

Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C.

# **XLVII Congreso Nacional AMVEEC 2012**

## **MESA** **Enfermedades Virales y Bacterianas**

Moderador: MVZ Eduardo Fano

# XLVII Congreso Nacional AMVEC 2012

**Comentarios:**



## ACTUALIZACIÓN EN INFLUENZA PORCINA

Dr. Sánchez-Betancourt JI<sup>1</sup>, Avalos GP<sup>1</sup>, López-Charretón S<sup>2</sup>, Arias C<sup>2</sup>, Trigo TF<sup>1</sup>, Beltrán FR<sup>1</sup>, Harte BP<sup>1</sup>, Juárez DG<sup>1</sup>,  
*Mercado GMC<sup>1</sup>, Carreón NR<sup>1</sup>, Trujillo OME<sup>1</sup>.*

1. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

2. Instituto de Biotecnología, UNAM.

Correo: aisb\_7@yahoo.com.mx

### *Antecedentes de Virus de Influenza Aislados en Cerdos*

Los virus de influenza tipo A han sido aislados de una gran variedad de especies de animales, incluyendo seres humanos, cerdos, caballos, mamíferos marinos y aves. Las aves acuáticas son los principales reservorios de los virus de influenza en las cuales se han reportado hasta 104 subtipos virales, de los 144 subtipos existentes, esto las hace la principal fuente de infección de los virus de influenza hacia otras especies. A pesar de su origen común, los virus de influenza A en general, se limitan a la gama de huéspedes de acuerdo a un rasgo poligénico y a la especificidad del receptor de la hemaglutinina (HA) que es considerada el factor determinante para unirse a los receptores celulares. El epitelio de la tráquea en cerdos expresa receptores tanto para los virus de la influenza humana como para la aviar, y esto proporciona una base biológica para la susceptibilidad de los cerdos tanto a la influenza aviar, como para el virus de la influenza humana.

La redistribución ha jugado un papel fundamental en la evolución del virus de la influenza A en cerdos. Fue descrita por primera vez como una enfermedad en los cerdos en 1918 y el primer virus de influenza A fue aislado de estos en 1930. Este aislamiento fue del subtipo H1N1 y fue del mismo linaje que el virus de la pandemia de 1918. Dicho virus entró en la población humana y porcina en la misma época y ha evolucionado independientemente en cada huésped. El "clásico" virus de influenza porcina H1N1 causó previsible picos estacionales de la enfermedad pero, no fue motivo de gran preocupación económica y continuó circulando como el virus de influenza dominante en la población porcina de América del Norte hasta 1998.

A finales de 1998, otros dos virus de influenza H3N2 diferentes, fueron aislados de cerdos que presentaban una enfermedad severa similar a la influenza en Carolina del Norte, Minnesota, Iowa y Texas. En el aislamiento de Carolina del Norte se identificó un virus recombinante que contenía HA, NA y PB1 similares al virus contemporáneo de influenza humana y los genes M, NP, NS, PA y PB2 similares al linaje del virus clásico de influenza porcina H1N1. Los aislamientos de Minnesota, Iowa y Texas (triple recombinante) fueron aún más complejos; al igual que el aislamiento de Carolina del Norte, estos virus contenían HA, NA y PB1 de un linaje del virus humano contemporáneo y M, NP y NS del linaje clásico porcino H1N1.

Sin embargo, estas cepas contenían genes PA y PB2 de un linaje de virus de la influenza aviar. Después de la aparición de estos dos virus recombinantes, el doble recombinante no continuó circulando, pero el virus triple recombinante se estableció en la población porcina y siguió circulando y evolucionando.

**En octubre de 1999, un virus de influenza A H4N6** fue aislado de cerdos con neumonía en una granja porcina comercial en Canadá. Los análisis filogenéticos de las secuencias de los ocho segmentos de ARN viral, demostró que estos eran en su totalidad virus aviar del linaje de América del Norte.

A principios del 2000, más del 20% de los cerdos muestreados fueron seropositivos al virus triple recombinante H3N2. Retrospectivamente, se demostró que el virus recombinante triple estuvo presente en los cerdos, ya en marzo de 1998.

