió en PBS 7.2 pH, la suspensión se centrifugó a 300 RPM en tubos de centrifuga y marcados. Una vez centrifugado, el paquete de cada tubo fué fijado en glutaraldehído al 3% durante una hora en refrigeración . Se volvió a centrifugar a baja velocidad, se tiró el sobrenadante y el paquete fué resuspendido en PBS, 7.2 pH.

Las muestras fueron fijadas en tetróxido de Osmio al 1% amortiguado al 0.1 M a un pH 7.2 y una temperatura de 4°C, durante una hora, se lavaron, y se deshidrataron en alcoholes que iban del 50,70,80,90 y 100% de concentración. Se incluyeron posteriormente en una resina (Araldita), y se esperó a que solidificara. Una vez teniendo el bloque de resina con la muestra incluida se hicieron cortes con el ultramicrotomo a 0.6 micras de espesor y se montaron sobre rejillas de cobre (porta objetos) y se contrastaron con uranilo y citrato de plomo. Una vez contrastadas se observaron en el microscopio electrónico (Phillips EM-300).

Esto se trabajó en el Depto. de Microscopia Electrónica del C.M.N. I.M.S.S.

INOCULACION DE CERDOS CON EL VIRUS AISLADO.

Con 6 cerdos de 2.5 meses de edad se hicieron 2 lotes de 3 cerdos -

cada uno; previamente identificados, se tomó temperatura el día cero de la prueba y se registró. Se inocularon 2 cerdos de cada lote intratraquealmente con el virus aislado y adaptado a cultivo celular y los otros 2 cerdos quedaron como testigos de contagio. (cerdo 5 y 6).

Se tomó temperatura rectal diariamente a lo largo de 22 días se registraron y se graficaron.

El día 22 post inoculación se procedió a sacrificar a los animales que habían presentado más alteración en la temperatura, comportamiento y signología, siendo un inoculado y un testigo. Se sacrificaron con pistola de émbolo de percusión y se desangraron. Una vez desangrados y limpios se procedió a practicar la necropsia.

Se recuperaron pulmones y tonsilas que fueron congeladas a -70°C y otras fijadas en formol al 50% para pruebas histopatológicas.

PRUEBAS HISTOPATOLOGICAS.

De los pulmones y tonsilas recuperadas de la necropsia, una vez fijadas en formol al 50% se pasaron por el proceso normal de histoquímica, se incluyeron en parafina y se hicieron cortes con microtomo. Los cortes fueron montados y teñidos con H.E. (Hematoxilina-Eosina).

PRUEBA DE INMUNOFLOUORESCENCIA.

Se inocularon 4 tubos de Leighton con laminillas cubreobjetos conteniendo cultivo secundario de MDBK, con 0.2 ml del virus aislado y adaptado a cultivo celular; 4 tubos de Leighton con 0.2 ml del virus liofilizado y 4 tubos se dejaron de control. Se incubaron por 24 horas en una estufa húmeda a 36°C y al presentar indicios de efecto citopático, se retiró el medio de cultivo (Medio Eagle y suero libre de gamma globulinas, 2%). Se sacaron las laminillas cubreobjetos con las células y se fijaron en acetona durante 10

minutos, se lavaron en PBS 6 veces y los monoestratos fueron cubiertos por el conjugado SIV 1:60 e incubados en la estufa a 36°C durante 30 minutos, se quitó el exceso de conjugado lavando los cubreobjetos en PBS (1) 6 veces PBS (2) 6 veces y por último en agua deionizada estéril, se dejaron secar y fueron montadas en portaobjetos, una laminilla infectada y una control, utilizando para esto glicerina diluida Vol/Vol con PBS y se observaron al microscopio de inmunofluorescencia.

De los pulmones y las tonsilas recuperadas en la necropsia, con la ayuda de un criótato se hicieron cortes de tejido; estos fueron montados en portaobjetos, fijadas en acetona por 10 minutos y teñidos con el conjugado de SIV, se incubaron por 30 minutos en estufa húmeda a 36°C. Una vez incubados se quitó el exceso de conjugado con PBS a 7.2 pH una vez y cubiertas con cubreobjetos y glicerina diluida Vol/Vol con PBS, se observaron al microscopio de inmunofluorescencia.

RESULTADOS.

INOCULACION Y PASE EN EMBRIONES DE POLLO.

A partir de la muestra original de pulmón de cerdo afectado , después de 5 pases consecutivos inoculando 300 embriones de pollo en saco amniótico , se logró obtener un título de 1×10^{-5} UHA (unidades hemaglutinantes).

Pase 1	1×10^{-1} UHA
Pase 2	1×10^{-2} UHA
Pase 3	1×10^{-2} UHA
Pase 4	1×10^{-2} UHA
Pase 5	1×10^{-5} UHA

Nota: En pase 5 la mortalidad embrionaria, en el día 5 post inoculación fué de 40 %, sin encontrar lesiones en el embrión.

