



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y

ZOOTECNIA

DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA EL  
VIRUS DE INFLUENZA PORCINA SUBTIPO H3N2  
EN DIFERENTES ESTADOS DE LA  
REPUBLICA MEXICANA”

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

**Sendey Chávez Ramírez**

Asesores:

**MC. Rosalba Carreón Nápoles**

**MC. Carmen Mercado García**



MEXICO, D. F. , 2005

M. 342308



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.

## RESUMEN

**SENDEY CHÁVEZ RAMÍREZ.** Determinación de anticuerpos contra el virus de Influenza porcina subtipo H3N2 en diferentes estados de la República Mexicana. (Bajo la asesoría de MC. Rosalba Carreón Nápoles y MC. Carmen Mercado García)

Debido a los pocos estudios sobre la prevalencia del subtipo H3N2 en México, se vuelve importante el generar investigación a este respecto, no solamente en el contexto de bienestar animal, sino considerando el riesgo epidemiológico que implica al hombre el surgimiento de nuevos virus y en consecuencia el surgimiento de nuevas pandemias. La técnica de inhibición de la hemaglutinación fue empleada para establecer los títulos de anticuerpos contra el subtipo H3N2 del virus de Influenza porcina en sueros provenientes de: Coahuila, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, Querétaro, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz y Yucatán. Los resultados serológicos del presente estudio revelaron una seroprevalencia general del 43% (796 sueros positivos) para el subtipo H3N2, siendo el estado de Puebla la entidad con el título más alto de anticuerpos y a su vez la de mayor número de sueros positivos, (85%). El estado con el menor título de anticuerpos y el más bajo porcentaje seropositivo lo presentó Guerrero con el 6%. Se infiere que el subtipo H3N2 del virus de Influenza porcina está presente en la población de cerdos en México. La frecuencia de anticuerpos contra el virus de Influenza porcina subtipo H3N2 es amplia, indicando de este modo que en la mayoría de las poblaciones de cerdos hay reacción inmunológica contra este subtipo.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
Origen del término influenza.....	2
Etiología.....	4
Historia de la enfermedad.....	6
Epidemiología.....	7
Patogenia.....	10
Signos y lesiones.....	11
Respuesta inmune.....	12
Diagnóstico de laboratorio.....	14
Identificación del agente.....	14
Detección de anticuerpos.....	15
Vacunas.....	17
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	19
<b>II. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	20
Sueros examinados.....	20
Prueba serológica.....	21
Preparación del virus.....	22
Lavado de eritrocitos.....	23
Controles.....	23
Unidades hemaglutinantes.....	24

Análisis de la información.....	24
<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
Puebla.....	26
Veracruz.....	27
Jalisco.....	28
Morelos.....	29
Sinaloa.....	30
Estado de México.....	31
Michoacán.....	32
Sonora.....	33
Tabasco.....	34
Nuevo León .....	35
Tlaxcala.....	36
Coahuila.....	37
Yucatán.....	38
Querétaro.....	39
Guanajuato.....	40
Guerrero.....	41
<b>IV. DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>VI. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>46</b>

## LISTA DE FIGURAS

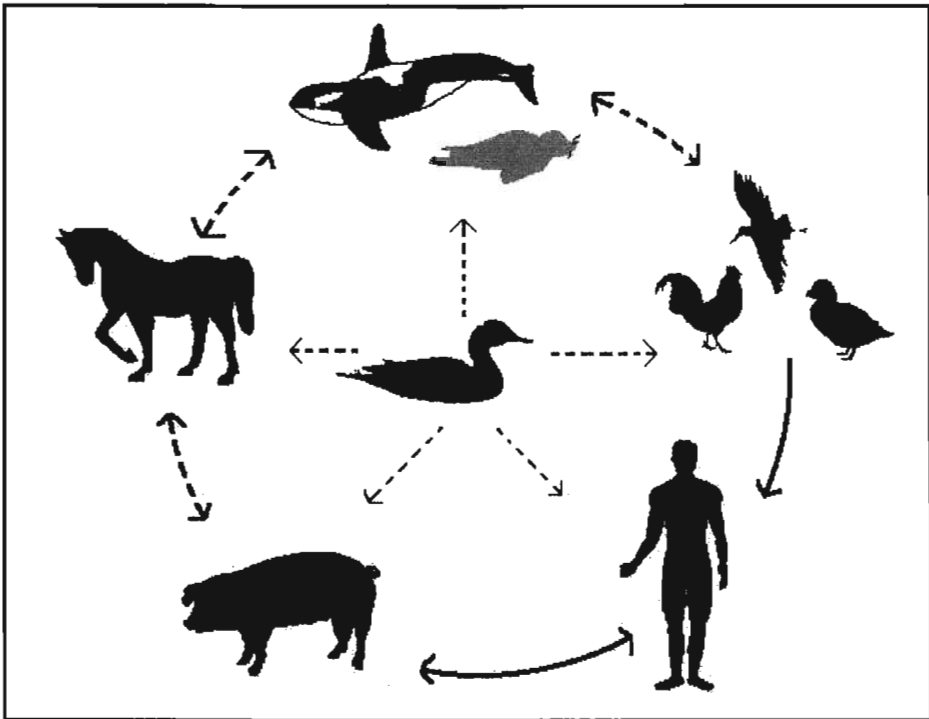
	<b>Página</b>
1: Transmisión del virus de Influenza tipo A entre distintas especies. ....	2
2: Diferentes subtipos del virus de Influenza tipo A.....	3
3: Estructura del virus de Influenza tipo A.....	4
4: Títulos de anticuerpos contra el subtipo H3N2.....	20
5: Títulos de anticuerpos contra el subtipo H3N2 del virus de influenza.....	20
6: Porcentaje de sueros positivos por Estado para el subtipo H3N2.....	25
7: Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Puebla.....	26
8: Porcentaje de positividad Estado de Puebla.....	26
9 : Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Veracruz.....	27
10: Porcentaje de positividad Estado de Veracruz.....	27
11: Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Jalisco.....	28
12: Porcentaje de positividad Estado de Jalisco.....	28
13: Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Morelos.....	29
14: Porcentaje de positividad Estado de Morelos.....	29
15: Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Sinaloa.....	30
16: Porcentaje de positividad Estado de Sinaloa.....	30
17: Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de México.....	31
18: Porcentaje de positividad Estado de México.....	31
19: Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Michoacán.....	32
20: Porcentaje de positividad Estado de Michoacán.....	32
21: Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Sonora.....	33
22: Porcentaje de positividad Estado de Sonora.....	33
23: Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Tabasco.....	34
24: Porcentaje de positividad Estado de Tabasco.....	34

<b>25:</b> Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Nuevo León.....	35
<b>26:</b> Porcentaje de positividad Estado de Nuevo León.....	35
<b>27:</b> Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Tlaxcala.....	36
<b>28:</b> Porcentaje de positividad Estado de Tlaxcala.....	36
<b>29:</b> Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Coahuila.....	37
<b>30:</b> Porcentaje de positividad Estado de Coahuila.....	37
<b>31:</b> Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Yucatán.....	38
<b>32:</b> Porcentaje de positividad Estado de Yucatán.....	38
<b>33:</b> Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Querétaro.....	39
<b>34:</b> Porcentaje de positividad Estado de Querétaro.....	39
<b>35:</b> Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Guanajuato.....	40
<b>36:</b> Porcentaje de positividad Estado de Guanajuato.....	40
<b>37:</b> Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Guerrero.....	41
<b>38:</b> Porcentaje de positividad Estado de Guerrero.....	41

## I. INTRODUCCIÓN

### Origen del término influenza





La "*influenza delle stelle*" o influencia de las estrellas, es el término que se utilizó en Italia en el siglo XV, para describir a una de las primeras epidemias respiratorias que se presentan en el ser humano (1,2). No es una enfermedad que afecte exclusivamente nuestra especie, ya que a lo largo del tiempo, el virus se ha adaptado a nuevos hospedadores como son aves silvestres, mamíferos marinos (3), caballos y en modo peculiar al cerdo (Figura 1).



**Figura 1:** Transmisión del virus de Influenza tipo A entre distintas especies.



Conforme los virus de influenza se diseminan a través de las poblaciones, tanto animal como humana, éstos sufren mutaciones y selección por lo que gradualmente cambian la estructura de sus antígenos de superficie. Dos o más cambios de aminoácidos en diferentes sitios de estas proteínas de membrana son suficientes para dar lugar a cambios antigénicos significativos. Este cambio gradual se denomina variación antigénica, y permite al virus persistir durante muchos años en distintas poblaciones (4,5). Así, los anticuerpos contra un tipo o subtipo del virus dan como resultado poca o ninguna protección contra otro tipo o subtipo diferente de virus (Figura 2).

ESPECIE	SUBTIPO
	H1N1, H2N2, H3N2
	H3N8, H7N7
	H1N1, H5N1, H9N2
	H1N1, H3N2, H1N2

**Figura 2:** Subtipos del virus de Influenza tipo A en distintas especies.

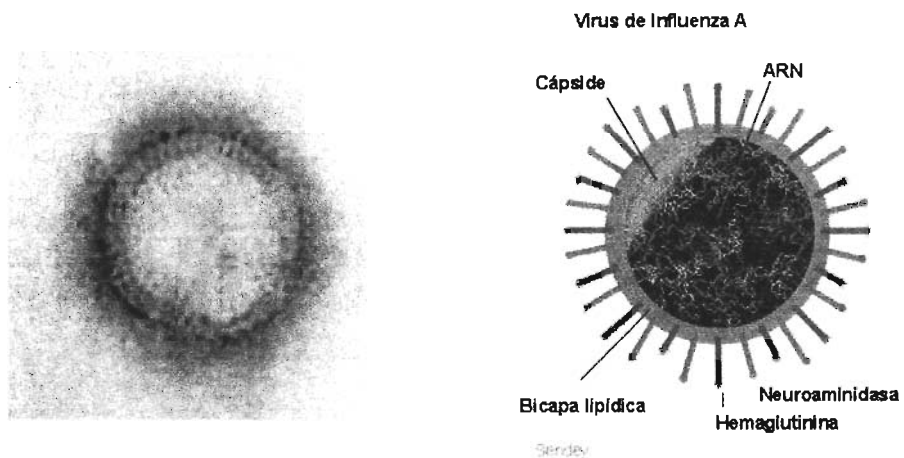
Además de la variación antigénica, los virus de Influenza muestran de manera esporádica un desplazamiento antigénico que se da de manera abrupta. Cuando este cambio radical ocurre, surge un nuevo serotipo cuyos antígenos de superficie no muestran relación evidente con los antígenos conocidos. Este tipo de cambio no se da por mutación, sino cuando hay una recombinación entre dos serotipos distintos. Estos virus nuevos suelen ser muy virulentos y son los responsables de las severas epidemias mundiales, conocidas como pandemias (4).

Los cambios antigénicos ocurren principalmente en las dos glicoproteínas externas del virus (hemaglutinina y neuroaminidasa), de este modo, el subtipo H3N2 se encuentra de dos formas distintas: doble recombinación, que contiene segmentos genéticos tanto de virus humano como de cerdo, y triple recombinación, el cual contiene segmentos de virus humano, cerdo y ave (4,5).

### **Etiología**

La influenza porcina es una enfermedad respiratoria infecciosa de curso agudo que es producida por un orthomixovirus tipo A (Figura 3). En la familia *Orthomyxoviridae* existen otras dos especies de virus de influenza, los tipos B y C que corresponden a tipos humanos.

Su clasificación se basa en las diferencias antigénicas de su nucleocápside y la proteína de matriz (6).