INOCULACION EN CULTIVOS CELULARES.

En el primer intento por aislar el "virus" a partir del material sospechoso, se incubaron células BHK-13Sc1-7 y los resultados fueron negativos en todos los casos.

Se cambió el tipo de células a cultivo secundario de riñón de bovino, se incubaron únicamente con muestra sospechosa (Alícuota) y al día 7 empezó a dar signos de efecto citopático, pero con gran cantidad de células desprendidas en el medio, fué demasiado tiempo y se consideró negativo.

Se empezó a utilizar DEAE-Dextrán para infectar las células en cantidades decrecientes, en botellas de leche.

1er. Pase 1cc de muestra sospechosa + 0.5cc de Dextrán.

2º .Pase 1cc de muestra sospechosa + 0.4cc de Dextrán.

3º . Pase 1cc de muestra sospechosa + 0.3 cc de Dextrán

4º . Pase 1cc de muestra sospechosa + 0.2 cc de Dextrán

SE OBSERVO:

A las 24 horas post inoculación: 20% ECP y pocas células desprendidas

48 horas post inoculación: 50% ECP y gran número de células desprendidas.

73 horas post inoculación: 100% ECP y acumulo de células flotando en el medio.

ECP (efecto citopático). Ver foto 1 y 2.

El control fué unicamente adicionado con DEAE-Dextrán.

EN LOS CERDOS INOCULADOS.

Lo único que mostraron los cerdos inoculados fué un lagrimeo característico (manchas negruscas en comisura interna del ojo) y estornudo de 2 de ellos un solo día. No afectó su crecimiento ni su comportamiento. (Ver cuadro de temperaturas).

A LA NECROPSIA.

CERDO No.4. Petequias distribuidas en todo el parénquima pulmonar.

Hidropericardio.

El resto de los órganos aparentemente normales.

CERDO No.6. Hemorragias petequiales y equimóticas, distribuidas en todo el parénquima pulmonar. Neumonía marcada en la región anteroventral (lóbulo apical y cardiaco) mas marcado en pulmón derecho.

El resto de los órganos aparentemente normales.

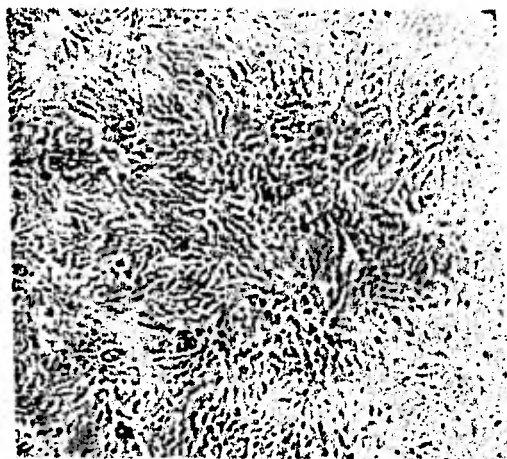


foto 1
cultivo normal

M.A.B.B. Septiembre 1980.

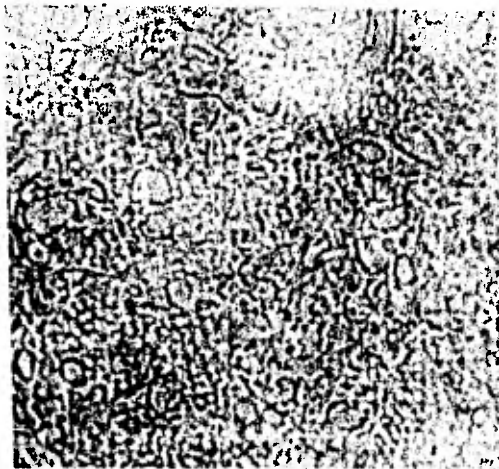


foto 2
cultivo infectado

M.A.B.B. Septiembre 1980.

TEMPERATURAS REGISTRADAS.

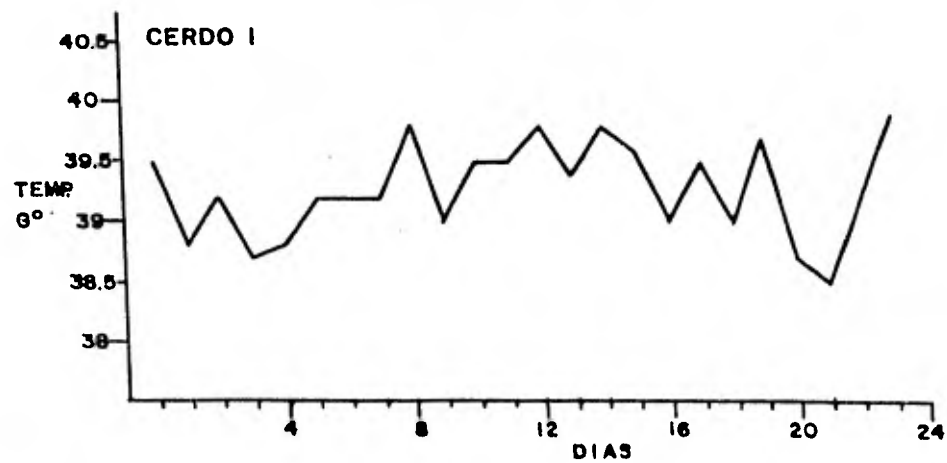
DIA	CERDO INOCULADOS				TESTIGOS		Media
	1	2	3	4	5	6	
0	39.5	38.6	38.8	38.8	40	40	39.23
1	38.8	38.3	39.5	39.4	40.3	38.3	39.1
2	39.2	38.9	39.7	40	39.5	38.9	39.36
3	38.7	38.8	38.9	39	38.8	38.3	38.8
4	38.8	38.9	38.8	38.8	38.9	38.8	38.83
5	39.2	38.9	39.6	40	39.6	39	39.38
6	39.2	39	40	39.6	38.8	39.7	39.38
7	39.2	39.5	38.7	39	38.5	39.5	39.06
8	39.8	40.1	39.4	39.5	39.4	39	39.53
9	39.0	39.4	39.2	39.5	39.5	39.3	39.31
10	39.5	40.1	39.3	40	39.9	39.2	39.7
11	39.5	39.5	39	39.5	39.4	39.4	39.4
12	39.8	40.3	39.3	39	39.6	38.4	39.6
13	39.4	39.6	39.	38.9	39.2	38.8	39.2
14	39.8	38.8	39.1	39.3	39.6	39.2	39.3
15	39.6	39.6	39.5	39.6	39.4	39.5	39.5
16	39.0	39.3	39	39	39.2	39.2	39.11
17	39.5	39.7	39.7	39.5	39.4	39.7	39.58
18	39.0	39.3	39	39.0	39.2	39.2	39.11
19	39.7	39.7	39.1	39.4	39.2	39.7	39.51
20	38.7	39.4	39	39.2	39.2	39.2	39.11
21	38.5	39.2	38.9	39.2	39.2	39.0	39.0
22	39.9	39.7	39.7	39.7	39.9	39.6	39.75

M.A.R.S.

Abril 1981.

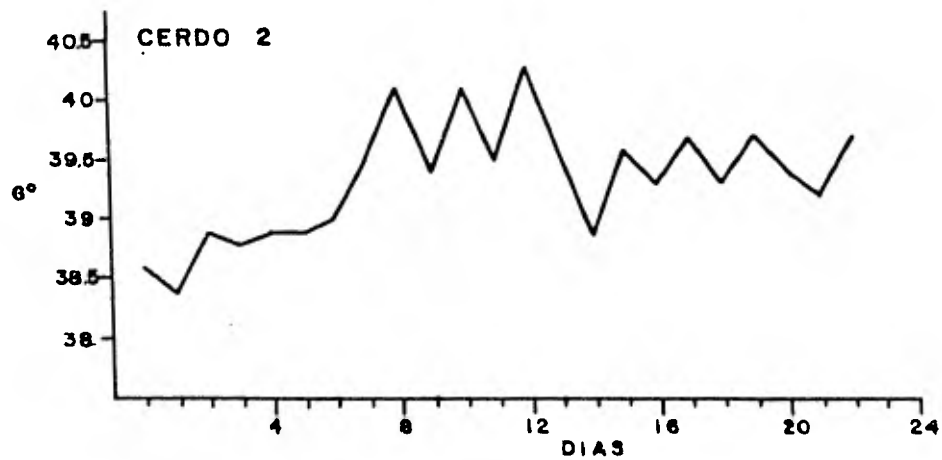
VER GRAFICAS.

fig. 1



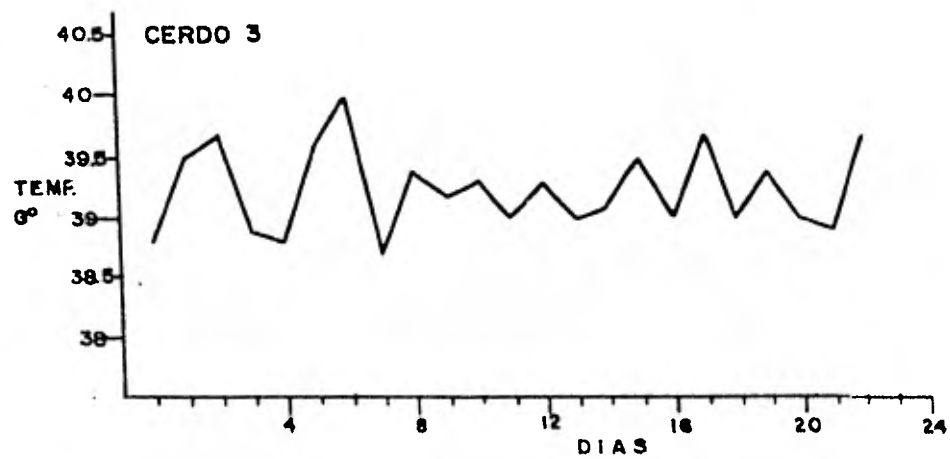
M.A.R.S. Abril 1981.