**Figura 3:** Fotografía electrónica y estructura del virus de Influenza tipo A.

El virus de influenza posee genoma ARN (ácido ribonucleico), es pleomórfico, pero generalmente posee forma esférica; mide de 80-120 nm de diámetro; es un virus envuelto cuya membrana lipídica se deriva de la membrana de la célula infectada. Desde la superficie se extienden dos glicoproteínas transmembranales denominadas "Spike", las cuales representan los antígenos de superficie de mayor importancia, y se dividen en dos grupos distintos, hemagglutininas (H) y neuroaminidasas (N). La hemagglutinina es responsable de la unión del virus a las células y provoca la aglutinación de eritrocitos. La neuroaminidasa juega un papel importante en la liberación del virus desde células infectadas (6,7). Las características antigénicas de las dos glicoproteínas de superficie, hemagglutinina y neuroaminidasa, permiten dividir al virus de influenza tipo A en diferentes subtipos, hasta el momento se han identificado 15 hemagglutininas y 9 neuroaminidasas. Ambos antígenos se encuentran siempre presentes en un virus, sin embargo, una sola variante de hemagglutinina y neuroaminidasa puede ser encontrada a la vez, y la combinación de ambas variantes recibe la denominación de subtipo. Los subtipos de mayor relevancia en la especie porcina son el H1N1 y el H3N2. La propiedad aglutinante del antígeno hemagglutinina, descrita por Hirst en 1941, ayudó a desarrollar una técnica de detección de anticuerpos específicos contra este virus, la cual es utilizada hasta hoy (1).

Los anticuerpos dirigidos hacia la hemagglutinina previenen la infección con un virus que contenga las mismas hemagglutininas, mientras que los anticuerpos dirigidos a la neuroaminidasa restringen la salida del virus de células infectadas (6,7).

### **Historia de la enfermedad**

La influenza porcina se describió por primera vez en 1918 en los Estados Unidos, donde se reportaron signos clínicos y patologías similares a la enfermedad en humanos, sin embargo, el virus se aisló e identificó hasta el año de 1930 (6,7).

La aparición de influenza en cerdos coincidió con la pandemia de influenza en humanos (gripe española), que causó la muerte en 1918 a millones de personas en el mundo. En Europa entre 1940 y 1950, ya había evidencia de la enfermedad, sin embargo ésta se reportó hasta 1976, cuando reapareció clínicamente en Italia. (6,7)

El virus responsable de estos brotes estaba estrechamente relacionado con el H1N1 clásico, el cual se había identificado ya en los Estados Unidos.

Durante un brote en Europa en 1979 se aisló un virus, que en un principio se creyó que se trataba de un H1N1 clásico, sin embargo su hemaglutinina estaba más relacionada con una H1 de origen aviar; por lo que se concluyó que el virus había sido transmitido de los patos silvestres a los cerdos (6,7).

El subtipo H1N1 clásico, se ha reportado en pocos países europeos, y lo han reemplazado, en su mayoría, los subtipos aviares.

El subtipo H3N2 fue transmitido de humanos a cerdos en Hong Kong durante la pandemia de 1968 (8).

La recombinación de virus aviares y humanos en los cerdos ha dado lugar, subsecuentemente, a la transmisión de éstos nuevos subtipos virales a población humana; pero la transmisión de cepas humanas a porcinos puede ocurrir bajo condiciones naturales por cambios en los genes que codifican para la hemaglutinina y la neuroaminidasa, ya que existen receptores de membrana comunes a ambas especies; lo cual facilita la adhesión de los virus y el continuo intercambio de subtipos con aumento de su virulencia (8,9).

Estos receptores en las células epiteliales del sistema respiratorio, comparten ambos subtipos virales, tanto aviar (H1N1) como humano (H3N2), y es la única especie animal que puede ser infectada con los dos virus de Influenza. El cerdo así, tiene un papel importante al proveer el medio en donde los eventos de recombinación genética y cambios antigénicos tienen lugar (8,9).

La recombinación se da al segmentarse el RNA durante una infección conjunta con diferentes serotipos de influenza tipo A; esta particularidad del virus hace que la evolución y diversidad de la enfermedad se vea incrementada al surgir nuevos subtipos virales (7,8). En este sentido, la hemaglutinina y la neuroaminidasa que componen a otro subtipo, el H1N2, se derivaron de segmentos genéticos de H1N1 y H3N2, que estuvieron circulando tanto en población aviar como humana (8,9).

En 1999 se aisló de los cerdos un subtipo H3N2 con estrecha relación genética al virus humano contemporáneo, y este ha sido responsable de brotes en Estados Unidos que se reportaron en 1998 (9,10).

La importancia del surgimiento de nuevos subtipos del virus de influenza, radica en el potencial que tienen éstos para dar origen a epidemias humanas; así como la disminución en la productividad animal a consecuencia de la predisposición a enfermedades de origen bacteriano (10,11,12).

### **Epidemiología**

Todos los subtipos del virus de Influenza se encuentran en aves acuáticas y silvestres, las cuales actúan como reservorios de éste siendo las acuáticas el principal reservorio de los 15 subtipos de los virus de influenza tipo A.

En los patos silvestres, el virus coloniza las células intestinales sin causar signos de la enfermedad, excretándose en altas concentraciones por las heces. Estos virus se han logrado aislar del agua de lagos, lo que indica que las aves acuáticas tienen gran potencial para transmitir el virus, contaminando las fuentes de agua que pueden ser de uso tanto humano como animal (13).

Una gran cantidad de patos jóvenes susceptibles emigran cada año a través del mundo, muchos de los cuales son infectados por la presencia del virus en el agua. Esto se evidencia por la alta incidencia de la infección en los patos canadienses, que llegan a ser hasta un 30%, lo que esto ocurre antes de su migración (13,14).

La naturaleza del virus para no producir enfermedad en las aves, es el resultado de la adaptación de éste durante muchos años, lo cual asegura su sobrevivencia en la naturaleza.

Los estudios realizados en la ecología viral llevan a la conclusión de que todos los diferentes virus de influenza de mamíferos, derivan del virus aviar. Esto se basa en el análisis filogenético de las secuencias de ácido ribonucleico de los virus de Influenza tipo A y sus subtipos en una variedad de regiones geográficas.

Los análisis del gen de la nucleoproteína (NP) han dado a conocer que los virus aviares se han desarrollado en distintos periodos y en distintas especies a la especie aviar: equino antiguo, equino contemporáneo; cerdo y humano (13,14).

Los virus humanos y de los cerdos tienen una estrecha relación genética que muestra que se desarrollaron de un origen común, el antepasado de ambos virus parece haber sido un virus aviar.

Los estudios hechos sobre la nucleoproteína viral, muestran que los subtipos de Influenza encontrados en Europa y Asia son diferentes a los encontrados en América, esto demuestra que las aves migratorias que se mueven entre estos continentes (migración latitudinal), tienen poco o ningún papel en la transmisión de la enfermedad; mientras que las aves que emigran longitudinalmente, parecen desempeñar un papel dominante en el proceso de continuación de la evolución viral (13,14).

El análisis filogenético de los cambios en los aminoácidos que componen al ácido ribonucleico del virus (ARN), muestra que los virus aviáres tienen un perfil evolutivo bajo, es decir una fase estacionaria sin evidencia de evolución neta en los últimos 60 años, lo que no ocurre en los virus de las otras especies.

El alto nivel de conservación genética sugiere que los virus aviáres se han acercado o ya han alcanzado un grado óptimo de estabilidad, en donde los cambios de un nucleótido no proporcionan ninguna ventaja selectiva al virus.

Esto significa que la fuente de los genes, para los virus que han producido las pandemias mundiales, ha estado filogenéticamente sin cambios en el reservorio acuático de las aves (13,14).

La implicación más importante de estos estudios es que los virus ancestrales que causaron la gripe española en 1918, así como los virus de las pandemias de Asia en 1957 y de Hong Kong en 1968, todavía están circulando en aves silvestres, con poco o ningún cambio mutacional.

Gran parte de la epidemiología de la Influenza se puede explicar en el contexto de su genoma segmentado. Al incorporarse periódicamente hemaglutininas y neuroaminidasas provenientes de virus animales, se producen nuevas glicoproteínas de superficie (variación antigénica) contra las cuales, una población no tiene anticuerpos específicos. Esta variación es el origen de las pandemias (14).

El conocimiento de la nomenclatura de los virus de Influenza permite una mejor comprensión de estos acontecimientos. La designación de una cepa de Influenza tipo A incluye el serotipo principal de la hemaglutinina y neuroaminidasa, el lugar, mes y el año de aislamiento, por ejemplo H3N3/Sidney/5/97 (14).

La infección de cerdos con los subtipos H1N1 y H3N2, ocurre bajo condiciones naturales.

Desde que se reportó la transmisión del virus de humanos a cerdos en 1968 en Hong Kong, el subtipo H3N2 ha sido aislado regularmente de los cerdos en años subsecuentes; además de que se demostró la presencia de anticuerpos en cerdos de varias partes del mundo. En Europa las pruebas serológicas revelan una prevalencia del subtipo H1N1 y H3N2 respectivamente: 92% y 57% en Bélgica (1996); 73% y 62% en España (1992); 55% y 51% en Alemania (1993) y 60% y 30% en Países Bajos (15).

### **Patogenia**

La presencia del virus en el cerdo y los frecuentes intercambios entre esta especie y otras, se facilita por las prácticas de manejo, en las cuales el movimiento de cerdos da lugar al contacto con poblaciones susceptibles, incluyendo aves y humanos. (8,9)

La enfermedad ocurre con más frecuencia en las etapas de crecimiento-finalización, dando inicio al complejo respiratorio porcino.

El virus de Influenza es transmitido por contacto directo vía nasofaríngea por medio de aerosoles, y es la ruta primaria de transmisión. La infección generalmente se limita al tracto respiratorio, y la viremia rara vez ocurre. El virus se replica en la mucosa nasal, tonsilas, tráquea y en linfonodos bronquiales y pulmonares; los pulmones parecen ser el órgano blanco de más importancia.

Después de un período de incubación de 1-3 días, el virus es llevado en las secreciones nasales durante la etapa febril aguda de la enfermedad; donde se manifiestan signos tales como fiebre, anorexia, postración, conjuntivitis y descargas nasales. La producción de citocinas como la Interleucina 1 y el factor de necrosis tumoral, contribuyen a los cambios inflamatorios en el pulmón. La excreción del virus dura aproximadamente 6 días. La morbilidad es del 100%, mientras que la mortalidad es muy baja, 1% (6,14).



### **Signos y lesiones**

Después de un periodo de incubación de 24 a 72 horas, el inicio de la enfermedad es súbito. Los animales afectados muestran anorexia, inactividad, postración y se amontonan entre ellos; se observa respiración abdominal, sobretodo cuando se les obliga a moverse, además de que puede haber un paroxismo de tos seca y áspera. La fiebre, usualmente se encuentra en rangos de 40.5 a 41.7°C; se puede presentar conjuntivitis, descargas nasales y estornudos. La pérdida de peso resulta obvia debido a la anorexia y la inactividad. Estos signos clínicos de un típico brote de influenza porcina, generalmente se limitan a cerdos susceptibles seronegativos. La recuperación comienza de 5 a 7 días después de que se presentó el brote (6,14).

La severidad de la enfermedad depende de la inmunidad materna, cepa viral, ruta de inoculación y las infecciones secundarias de origen bacteriano tales como *Actinobacillus pleuroneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* y *Streptococcus suis* tipo 2.