fig. 2



M.A.R.S. ABRIL 1981.

fig. 3



M.A.R.S. ABRIL 1981.

fig. 4

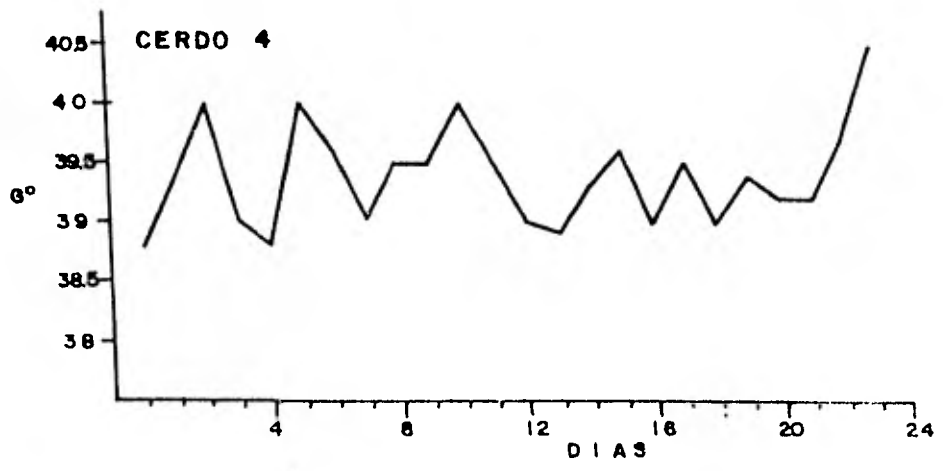
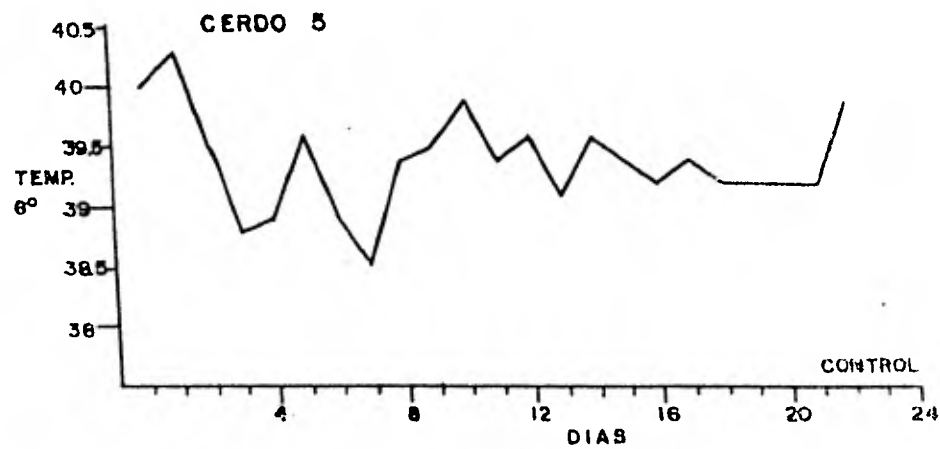


fig. 5



HISTOPATOLOGIA.

En los pulmones se observó:

Aumento en la cantidad de células del epitelio bronquiolar, y dispuestas en forma desordenada. Inflamación del epitelio alveolar con presencia de exudado. Acúmulo de células monocucleares en determinados puntos dentro del parénquima alveolar.

En tonsilas no se observó algo significativo.

HEMOADSORCION.

En las botellas de dilución de leche conteniendo células MDCK infectadas se observó franca adsorción de glóbulos rojos mientras que en el testigo los glóbulos rojos no se adhirieron a las células.

MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Las tinciones negativas hechas para observar líquido amniótico infectado de embrión de pollo fueron negativas, lo único que se observó fué proteínas disgregadas sin la aparición de partículas virales.

En los cortes de células infectadas incluidas en Araldita se observó: Acúmulos electrodensos en todo el citoplasma mostrandonos aparición de matices virales. (M V) Foto 4 y 5.

Mitocondrias deformes, agrandadas y aparición de edema intramitocondrial, algunas mitocondrias rotas.(M) foto 4 y 5 .

Formación de filamentos en todo el citoplasma (G) foto 5.