Los subtipos H1N1 clásico y el H3N2 en los cerdos, producen lesiones mínimas en el pulmón que se manifiestan como una neumonía intersticial poco severa, limitada a los lóbulos craneales y medios en donde se aprecia edema interlobular y áreas de consolidación; mientras el subtipo aviar H1N1 produce lesiones y cambios histopatológicos más severos tales como pleuritis fibrinosa y necrosis del epitelio bronquial; el lumen de bronquios, bronquiolos y alvéolos se encuentra con exudado que contiene células descamadas, neutrófilos y monocitos. Se puede observar hiperemia variable por la dilatación de capilares e infiltración de los septos alveolares con linfocitos, histiocitos y células plasmáticas (6,14).

### **Respuesta Inmune**

Aunque existen diferencias limitadas entre la respuesta inmune en cerdos y humanos, los mismos mecanismos generales aplican en ambos organismos; además de que el curso de la infección con el virus de Influenza tipo A en cerdos, es similar al del humano.

Los mecanismos de defensa inespecíficos incluyen la producción de citocinas, particularmente los interferones, y la activación de células asesinas naturales (NK), las cuales destruyen a las células infectadas por el virus, limitando la replicación y propagación de éste.

Los interferones se producen en los primeros momentos de la infección por las células infectadas, éstos reducen la diseminación del virus al inducir un estado antiviral que interfiere con la síntesis del ARN y las proteínas virales (16).

Los mecanismos de defensa específicos son la inmunidad humoral mediada por los anticuerpos o inmunoglobulinas y la inmunidad celular, mediada por linfocitos.

Los anticuerpos que se producen como resultado de la exposición del sistema inmunocompetente al virus, son dirigidos contra los antígenos de superficie viral hemaglutinina (H) y neuroaminidasa (N); pero también se producen anticuerpos contra la nucleoproteína (NP) y la proteína de matriz (M) del virus. Los anticuerpos contra la hemaglutinina son altamente efectivos para resistir o finalizar la infección por el virus de Influenza, mientras que los anticuerpos que se dirigen contra la nucleoproteína o la proteína de matriz no lo son (17).

Cuando ha ocurrido la infección por el virus, las inmunoglobulinas IgM son las primeras en producirse, seguidas por las IgA y finalmente IgG.

Las IgM son muy eficaces para agregar a los virus y mediar la lisis de células infectadas por la vía clásica del complemento; mientras que las IgA su principal función es la de envolver a los viriones que han sido liberados de las células

Infectadas, y promover la fagocitosis por los neutrófilos polimorfonucleares (PMN), además de mediar la lisis celular por la vía alterna del complemento (18).

Las IgG pueden envolver los viriones promoviendo la fagocitosis por neutrófilos polimorfonucleares y macrófagos, además de ayudar en la lisis celular mediada por la vía clásica del complemento. Estos anticuerpos IgG, son transmitidos de la madre al lechón mediante el calostro, y es la única vía natural para adquirirlos, ya que la placenta epiteliocorial del cerdo no permite el paso de inmunoglobulinas entre la sangre materna y fetal, por lo que es necesario que el lechón consuma el calostro durante las primeras 12 a 24 horas de nacido, cuando aun es permeable el intestino. En los animales domésticos hay diferencia en la selectividad y duración de la permeabilidad intestinal, en el cerdo se absorbe preferentemente anticuerpos IgG e IgM, mientras que la IgA permanece casi en su totalidad en el intestino. Las inmunoglobulinas, una vez unidas a su receptor en los enterocitos, son absorbidas por pinocitosis llegando a los capilares intestinales alcanzando así la circulación sanguínea (18,19).

En los cerdos recién nacidos, el grado de actividad proteolítica en el aparato digestivo es bajo, y se reduce aun más por los inhibidores de tripsina en el calostro, de este modo las inmunoglobulinas y otras proteínas del calostro no son degradadas ni usadas como fuente alimenticia.

Estas inmunoglobulinas brindarán protección al lechón durante los primeros 3 –4 meses de vida, que es la edad en la que el cerdo alcanza su madurez inmunológica, aunque la duración de la inmunidad pasiva dependerá de factores tales como la edad de inmunización de la madre, que está directamente en relación con la concentración de anticuerpos en el calostro, y la cantidad de anticuerpos absorbidos, relacionado con la adecuada ingestión de calostro (18,19).

La respuesta inmune celular en la infección por influenza, involucra la acción de los linfocitos T auxiliares (CD4) que estimulan la producción de inmunoglobulinas, citocinas y de linfocitos citotóxicos (CD8). Estas células auxiliares, específicas para nucleoproteína y proteína de matriz, estimulan a los linfocitos B, los cuales producirán anticuerpos específicos para la hemaglutinina viral (16).

La inmunidad contra el virus se establece una vez que el cerdo se ha recuperado de la infección primaria. La cantidad de IgG continuarán circulando durante un tiempo considerable, mientras que la cantidad de IgA en el tracto respiratorio y de los linfocitos auxiliares y citotóxicos en circulación sanguínea, irá descendiendo gradualmente, en tanto que el sistema inmune ha hecho memoria para reconocer al virus de influenza en una segunda infección, siempre y cuando los antígenos de superficie, hemaglutinina y neuroaminidasa sean los mismos del virus al cual el cerdo fue expuesto primariamente (18).

### **Diagnóstico de laboratorio**

#### **Identificación del agente**

La detección del virus o antígenos virales, en animales clínicamente afectados, se considera un diagnóstico definitivo para la influenza porcina.

La identificación del virus se realiza mejor con muestras coleccionadas dentro de las 24–48 horas de presentarse los signos clínicos de la enfermedad. El cerdo de elección es aquel que no haya recibido algún tratamiento y con una temperatura rectal elevada; así el virus puede ser realmente detectado en el tejido pulmonar o en secreciones nasales (20).

El virus puede ser aislado a partir de exudado nasal y faríngeo mediante la inoculación de embriones de pollo de 9-11 días, o en líneas celulares susceptibles como MDCK (Madin–Darby canine kidney), células de riñón de cerdo (PK); testículo de cerdo y células epiteliales de pulmón de cerdo. El efecto citopático del virus se observa en las células o en el fluido alantoideo (20).

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido desarrollada para el diagnóstico del virus de influenza porcina, aunque su uso todavía es muy limitado. Una prueba similar, la PCR de transcripción inversa (RT-PCR assays) se emplea para demostrar las secuencias específicas de los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2, con gran exactitud (20,21).

La inmunohistoquímica se realiza con muestras de tejido fijadas con formalina, y la prueba con anticuerpos fluorescentes (inmunofluorecencia) puede llevarse a cabo con tejidos frescos. Otro método diagnóstico es la ELISA de captura de antígeno (Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assays), aunque su uso comercial es para el diagnóstico del virus de influenza humano. Este tipo de pruebas han sido utilizadas para la detección viral en tejidos pulmonares y secreciones nasales (20,21).

#### **Detección de anticuerpos**

Las pruebas serológicas son empleadas para detectar animales que han sido expuestos al virus, ya que la enfermedad es de curso agudo y resulta difícil la detección del agente causal. Estas pruebas serológicas también se usan para determinar el estado inmune de cerdos en diferentes edades, el nivel inmunológico de la pira o bien los niveles de anticuerpos vacunales (22).

Los subtipos de hemaglutininas y neuroaminidasas son determinados por Inhibición de la hemaglutinación (IH), y la inhibición de la neuroaminidasa, respectivamente. La inhibición de la hemaglutinación es la prueba más usada; su ventaja radica en que puede distinguir entre los diferentes determinantes antigénicos del virus (9,21).

Esta prueba ha sido un método confiable para la determinación de los niveles de anticuerpos de cerdos para caracterizar a los subtipos H1N1 y H3N2 del virus de la influenza porcina en los Estados Unidos. Más de 4, 000 sueros de cerdos en 23 estados de los Estados Unidos fueron utilizados con esta prueba diagnóstica,

revelando un 28% de cerdos seropositivos para el subtipo H1N1 y 20% para el subtipo H3N2 (23).

Pruebas serológicas adicionales son: inmunodifusión en agar, inmunofluorescencia indirecta, seroneutralización y ELISA.

Una prueba de ELISA comercial para detectar anticuerpos contra el virus de Influenza Porcina H1N1, fue comparada con la IH. Los resultados mostraron que la IH y ELISA detectaron anticuerpos en 11 y 6, respectivamente, de 72 muestras de sueros de cerdos infectados en forma experimental con una cepa aislada en 1992 (A/Swine/IA/40776/92). La presencia de anticuerpos en estas muestras experimentales fue confirmada por otras pruebas de IH en los cuales las 72 muestras realizadas anteriormente, fueron positivas contra un virus homólogo, el más recientemente aislado en EU en 1999 (24).

La prueba de inhibición de la hemaglutinación sigue siendo un método confiable para la determinación de anticuerpos contra el virus de influenza porcina, y es utilizada en varios países, tanto de Europa como de América (25, 26, 27).

Las proteínas específicas de los anticuerpos dirigidos al virus de influenza se pueden determinar por la prueba "Western Immunoblot Análisis", usando antígenos virales (22).

Una prueba de inmunoperoxidasa (Immunoperoxidase Monolayer Assay), ha sido desarrollada para detectar anticuerpos contra el virus de influenza en cerdos, y esta puede detectar anticuerpos contra los subtipos H1N1 y H3N2 (28).

Se ha desarrollado una prueba de ELISA para detectar anticuerpos en sueros de cerdos previamente expuestos a la enfermedad, usando el antígeno purificado de la hemaglutinina de los subtipos H1N1 y H3N2, aunque no es posible diferenciar entre ambos, por lo que para ello se requiere el uso de la IH (29).

**Vacunas**

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

Se han usado otro tipo de vacunas a base de ADN viral usando el subtipo H1N1 (12). Algunas otras incluyen un adenovirus con ADN recombinante que expresa los genes que codifican para la hemaglutinina H3 y la nucleoproteína del virus de influenza subtipo H3N2 (30,31,32).

Las vacunas con un solo serotipo, H1N1 o H3N2, no protegen al cerdo contra la replicación viral del subtipo H1N2, pero se ha demostrado que la aplicación de una vacuna bivalente con H1N1 y H3N2, brinda una sólida protección contra el subtipo H1N2 en pruebas de desafío. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los anticuerpos maternos (para H1N1 y H3N2), no protegen al lechón contra una infección por el subtipo H1N2, en contraste con la protección que se observa en cerdos que desarrollan inmunidad activa (34).

**HIPÓTESIS**

En los últimos años han sido reportadas nuevas variedades antigénicas del virus de Influenza porcina, tanto en EU como en Europa. Dada la situación geográfica de México, y la importación de pie de cría, el subtipo H3N2 está presente en cerdos del país.



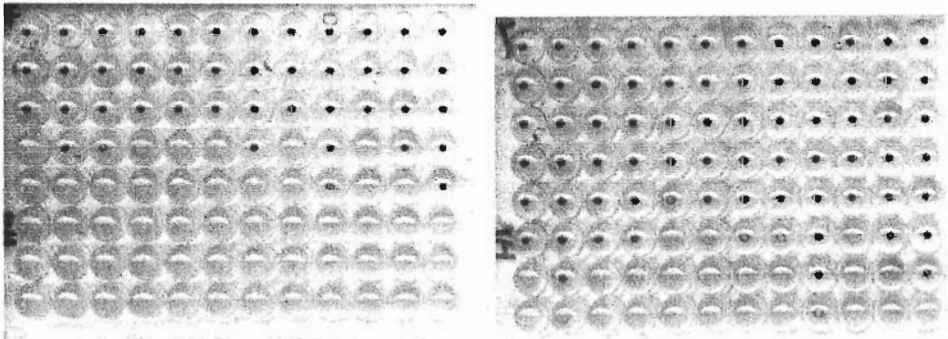
## **OBJETIVOS**

- Determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de Influenza porcina subtipo H3N2, en sueros de origen porcino procedentes de distintos estados de la República Mexicana.
- Obtener los rangos de títulos de anticuerpos por estado contra el virus de Influenza porcina subtipo H3N2.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1- Sueros examinados





Las muestras correspondieron al banco de sueros del Departamento de Producción Animal: Cerdos de la FMVZ en la UNAM, de los años 2003 y 2004. De los cuales se seleccionaron sueros de cerdos de pie de cría procedentes de distintos estados de la República Mexicana: Coahuila 100 sueros de 7 granjas; Estado de México 95 sueros de 7 granjas; Guanajuato 90 sueros de 5 granjas; Guerrero 120 sueros de 4 granjas; Jalisco 150 sueros de 6 granjas; Michoacán 120 sueros de 6 granjas; Morelos 30 sueros de 2 granjas; Nuevo León 135 sueros de 7 granjas; Puebla 140 sueros de 4 granjas; Querétaro 90 sueros de 3 granjas; Sinaloa 183 sueros de 3 granjas; Sonora 125 sueros de 4 granjas; Tabasco 132 sueros de 6 granjas; Tlaxcala 100 sueros de 4 granjas; Veracruz 150 sueros de 6 granjas y Yucatán 90 sueros de 3 granjas.