La membrana celular muy alterada y modificada, debido a la formación y liberación de material viral (encapsulamiento).(Mm) foto 5 y 6.

Próxima a la membrana, se ven claramente viriones liberados en forma esférica y bacilar en tamaños que van de 80 a 120 nanómetros. Al igual que algunos filamentos libres no encapsulados. (V, Fv) foto 5 y 6 .

En las células control no hubo cambios significativos. En ellas puede observarse la presencia de pseudoviriones y detritus celulares que toman la apariencia de matrices virales. (PsV, Dc) foto 3.

INMUNOFLUORESCENCIA.

Las células infectadas y teñidas con el conjugado presentaron inmunofluorescencia en citoplasma, se observaron puntos determinados de inmunofluorescencia en grupos de 2 ó 3 células confluentes, el resto no mostró fluorescencia específica.

En las células control no se observaron citoplasmas fluorescentes, solo hubo precipitado inespecífico.

En los cortes de pulmón se observó aún mas fluorescencia específica. En tonsilas no se observó nada, unicamente precipitados inespecíficos.

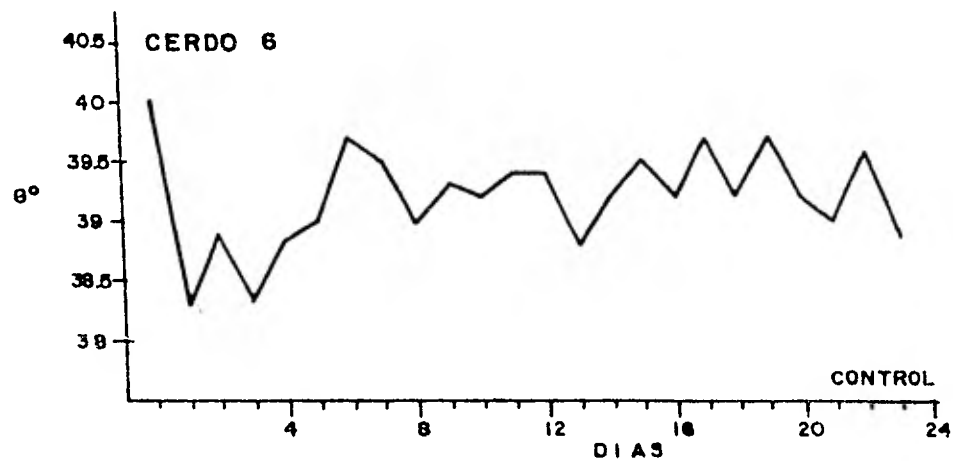


Z

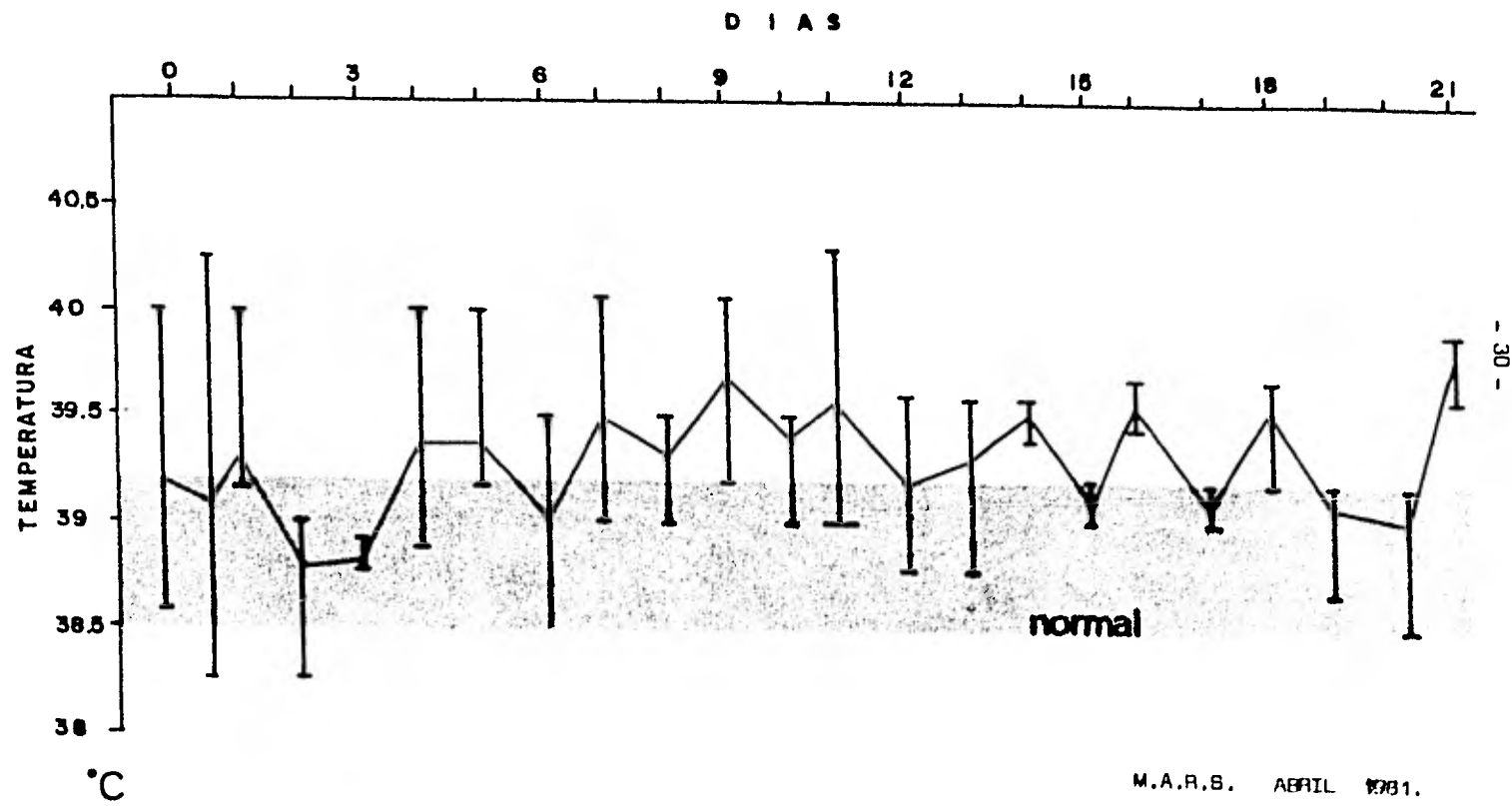
1945 DEC 10

1945 DEC 10

fig. 6



M.A.R.S. ABRIL 1981.



M.A.R.S. ABRIL 1981.

fig. 7



foto 6

PLATE 11111111

PLATE 11111111

DISCUSION.

El hecho de que el agente aislado haya sido un tipo de contaminación en el laboratorio, está completamente descartado ya que nunca antes se había aislado ó identificado un virus con las características y propiedades iguales al que describimos, en el laboratorio o en nuestro país. (21,36).

La inoculación de las muestras sospechosas en embriones de pollo de 10 días de edad causó un retraso en el trabajo en un principio, ya que no había dominio de la técnica descrita ya por Gordon, Nath, Nakamura etc. (11, 19, 20, 27, 28, 30, 31, 33, 34, 37.), además que la viabilidad de los embriones al día 11 de edad llegaba tan solo hasta un 40%. Después de varios intentos y de conseguir continuidad en la técnica se logró obtener un título de 1×10^{-5} UHA, en tubo, al 5º pase, superior al reportado por Cunha y Nath (10, 11, 30).