**Figura 4 y 5:** Diferentes títulos de anticuerpos contra el subtipo H3N2 del virus de influenza porcina.

## 2- Prueba serológica

Los anticuerpos fueron detectados mediante la prueba de Inhibición de la hemaglutinación (IH), conforme al protocolo de Snyder M.L. (33) (figura 5.6; cuadro 1).

Controles	Contenido	Interpretación	
<b>POSITIVO</b>	<b>Suero +, PBS, Ag, eritrocitos</b>	<b>Unión Ag-Ac = sedimentación</b>	
<b>NEGATIVO</b>	<b>Suero -, PBS, Ag, eritrocitos</b>	<b>No hay Ac = hemoaglutinación</b>	
<b>VIRUS</b>	<b>PBS, Ag y eritrocitos</b>	<b>Unión del Ag a los eritrocitos = hemoaglutinación</b>	
<b>ERITROCITOS</b>	<b>Eritrocitos y PBS</b>	<b>Sedimentación de eritrocitos</b>	
PBS: Solución Buffer de Fosfatos (pH 7.2); Ag: antígeno; Ac: anticuerpo			

**Cuadro 1:** Interpretación de los resultados de la prueba de Inhibición de la hemaglutinación.

### Procedimiento para la prueba de Inhibición de la hemaglutinación

#### Preparación del suero

- Se inactivaron las muestras de suero a 56°C 30 min.
- Se adsorbieron los sueros problema en microplacas de 96 pozos, utilizando caolín y eritrocitos de ave al 10%.
- Los sueros se incubaron durante 24 horas a 4°C.

#### Desarrollo de la prueba

Placas de 96 pocillos con fondo de "U". A las cuales se les adicionó:

- 50 µl de PBS (solución de fosfatos) en todos los pocillos.
- 50 µl suero problema previamente adsorbido en la fila A; se homogenizó 7 veces, y se realizaron diluciones dobles seriadas hasta la fila H (diluciones

de suero desde 1:10 hasta 1:1280). Se colocaron en este momento el suero control positivo y el suero control negativo.

- C) 50 µl de antígeno con 8 UHA (unidades hemaglutinantes), en cada pozo de la fila B en adelante. Se colocó una hilera más con el control de virus.
- D) Se incubó por 30 min. a temperatura ambiente.
- E) 50 µl de eritrocitos de ave al 0.5% en todos los pocillos, incluyendo un control de eritrocitos.
- F) Se incubaron las muestras durante 30-60 min. a temperatura ambiente. (hasta la sedimentación del control de eritrocitos).

### **3- Preparación del virus**

Se utilizó virus de referencia de influenza porcina subtipo H3N2 con un título de 8 UHA (unidades hemaglutinantes).

#### Replicación del virus en embrión de pollo.

- A) Se usaron embriones de pollo de 9-11 días de edad.
- B) Se inoculó 0.2 ml de virus H3N2 en la cavidad alantoidea.
- C) Los embriones se incubaron a 35-37°C por 3-4 días y se monitorearon diariamente. Los embriones muertos dentro de las 24 horas postinoculación fueron descartados.
- D) Los embriones que sobrevivieron fueron sacrificados por congelación a los 3 días postinoculación, para posteriormente coleccionar el líquido alantoideo.
- E) El líquido se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C, para posteriormente transferir el sobrenadante a otro tubo.
- F) Se evaluó la presencia del virus en el líquido alantoideo mediante la prueba de hemaglutinación (HA).

#### Titulación del antígeno (prueba de HA)

Se realizó la técnica de hemaglutinación para determinar la actividad hemaglutinante del virus.

- A) Se preparó una suspensión de eritrocitos de ave al 0.5%.
- B) Se depositó 50  $\mu$ l de PBS en las 12 filas de una microplacas de 96 pozos en "U".
- C) Se agregó 50  $\mu$ l de cada líquido alantoideo colectado en los primeros pozos de cada fila correspondiente.
- D) Se hicieron diluciones dobles seriadas trasladando 50  $\mu$ l. Las diluciones fueron desde 1:2 (pozo 1) hasta 1:2048 (pozo 11), mientras que el pozo 12 sirvió como control de eritrocitos.
- E) Una vez realizadas las diluciones se agregó 50  $\mu$ l de la suspensión de eritrocitos de ave al 0.5% a cada pozo.
- F) Se incubó a temperatura ambiente hasta que apareció el botón de eritrocitos en el control del mismo (30-60 minutos).
- G) Una completa hemaglutinación (presencia del virus) esparcirá los eritrocitos en el pozo (como una malla); mientras que la presencia de botón, indica la negatividad de la hemaglutinación (ausencia del virus).
- H) El título del virus se obtiene en la dilución inversa a donde apareció el botón de eritrocitos sedimentado.

#### **4- Lavado de eritrocitos de ave 10%**

- A) Se realizó el sangrado aséptico del ave vía intracardiaca utilizando alsevers como anticoagulante en un volumen 1:1.
- B) Se centrifugó la sangre a 1500 rpm/10 min.
- C) Se decantó el sobrenadante y se adicionó PBS.
- D) Se repitió el paso 1 y 2.

#### **5- Controles**

Control de suero positivo con título de 1:320; control de suero negativo; control de virus y control de eritrocitos.

Las diluciones de los sueros fueron a partir de 1:10 hasta 1:1280; considerándose como positivo a partir de la dilución 1:80.

#### **6- UHA (unidades hemaglutinantes)**

Para esta técnica el virus se utilizó con 8 UHA, ajustándose al volumen total a utilizar de antígeno.

#### **7- Análisis de la información**

Estadística descriptiva por Estado

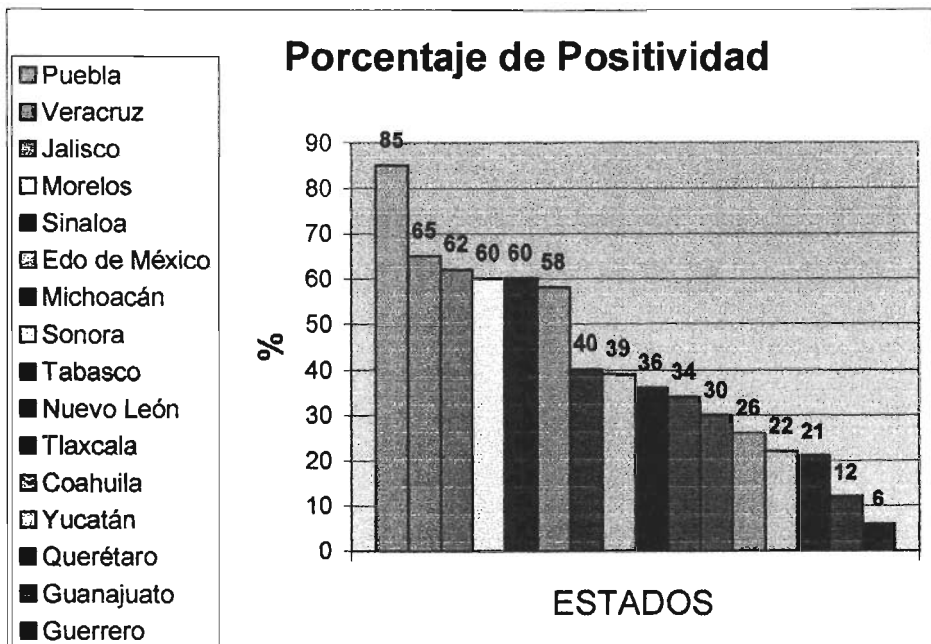
- Porcentaje de positividad
- Rangos de los títulos
- Media y moda

### III. RESULTADOS

De un total de 1850 sueros se detectaron 796 (43%) con un título de anticuerpos positivos para el subtipo H3N2 del virus de Influenza Porcina tipo A.

Al evaluar los títulos de anticuerpos, se observó un rango positivo de 1:80 a 1:1280.

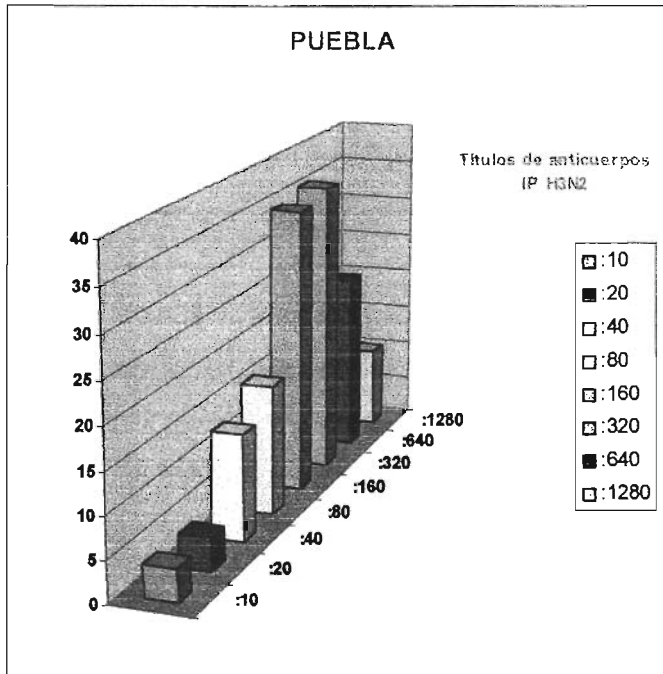
El estado con mayor porcentaje de sueros positivos fue **Puebla (zona centro)** con 119 sueros positivos (85%) de un total de 140, así mismo es el Estado con títulos de anticuerpos más altos (10 sueros con títulos de 1:1280) (Figura 6 y 7); el estado con menor porcentaje de sueros positivos lo presentó **Guerrero (zona sureste)** con 7 sueros positivos (6%) de 120 sueros y fue el Estado con el mayor número de títulos mas bajos (63 sueros con títulos de 1:10) (Figura 6 y 37).



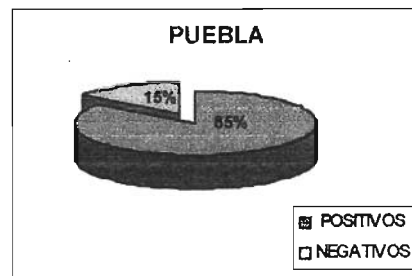
**Figura 6:** Porcentaje de sueros positivos por Estado para el subtipo H3N2 del virus de Influenza porcina tipo A.

## PUEBLA

El Estado de Puebla, con el primer lugar, presentó 119 sueros positivos (85%) de 140 sueros, y fue el Estado que reportó el mayor número de sueros (10) con el título más alto (1:1280) (figura 7 y 8). La moda fue de 1:320; la mediana 1:160 y la media de 1: 328.