A partir del líquido amniótico y alantoides positivo a hemoaglutinación se decidió concentrar el agente hemoaglutinante, utilizando el método de hemoaglutinación - elución (21) y el de ultracentrifugación (40). Una vez concentrado el virus se trabajó con microscopio electrónico, se hizo tinción negativa con las muestras y los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, lo único que se observó fué acumulos de proteínas sin ninguna estructura que caracterizara un virus como lo reportaron Coleman y Apostolov (1, 10). Se pensó que lo que estaba fallando era la fuerza centrífuga y el tiempo de centrifugación, o que se tenía un virus con sus estructuras muy débiles por que las gravedades (G) y el tiempo que se manejaron fueron los correctos (26 000 G/1Hr).

Después de varios intentos y de no lograr nada satisfactorio se decidió inocular cultivos celulares primarios como lo hizo Mahendra (24, 25, 44).

Las células infectadas e incluidas en resina, se cortaron y se observaron a microscopio electrónico. Aquí si se vieron las estructuras virales dentro y fuera de las células que coincidió con lo observado por Coleman y Apostolov (1,10).

Utilizando el conjugado específico de influenza porcina, se obtuvo fluorescencia color verde manzana en los citoplasmas de las células infectadas a diferencia de los controles en las que únicamente se observó inmunofluorescencia inespecífica, basándose en la técnica aceptada por la OMS (7). para pruebas de inmunofluorescencia.

Las pruebas de hemoaglutinación en placa, se hicieron con el sobrenadante cosechado de cultivos celulares primarios y con glóbulos rojos de ave y cuye logrando un título de 1024 UHA en los pases 3 y 5. De estos pases celulares fueron tomadas las muestras para la observación a microscopio electrónico. Los títulos obtenidos en microplaca fueron iguales a los reportados por Nath pero superiores a los reportados por Ohis y Schild (30, 31,41), aunque Schild reporta una concentración de 5×10^6 UHA / .25 ml. (40).

CONCLUSIONES.

1. En base a los signos clínicos y la epizootiología desarrollada en la granja Tenoch, de donde fueron recolectados los pulmones sospechosos, y el análisis de datos obtenidos en el laboratorio, se aisló un agente hemoaglutinante, que produce efecto citopático a las 24 horas en cultivo celular, reacciona al ponerlo en contacto con un conjugado específico, hemoadsorciona glóbulos rojos de ganso y que observado al microscopio electrónico y después de inocular lechones y volver a aislar el agente infeccioso. Se concluye que el virus aislado corresponde a un influenza virus.
2. Con esto se confirma la presencia de la influenza porcina, después de haber aislado e identificado el virus de dicha enfermedad, por primera vez en México.

BIBLIOGRAFIA.

1. Apostolov, K., Flewett, T.H.: Further observations on the structure of influenza viruses A and C. *J. gen. Virol.* 4:365-370, (1969).
2. Aymard, H.M., Coleman, M.T., Dowdle, W.R., Laver, W.G., Schild, G.C., Webster, R.G.: Influenza virus neuraminidase inhibition test procedures. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 48:199-202, (1973).
3. Ballarini, G., Rizzi, E.: Aspetti clinici e zoeconomici della sindrome influenzale nell allevamento intensivo del maialo. *Inst. Clin. Med. Vet. Univ. St. Parma.*
4. Barun, K., Noyak, D.P.: Defective interfering influenza viruses and host cells: establishment and maintenance of persistent influenza virus infection in MDBK and Hela cells. *Jour. of Virol.* Dec. 847-859, (1980).
5. Brightman, I.J., Trask, J.D.: Recovery of a filtrable virus from children sick with influenza, 1. Epidemiologic and clinical observations. 2. The experimental disease in ferrets. *Amer. Jour. Des. Child.* 52:67-77 & 78-91, (1936).
6. Buescher, E.L., Smith, T.J., Zachary, I.H.: Experience with Hong Kong influenza in tropical areas. *Bull. Org. Mond. Santé.* 41:387-391, (1969).
7. Bulletin world health organization.: Laboratory techniques for rapid diagnosis of viral infections: a memorandum *Bull. Wld. Hlth. Org.* 55:33-37, (1977).
8. Burnet, F.M.: Influenza virus isolated from an Australian epidemic. *Med. J. Aust.* 2:651-653, (1935).
9. Chapman, M.S., Lamont, P.H., Harkness, J.W.: Serological evidence of continuing infection of swine in Great Britain with an influenza A virus (H3N2). *J. Hyg. Camb.* 80:415-421, (1978).
10. Coleman, M.T., Dowdle, W.R.: Properties of the Hong Kong influenza virus. 1. General characteristics of the Hong Kong virus. *Bull. Org. Mond. Santé.* 41:415-418, (1969).
11. Cunha, R.H., Vargas Vinha, V.R., Da Silva Passos, W.: Isolamento de uma amostra de Myxovirus influenzale A suine de lotão abatido no Rio de Janeiro. *Rev. Brasil. Biol.* 38:13-17, (1978).

12. Dujaric de la Riviere, R., Cheve, J.: Influenza virus in ferrets. Study of different french strains of influenza virus. *Ann. Inst. Pasteur.* 59:445-456, (1937).
13. Easterday, B.C.: Swine influenza, in H.W. Dunne (ed) *Disease of Swine.* Iowa State University, Ames, Iowa, 1970, p. 127-157.
14. Finland, M., Bornes, M.W.: Laboratory experiences with influenza in Boston during the winter 1949-50. *J. Infect. Des.* 97:48-56, (1955).
15. Francis, T.: Immunological relationships of strains of filtrable virus recovered from cases of human influenza. *Proc. Soc. exp. Biol. (NY)* 32:1172-1175, (1936).
16. Francis, T.: Transmission of influenza by filtrable virus. *Science.* 80:457-459, (1935).
17. Francis, T., Magill, T.P.: Direct transmission of human influenza virus to mice. *Proc. Soc. exp. Biol. (NY)* 36:132-133, (1937).
18. Friedewald, W.F., Wiltook, E.: Influenza virus infection in the hamster. A study of innapparent infection and virus adaptation. *J. exp. Med.* 88:343-353, (1948).
19. Gordon, D.W., Eln, J.L.: Transplacental transmission and neonatal infection with swine influenza virus (Hsw1N1) in swine. *Am. J. Vet. Res.* 40:1169-1170, (1979).
20. Gordon, D.W.: Natural history of influenza in swine in Hawaii: swine influenza virus (Hsw1N1) in herds not infected with lung worms. *Am. J. Vet. Res.*, Vol. 40:8, 1159-1164, (1979).
21. Hernández Baumgarten, E., Maquoda Acosta, J.J.: Comunicación personal, (1981).
22. Kasel, J.A., Couch, R.B.: Experimental infections in man and horses with influenza A viruses. *Bull. Org. Mond. Santé.* 41:447-452, (1969).
23. Langmuir, A.D., Housworth, J.: A critical evaluation of influenza—surveillance. *Bull. Org. Mond. Santé.* 41:393-398, (1969).
24. Mahendra, N., Minocha, H.C.: Replication of swine and equine influenza viruses in canine kidney cells. *Am. Jour. Vet. Res.* July: 1059-1061, (1977).