**Figura 7:** Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Puebla.

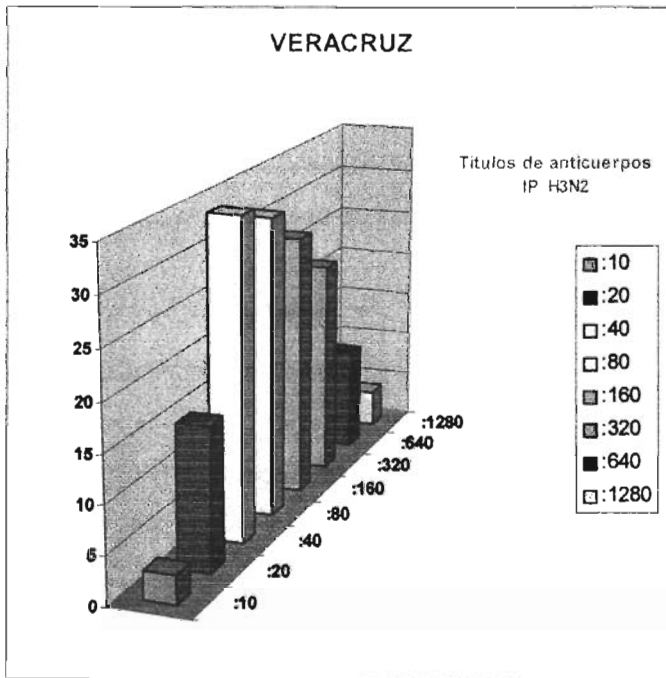


**Figura 8:** Porcentaje de positividad Edo. Puebla.

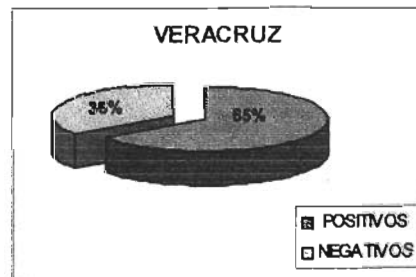


## VERACRUZ

El Estado de Veracruz, con el segundo lugar, presentó 98 sueros positivos (65%) de 150 sueros, y fue el segundo Estado que reportó el mayor número de sueros (4) con el título más alto (1:1280) (figura 9 y 10). La moda, fue de 1:40; la mediana 1:80 y la media de 1:188.



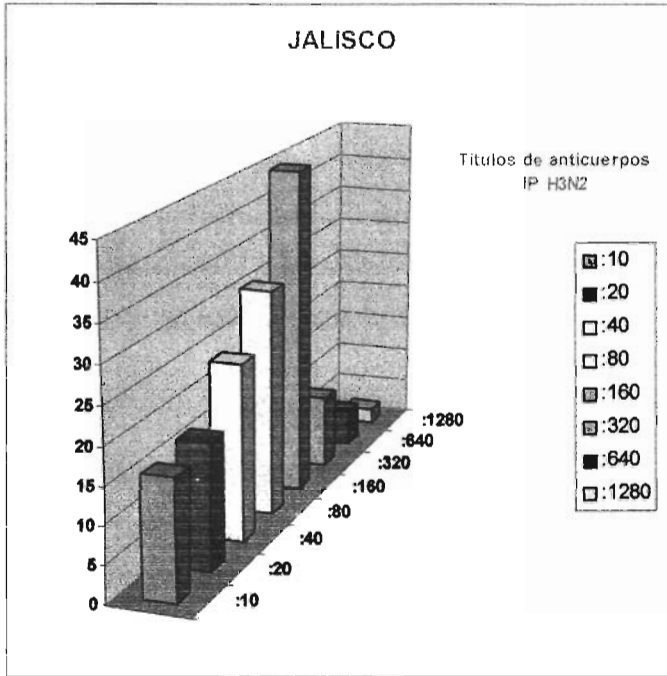
**Figura 9:** Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Veracruz.



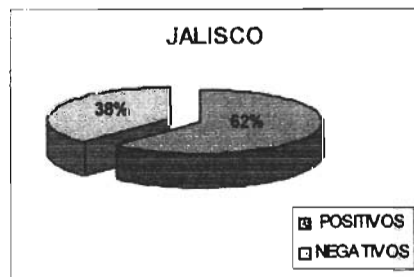
**Figura 10:** Porcentaje de positividad Edo. Veracruz.

**JALISCO**

El Estado de Jalisco, con el tercer lugar, presentó 93 sueros positivos (62%) de 150 sueros (figura 11 y 12). La moda, fue de 1:160; la mediana 1:80 y la media de 1: 134.



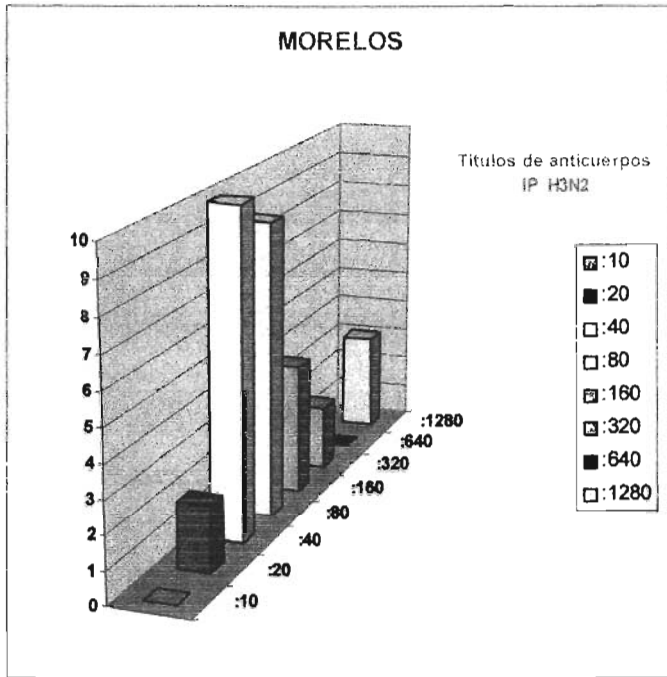
**Figura 11:** Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Jalisco.



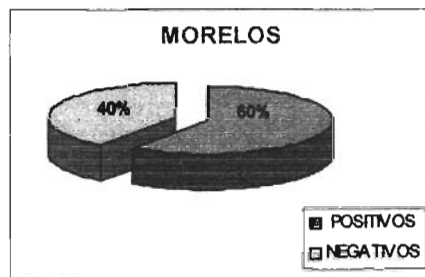
**Figura 12:** Porcentaje de positividad Edo. Jalisco.

**MORELOS**

El Estado de Morelos, con el cuarto lugar, presentó 18 sueros positivos (60%) de 30 sueros (figura 13 y 14). La moda fue de 1:40; la mediana 1:80 y la media de 1: 209.



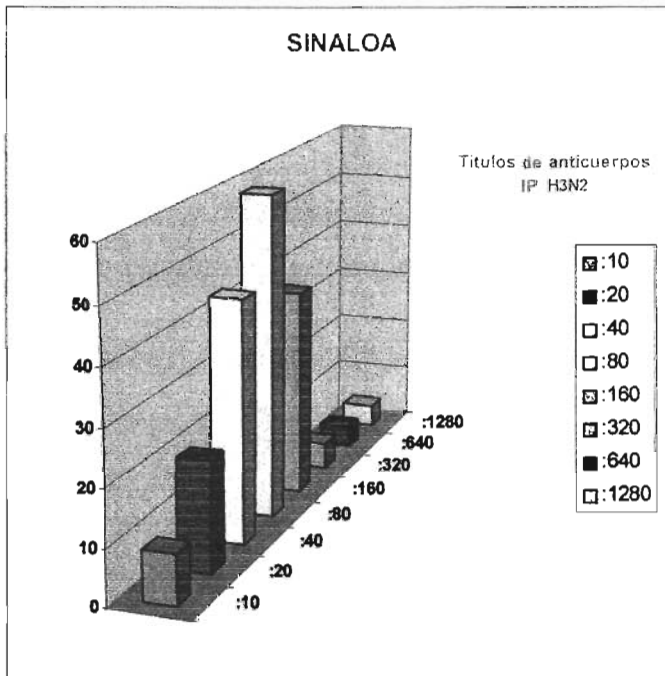
**Figura 13:** Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Morelos.



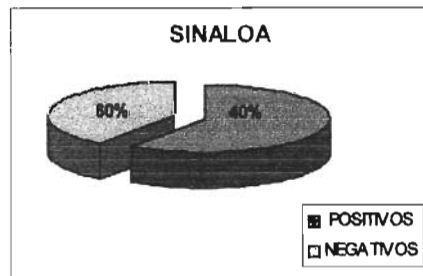
**Figura 14:** Porcentaje de positividad Edo. Morelos.

**SINALOA**

El Estado de Sinaloa, con el quinto lugar, presentó 110 sueros positivos (60%) de 183 sueros (figura 15 y 16). La moda fue de 1:80; la mediana 1:80 y la media de 1: 122.



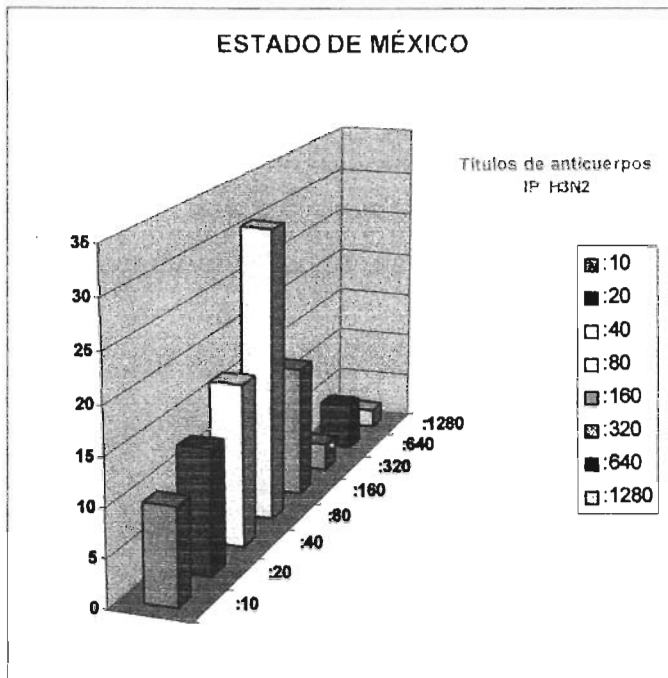
**Figura 15:** Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Sinaloa.



**Figura 16:** Porcentaje de positividad Edo. Sinaloa.

**ESTADO DE MÉXICO**

El Estado de México, con el sexto lugar, presentó 55 sueros positivos (58%) de 95 sueros (figura 17 y 18). La moda fue de 1:80; la mediana 1:80 y la media de 1: 131.



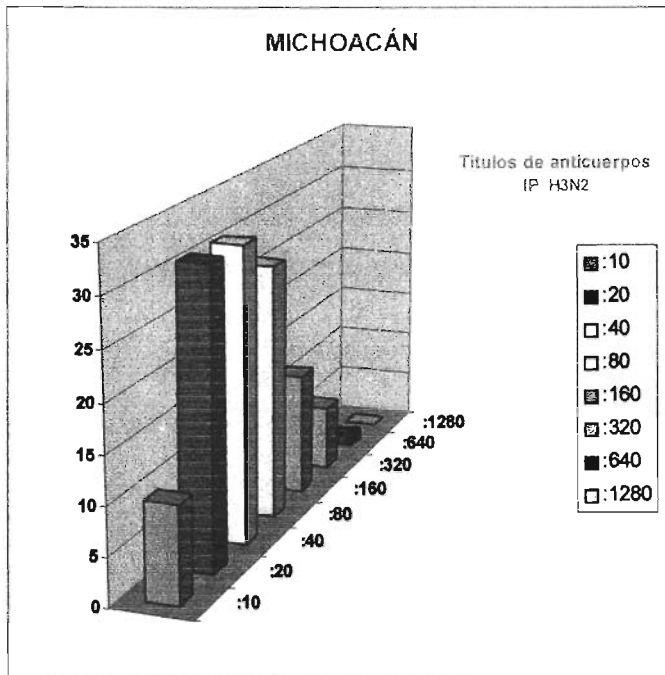
**Figura 17:** Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de México.



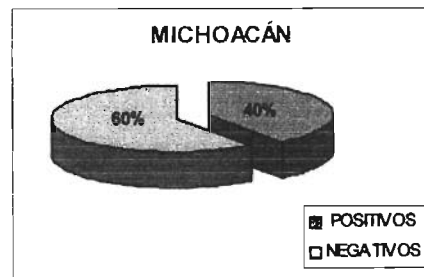
**Figura 18:** Porcentaje de positividad Edo. de México.

## MICHOACÁN

El Estado de Michoacán, con el séptimo lugar, presentó 48 sueros positivos (40%) de 120 sueros (figura 19 y 20). La moda fue de 1:20; la mediana 1:40 y la media de 1: 76.



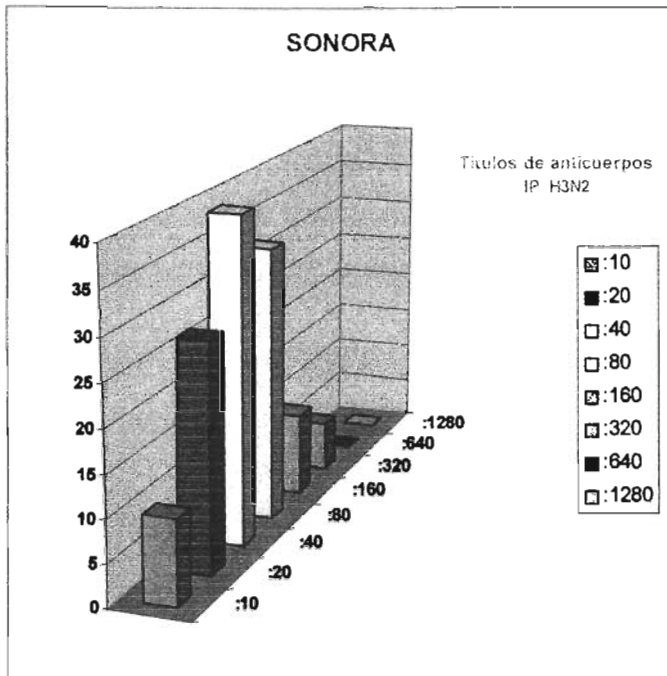
**Figura 19:** Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Michoacán.



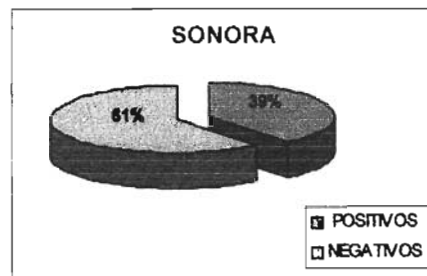
**Figura 20:** Porcentaje de positividad Edo. Michoacán.

## SONORA

El Estado de Sonora, con el octavo lugar, presentó 49 sueros positivos (39%) de 125 sueros (figura 21 y 22). La moda fue de 1:40; la mediana 1:40 y la media de 1: 66.



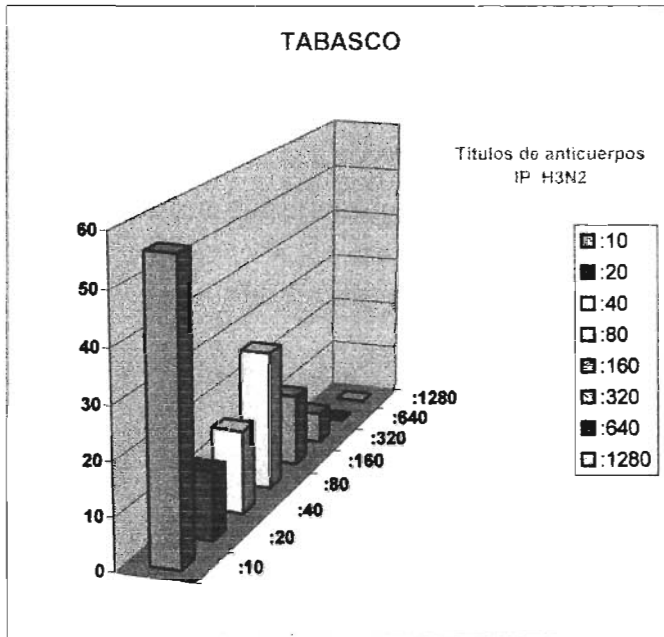
**Figura 21:** Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Sonora.



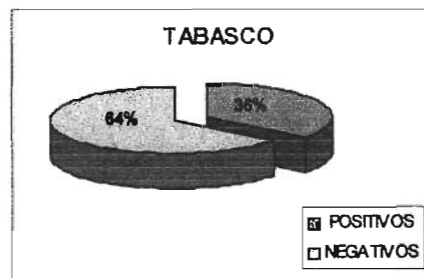
**Figura 22:** Porcentaje de positividad Edo. Sonora.

## TABASCO

El Estado de Tabasco, con el noveno lugar, presentó 47 sueros positivos (36%) de 132 sueros, y es el segundo estado con el mayor número de títulos más bajos (1:10) (figura 23 y 24). La moda fue de 1:10; la mediana 1:20 y la media de 1: 59.



**Figura 23:** Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Tabasco.

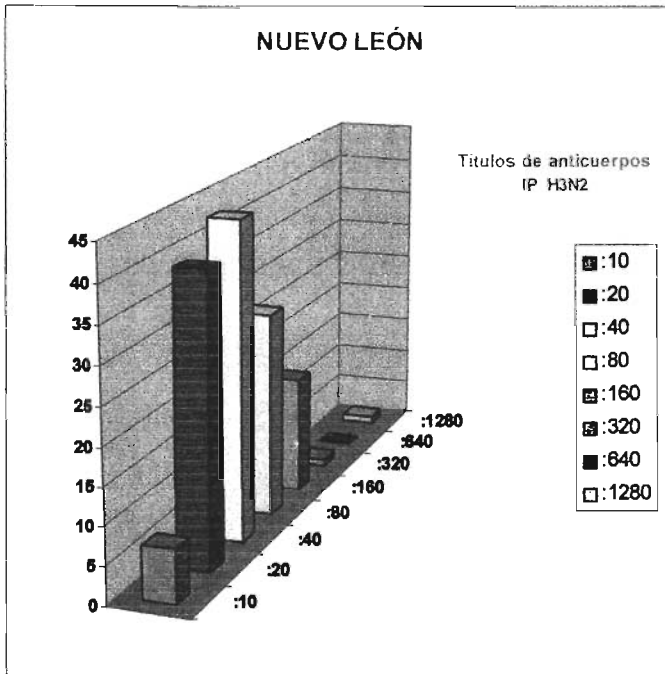


**Figura 24:** Porcentaje de positividad Edo. Tabasco.

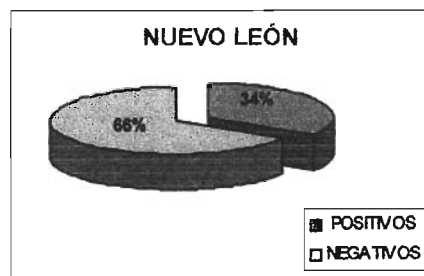


**NUEVO LEÓN**

El Estado de Nuevo León, con el décimo lugar, presentó 46 sueros positivos (34%) de 125 sueros (figura 25 y 26). La moda fue de 1:40; la mediana 1:40 y la media de 1: 66.



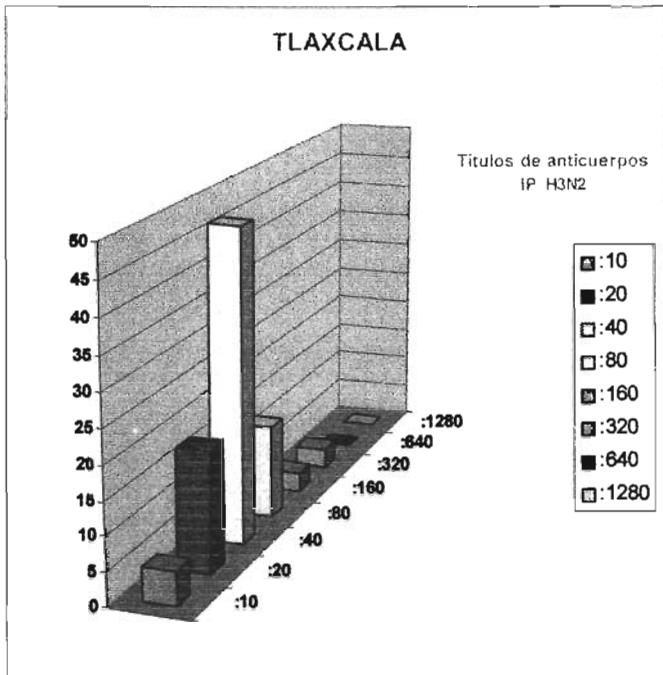
**Figura 25:** Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Nuevo León.



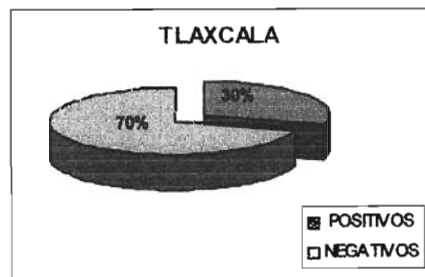
**Figura 26:** Porcentaje de positividad Edo. N.L.

**TLAXCALA**

El Estado de Tlaxcala, con el undécimo lugar, presentó 30 sueros positivos (30%) de 100 sueros (figura 27 y 28). La moda fue de 1:40; la mediana 1:40 y la media de 1: 54.



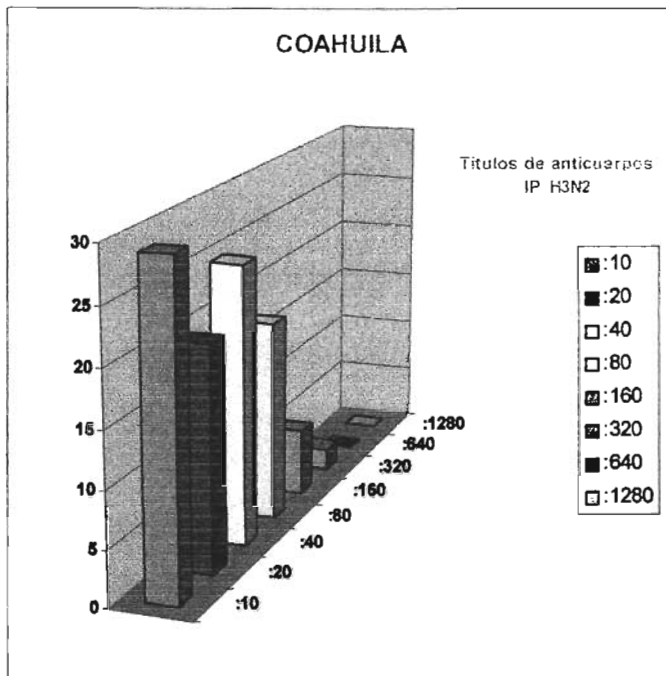
**Figura 27:** Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Tlaxcala.