25. Mogabgab, W.J., Green, I.J., Dierkhising, D.C.: Primary isolation and propagation of influenza virus in cultures of human embryonic renal tissue. *Science*. 120:320-321, (1954).
26. Mogabgab, W.J., Green, I.J., Dierkhising, D.C., Phillips, I.A.: Isolation and cytopathogenic effect of influenza B virus in monkey kidney cultures. *Proc. Soc. exp. Biol. (NY)* 89:654-659, (1955).
27. Nakamura, R.M., Easterday, B.C.: Propagation of swine influenza virus in explants of respiratory tract tissues from fetal pigs. *Corn. Vet.* 60:27-35, (1970).
28. Nakamura, R.M.: Serologic studies of swine influenza in Hawaii. *J. Infec. Dis.* Vol. 126(2):210-211, (1972).
29. Ottis, K., Bachman, P.A.: Occurrence of Hsw1N1 subtype influenza A viruses in wild ducks in Europe. *Arch. of. virol.* 63:185-190, (1980).
30. Nath, D.M., Rodkey, L.S., Minocha, H.C.: Antigenic comparison of swine influenza virus isolates. *Arch. of. virol.* 48:245-252, (1975).
31. Pettit, H., Mudd, S.: The Philadelphia and Alaska strains of influenza virus. Epidemic influenza in Alaska in 1935. *J. Am. Med. Assoc.* 106:890-892, (1936).
32. Pirtle, E.C.: Surveillance of Iowa swine herds for influenza like illness: combined serologic and virus isolation method. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 36:1 (1975).
33. Pirtle, E.C.: Preserved chicken erythrocytes for removing sodium-lauryl sulfate and viral haemagglutinin from sodium-lauryl sulfate disrupted swine influenza virions. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 35:1 (1974).
34. Pirtle, E.C.: Incidence of antibody to swine influenza virus in Iowa breeders and butcher pigs correlated with signs of influenza like illness. *Am. J. Vet. Res.* 34:83-85, (1973).
35. Ramírez Necochea, R.: Comunicación personal, (1980).
36. Renshaw, H.W.: Influence of antibody mediated immune suppression on clinical, viral and immune responses to swine influenza infection. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 36:1, (1975).

37. Rittova, V.V.: Characterization of influenza virus strains isolated in 1953 and improvement of the methods of isolating them. *Vop. Virus.* 4, 45: (1954).
38. Roden, A.T.: National experience with Hong Kong influenza in the U.K. 1968-69. *Bull. Org. Mond. Santé.* 41: 375-380, (1969).
39. Schild, G.C., Newman, R.W.: Immunological relationships between the neuraminidase of human and animal influenza viruses. *Bull. Org. Mond. Santé.* 41: 437-445, (1969).
40. Schild, G.C., Pereira, H.G.: Characterization of the Ribonucleoprotein and neuraminidase of influenza A viruses by immunodiffusion. *J. gen. Virol.* 4: 365-363, (1969).
41. Schild, G.C., Pereira, H.G., Chakraverty, P.: Single radial Haemolysis: A new method for the assay of antibody to influenza haemagglutinin. *Wld. Hlth. Org. Bull.* 52: 43-50, (1975).
42. Sharrar, R.G.: National influenza experience in the U.S.A., 1958-59. *Wld. Hlth. Org. Bull.* 41: 361-366, (1969).
43. Shelokov, A., Vogel, J.E., Chi, L.: Haemadsorption (adsorption-haemagglutination) *Proc. Soc. exp. Biol. (NY)* 97: 802-809, (1958).
44. Shope, R.E.: Swine influenza I-Experimental pathology and transmission. *J. exp. Med.* 54: 373-385, (1943).
45. Shope, R.E.: Swine influenza III-filtration experiments and etiology. *J. exp. Med.* 53: 349-359, (1943).
46. Shortridge, K.F., Butterfield, W.K., Webster, R.E., Campbell, C.H.: Isolation and characterization of influenza A viruses from avian species in Hong Kong. *Wlth. Hlth. Org. Bull.* 55: 15-20, (1977).
47. Smith, T.F., Burget, E.O., Dowdle, W.R., Noble, G.R., Campbell, R.J., Van Scoy, R.E.: Isolation of swine influenza virus from autopsy lung tissue of man. *New. Engl. J. Med.* 294: 708-710, (1976).
48. Takatsy, G., Barb, K., Farkas, E.: Isolation of influenza virus strains from animals. *Nature.* 193: 907-908, (1962).