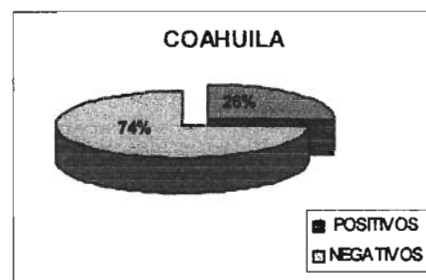
**Figura 28:** Porcentaje de positividad Edo. Tlaxcala.

## COAHUILA

El Estado de Coahuila, con el duodécimo lugar, presentó 26 sueros positivos (26%) de 100 sueros (figura 29 y 30). La moda fue de 1:10; la mediana 1:40 y la media de 1: 47.



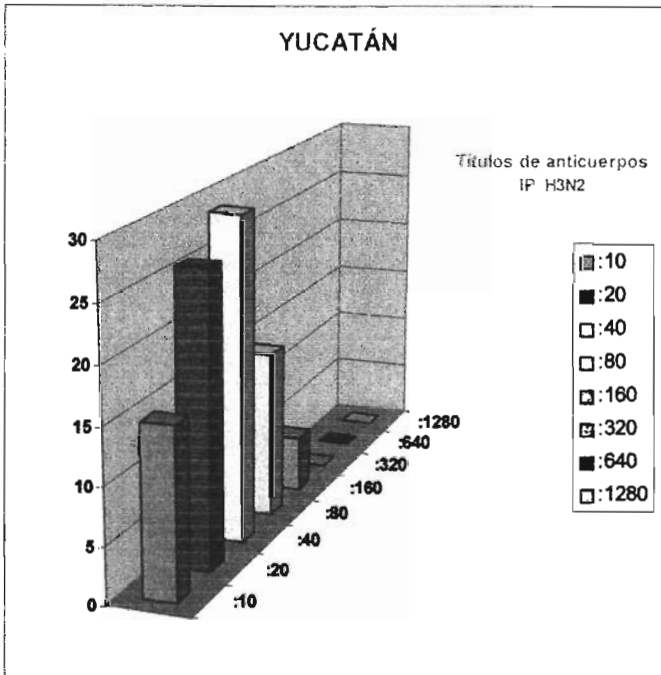
**Figura 29:** Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Coahuila.



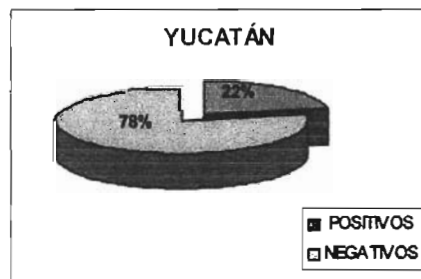
**Figura 30:** Porcentaje de positividad Edo. Coahuila.

## YUCATÁN

El Estado de Yucatán, con el lugar trece, presentó 20 sueros positivos (22%) de 90 sueros (figura 31 y 32). La moda fue de 1:40; la mediana 1:40 y la media de 1:42.



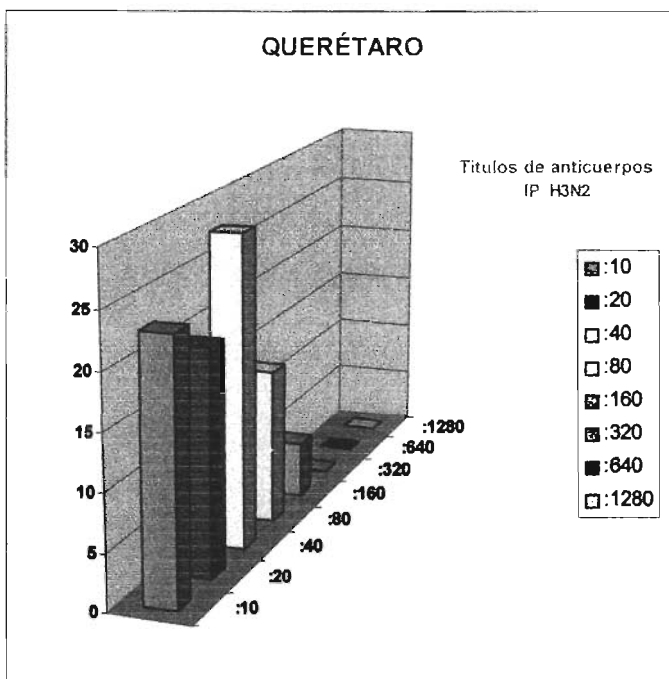
**Figura 31:** Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Yucatán.



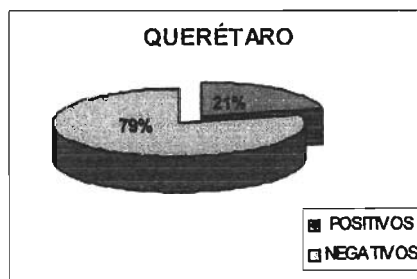
**Figura 32:** Porcentaje de positividad Edo. Yucatán.

**QUERÉTARO**

El Estado de Querétaro, con el lugar catorce, presentó 19 sueros positivos (21%) de 90 sueros (figura 33 y 34). La moda fue de 1:40; la mediana 1:40 y la media de 1:40.



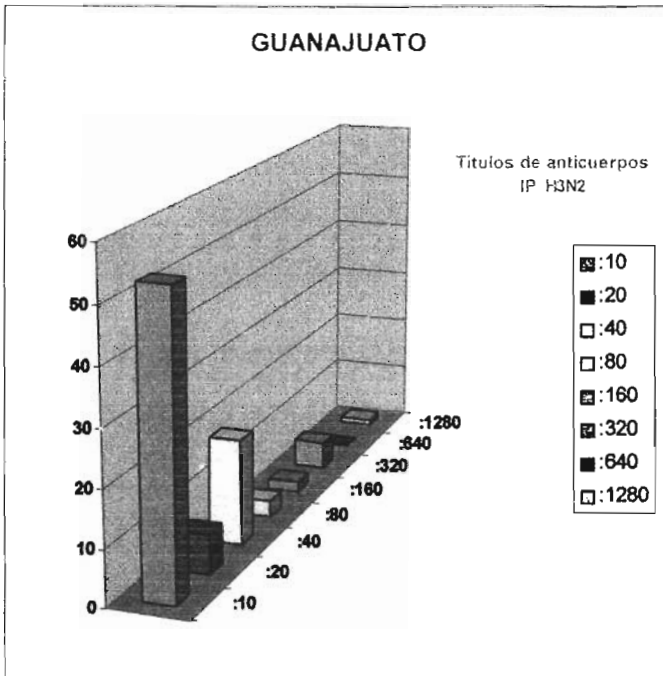
**Figura 33:** Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Querétaro.



**Figura 34:** Porcentaje de positividad Edo. Querétaro.

## GUANAJUATO

El Estado de Guanajuato, con el lugar quince, presentó 11 sueros positivos (12%) de 90 sueros (figura 35 y 36). La moda fue de 1:10; la mediana 1:10 y la media de 1: 54.



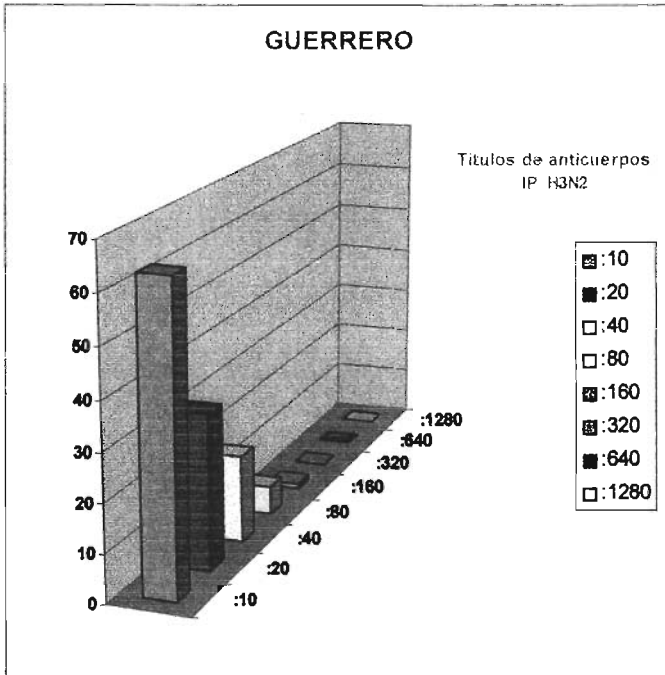
**Figura 35:** Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Guanajuato.



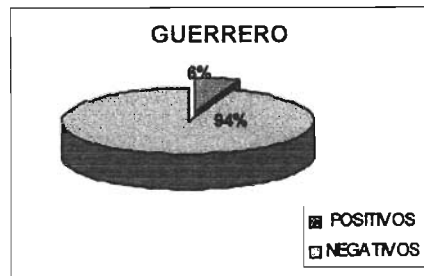
**Figura 36:** Porcentaje de positividad Edo. Guanajuato.

**GUERRERO**

El Estado de Guerrero, con el lugar dieciséis, presentó 7 sueros positivos (6%) de 120 sueros, y fue el Estado que reportó el mayor número de sueros (63) con el título más bajo (1:10) (figura 37 y 38). La moda fue de 1:10; la mediana 1:10 y la media de 1: 22.



**Figura 37:** Títulos de anticuerpos de H3N2 para el Estado de Guerrero.



**Figura 38:** Porcentaje de positividad Edo. Guerrero.

#### IV. DISCUSIÓN

El cerdo es la especie que actúa como el mayor reservorio de los subtipos H1N1 y H3N2 del virus de Influenza tipo A, el cual se encuentra presente de manera endémica en la población mundial de cerdos, y es así responsable de una de las enfermedades respiratorias de mayor prevalencia.

Es aquí donde radica la importancia de generar mayor investigación, ya que al comprender el comportamiento viral, se pueden generar vacunas con una mayor eficacia, dependiendo de la cepa viral de la que se trate, y buscando que sea la misma que esté circulando en las poblaciones susceptibles.

La influenza porcina representa un desafío para los investigadores en genética, porque estos virus almacenan su información en el ARN, el cual es más susceptible a la mutación y permite a los virus evolucionar más rápidamente que el ADN. Es por esto, que en ocasiones sea una dificultad para el huésped infectado desarrollar una inmunidad prolongada (23).

La prueba de diagnóstico, inhibición de la hemaglutinación, que se aplicó en este estudio, se ha empleado por diferentes investigadores en todo el mundo para el conocimiento epidemiológico de la enfermedad, la variación antigénica de la hemaglutinina no afecta la sensibilidad de la prueba, ni tampoco se presenta reacción cruzada entre subtipos distintos (23,34).

En años recientes, la enfermedad se ha considerado a nivel mundial, enzoótica en el pie de cría, y es más común en cerdos sin vacunar o inadecuadamente vacunados, por lo que representan una fuente importante de transmisión de la enfermedad a otras poblaciones susceptibles.

Los resultados de esta investigación revelan la evidente presencia y difusión serológica del subtipo H3N2 en México. En el 2001, la importación de pie de cría alcanzó la cifra histórica de 34,900 cerdos, aunque para el 2003 disminuyó a 19,500, lo que continua representando un riesgo a la salud porcina.



Es muy probable que el subtipo H3N2 se introdujera a México por la importación de pie de cría, principalmente de EU, por lo que es conveniente realizar estudios serológicos retrospectivos para determinar desde cuando esta presente el virus en México.

La zona centro, que incluye al estado de Puebla, tiene el mayor número de cerdos seropositivos para influenza; siguiendo la zona del Bajío, con los estados de Jalisco y Michoacán, de los cuales, Jalisco ocupó el tercer lugar general con sueros seropositivos, esto puede deberse a que es una zona con una gran concentración de animales, por lo que las condiciones de manejo y condición sanitaria favorecen la presentación de la enfermedad. Cabe mencionar que en los estados que se ubican en el sureste, como Veracruz, que ocupó el segundo lugar general, la situación geográfica en relación al estado de Puebla da como consecuencia la alta prevalencia de anticuerpos, que seguramente son el resultado del movimiento de animales entre ambos estados aunado a las prácticas de manejo. En contraste, el estado de Guerrero ocupó el último lugar en prevalencia serológica de este estudio, lo cual puede explicarse por el bajo número de población porcina, así como al aislamiento geográfico con otras granjas.

La península de Yucatán es un caso particular, por ser un estado libre de enfermedades tales como Fiebre Porcina Clásica, hay restricción de movilización de animales, favoreciendo con ello su estado sanitario. Sin embargo, los resultados de este estudio contrastan con otro trabajo en el que se encontró un 65% de sueros positivos de un total de 1000 cerdos en diferentes etapas (destete, crecimiento, desarrollo y finalización) procedentes de 25 granjas (36), a diferencia de un 22% de sueros de pie de cría positivos, del total de muestras del presente estudio (90).

Debido a que los resultados en ambos estudios se realizaron en poblaciones distintas, se puede explicar el hecho de que en los cerdos de engorda el porcentaje de cerdos positivos hacia el subtipo H3N2 sea mayor que en los cerdos de pie de cría; lo que demuestra un mayor control de éstos últimos.

Los resultados en general coinciden con trabajos realizados en México, en estos se reportó seropositividad en un 30% de 474 sueros procedentes de 3 estados, donde se encontraron rangos de títulos positivos desde 1:80 hasta 1:640 (35), cifras muy cercanas al presente estudio, 43% del total de 1850 sueros muestreados que presentaron rangos de títulos positivos desde 1:80 hasta 1:1280.

## **V. CONCLUSIONES**

Con base a lo anterior, podemos inferir que el virus de Influenza porcina subtipo H3N2 se encuentra ampliamente distribuido en la población de cerdos, indicando que en la mayoría de cerdos, hay anticuerpos para este subtipo.

Los resultados son importantes no solo en el contexto epidemiológico, sino también para el establecimiento de programas preventivos y de control de la enfermedad como son el monitoreo serológico de animales de importación y de aquellos que se muevan de una granja a otra.

Se debe considerar la vacunación con ambos serotipos, H1N1 y H3N2, del virus de Influenza tipo A, y del mismo modo su diagnóstico diferencial.

En México se tiene poca investigación sobre el subtipo H1N1 y H3N2 (35,36,37,38), por lo que es necesario realizar más estudios de serología a otros estados y en animales de diferentes edades, así como de detección del virus, para poder desarrollar nuevas estrategias de vacunación para hacer frente al problema que representa la Influenza porcina tanto en los cerdos como en la salud pública.

## VI. LITERATURA CITADA

- 1 Hirst GK. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science*. 1941;94:22.
- 2 Madec F, Eveno E, Mieli L, Manuguerra JCL. Influenza and influenza-like síndromes in growing-finishing pigs in France. Proceedings of the 18<sup>th</sup> IPVS Congress, Hamburg, Germany, 2004, vol 1.
- 3 Ohishi K, Ninomiya A, Kida H, Park CH, Maruyama T, Arai T, Katsumata E, Tobayama T, Boltunov AN, Khuraskin LS, Miyazaki N. Serological evidence of transmission of human influenza A and B viruses to Caspian seals (*Phoca caspica*). *Microbiol Immunol*. 2002; 46(9): 639-44.
- 4 Gregory V, Bennett M, Thomas Y, Kaiser L, Wunderli W, Matter H, Hay A, Lin YP. Human infection by a swine influenza A (H1N1) virus in Switzerland. *Arch Virol* 2003 148: 793-802.
- 5 Webby RJ, Swenson SL, Krauss SL, Gerrish PJ, Goyal SM, Webster RG. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J Virol* 2000 74:8243-51.
- 6 Easterday BC, Van Reeth K. Swine influenza. *In: Diseases of Swine*, Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor D.J., ed. Iowa State University Press, Iowa, USA 1999, 277–290.
- 7 Karasin AI, Landgraf J, Swenson, Erickson G, Goyal S. Genetic characterization of influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. *J Clin Microbiol* 2002 40: 1073-1079.
- 8 Heinen PP, Boer-Luijtz EA, Bianchi AT. Respiratory and systemic humoral and cellular immune responses of pigs to a heterosubtypic influenza A virus infection. *J Gen Virol* 2001 82: 2697-2707.

- 9 Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Evaluation of a multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay for subtyping hemagglutinin genes 1 and 3 of swine influenza type A virus in clinical samples. *J Vet Diagnostic Investigation* 2002 14: 62-65.
- 10 Marozin S, Gregory V, Cameron K, Bennett M, Valette M. Antigenic and genetic diversity among influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. *J Gen Virol* 2002 83: 735-745.
- 11 Larsen DL, Olsen CW. Effects of DNA dose, route of vaccination, and coadministration of porcine interleukin-6 DNA on result of DNA vaccination against influenza virus infection in pigs. *AJVR* 2002 63: 653-658.
- 12 Pospisl Z, Lany P, Tumová B, Buchata J, Zendulková D. Swine influenza surveillance and the impact of human influenza epidemics on pig herd in the Czech Republic. *A Vet BRNO* 2001 70: 327-332.
- 13 Díaz A.; Goñi, M.; Ruocco, G.; Savio, E.; Russi, J.; Bagattini, J.C. *Gripe: Guía práctica*. Publ. Clínica Médica "2". Montevideo, 2000.
- 14 Brown IH. Swine, avian and human influenza viruses in: OIE/FAO/EU International Reference Laboratory for Avian Influenza Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, UK
- 15 Loeffen WL, Kamp EM, Stockhofe-Zurwieden N, van Nieuwstadt AP, Bongers JH, Hunneman WA, Elbers AR, Baars, J, Nell T, van Zijderveld FG. Survey of infectious agents involved in acute respiratory disease in finishing pigs. *1999 Vet Rec.* 145: 123-129.
- 16 Van Reeth K, Labarque G, Nauwynck H, Pensaert M. Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Res. Vet. Sci.* 1999: 67, 47-52.

- 17 Mozdzanowska K, Maiese K, Furchner M, Gerhard W. Treatment of influenza virus-infected SCID mice with nonneutralizing antibodies specific for the transmembrane proteins matrix 2 and neuraminidase reduces the pulmonary virus titer but fails to clear the infection. *Virology* 1999; 254, 138-146.
- 18 Tizar RI, et al. *Inmunología Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana 1998. p. 328,329.
- 19 Kitikoon P, Nilubol D, Vincent S, Yu S, Erickson B, Janke B, Hoover T, Sornsen S, Thacker E. Investigation of immune response and maternal antibody interference on vaccination with bivalent swine influenza vaccine. *Proceedings of the 18<sup>th</sup> IPVS Congress Hamburg Germany 2004*, 1:47.
- 20 Fouchier RA, Bestebroer TM, Herfst S, Van Der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38, 4096-4101.
- 21 Choi YK, Goyal SM, Kang SW, Farnham MW, Joo HS. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. *J Virol Methods.* 2002; 102(1-2):53-9.
- 22 Kim WI, Yoon KJ. Characterization of humoral immune response of pigs to SIV infection. *Proceedings of the 18<sup>th</sup> IPVS Congress Hamburg Germany 2004*, 1:44.
- 23 Long BC, Golderg TL, Swenson SL, Erickson G, Scherba G. Pruebas HI para anticuerpos H1N2 del virus de la influenza porcina *J.Vet Diagn Invest.* 2004; 16 (4): 264-70
- 24 Long BC, Golderg TL, Swenson SL, Erickson G, Scherba G. Comparación de un ELISA Comercial con HIA para el Diagnóstico Serológico de la Infección por el Virus de la Influenza Porcina (H1N1) *J.Vet Diagn Invest.* 2004 ; 16: 8689

- 25 Sánchez R, Pajarillaga G, Manlapaz R. Serological examination of swine influenza H1N1 virus infection in commercial pig herds in Luzón Philippines. Proceedings of the 18<sup>th</sup> IPVS Congress Hamburg Germany 2004 vol 1.
- 26 Labarque G, Vyt P, Van Reeth K, Pensaert M. Seroprevalence of different swine influenza virus subtypes in swine in Belgium in 2001-2003. Proceedings of the 18<sup>th</sup> IPVS Congress Hamburg Germany 2004 vol 1.
- 27 Boulanger A, Ramírez O.J, Moscardi A. Serological evidence of swine influenza virus infection on Venezuelan pig farms. Proceedings of the 18<sup>th</sup> IPVS Congress Hamburg Germany 2004 vol 1.
- 28 Direksin K, Joo H, Goyal SM. An immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies against swine influenza virus. J Vet Diagn Invest. 2002; 14(2):169-71.
- 29 Lee BW, Bey RF, Baarsch MJ, Emery DA. Subtype specific ELISA for the detection of antibodies against influenza A H1N1 and H3N2 in swine. J Virol Methods. 1993 15; 45(2): 121-36.
- 30 Schlueter R, Lu W, Eichmeyer M, Wasilk A. Characterization and performance of a new bivalent, H1N1 and H3N2, swine influenza vaccine: End-FLUence 2. American Association of Swine Veterinarians, 2001, 1: 213.
- 31 Srinivasappa J, Jennen CM, Champ DA, Gill M, Chu HJ. Efficacy and safety of Fort Dodge Animal Health's bivalent Swine Influenza Vaccine. American Association of Swine Veterinarians, 2001, p 171.
- 32 Wesley RD, Lager KM. A recombinant Ad5 Swine Influenza Vaccine that overrides maternal antibody interference. Proceedings of the 18<sup>th</sup> IPVS Congress Hamburg Germany 2004, 1:47.
- 33 Snyder ML, Emissé KA, Jutting DR, Middle LA. Microtitration hemagglutination inhibition test for swine influenza virus (SIV) in: Serologic microtitration

- techniques. U.U. Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection. Service Vet. National Vet Service Laboratorie Iowa 1981.
- 34 Labarque G, Barbé M, Pensaert K, Reeth Van. Maternal Immunity to H1N1 and H3N2 Swine Influenza fails to protect against the novel H1N2 subtype. Proceedings of the 18<sup>th</sup> IPVS Congress Hamburg Germany 2004, 1:83.
- 35 Trujillo OME, Carreón NR, Mercado GC, Quezada MF. Determinación de anticuerpos contra el virus de Influenza H1N1 y H3N2 en sueros porcinos. XXXIX Congreso Nacional, Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. Sinaloa 2004.
- 36 Álvarez FM, Rodríguez BJ, Ayora TG, Villegas PS. Estudio transversal del virus de influenza subtipo H1N1 y H3N2 en granjas porcinas del Estado de Yucatán, México. XXXVI Congreso Nacional, Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. Querétaro 2001.
- 37 González CT, Ramírez MH, Stephano HA, Espino RG. Evaluación serológica del virus de la influenza porcina en cerdos de 10 granjas de 5 Estados de la República Mexicana. XXV Congreso Nacional Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. 1990.
- 38 Carreón NR, Rodríguez TJ, Ramírez MH, Mercado GC, Hinojosa RC. Detección de anticuerpos contra el virus de Influenza Porcina en diferentes Estados de la República Mexicana. XXXII Congreso Nacional, Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. Guerrero 1997.
- 39 Richt JA, Larger KM, Janke BC, Woods RD, Webster RG, Webby RJ. Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States. J Clin Microbiol 2003 41: 3198-3205.