**En el 2004, un nuevo virus recombinante H3N1, fue identificado de cerdos que presentaban tos en Estados Unidos.** El análisis filogenético de la secuencia de nucleótidos demostró un segmento HA con 95,9 a 99,5% de similitud en los nucleótidos con respecto a la parte III del virus de influenza porcino H3N2, que es el genotipo predominante H3 que circula entre los cerdos en EE.UU. El segmento NA era muy similar al del virus H1N1 clásico, con 92 a 93% de identidad entre las secuencias virales disponibles en el GenBank, pero mostraron una mayor homología (98 a 99%) con el virus H1N1 contemporánea del Medio Oeste. Otros genes eran de origen porcino (M, NP y NS1), aviar (PA y PB1) y humano (PB2), representante de la composición interna del gen contemporánea del virus porcino triple recombinante H3N2 de América del Norte. Esto sugiere que los virus de la influenza H3N1 A/Swine/Minnesota/00395/2004 son una recombinación que contiene genes del virus de influenza porcina triple recombinante H3N2 y del virus de influenza porcino contemporáneo H1N1.

**En abril del 2006, el virus de influenza A/Swine/Missouri/2124514/2006 (Sw/2124514), fue aislado de cerdos de 12 semanas de edad que presentaban infecciones respiratorias.** En septiembre del mismo año, otro virus de influenza A/Swine/Missouri/4296424/2006 (Sw/4296424) fue aislado de varios cerdos de 5 a 6 semanas de edad que presentaban

bronconeumonía multifocal. Estos virus fueron identificados a través de la base de datos de GenBank como virus de influenza **H2N3**.

Según el análisis filogenético el gen HA del virus Sw/4296424 coincide más estrechamente con los virus H2 aislados de patos en el norte de América (hasta el 97,8% de identidad en la secuencia de nucleótidos). El segmento NA estaba estrechamente relacionado con el virus de la gripe aviar H4N3 aislado de cerceta de alas azules (identidad 98,3%). Con la excepción del gen PA, los genes internos fueron derivados de los virus porcinos contemporáneos triples recombinante que se encuentra actualmente en Estados Unidos.

La influenza porcina no se reportó en Europa hasta 1976, cuando el virus clásico porcino H1N1 fue detectado en cerdos en Italia. Por la misma época, un virus totalmente humano H3N2 se presentó en la población porcina europea. En 1979, un virus de influenza aviar fue aislado de los cerdos en Italia, este virus H1N1 similar al aviar rápidamente sustituyó al clásico virus porcino H1N1 como el linaje dominante y se sometió a una redistribución con el virus H3N2 humano, dando lugar a un virus con HA y NA similar al humano y los genes internos similares al virus aviar.

Un virus **H1N2** que contenía H1 humano, N2 porcino y genes internos de origen aviar, fue aislado de cerdos en **Gran Bretaña en 1994**. En 1999 se aisló de una granja de cerdos que presentó infecciones respiratorias y abortos, un virus de influenza H1N2; el análisis filogenético indicó la recombinación entre el clásico virus porcino H1 y el virus recombinante H3N2, aislado en América durante 1998. En el 2005 fue aislado en Alemania un nuevo virus H1N2 resultado de la recombinación entre H1N2 y H3N2 porcino.

La mayoría de los virus de influenza porcina de Europa también circulan en Asia, pero hay varios linajes que sólo se han aislados en este continente. El virus humano H3N2 fue aislado por primera vez de cerdos en Taiwán en 1970 y continúa circulando en la población porcina junto con varios diferentes virus recombinantes del mismo virus.

La vigilancia virológica prospectiva realizada entre marzo de 1998 y junio del 2000 en Hong Kong, sobre los cerdos importados del sureste de China, proporcionó la primera evidencia de transmisión entre especies del **virus de influenza aviar H9N2 a los cerdos** y documentó su co-circulación con los virus humanos contemporáneos H3N2 (A/Sydney/5/97, Sydney97). Todos los segmentos del genoma del virus H9N2 porcino estaban estrechamente relacionados con virus similares a gallina/Beijing/1/94 (H9N2), pato/Hong Kong/Y280/97 (H9N2), y los descendientes del linaje de este último virus. El análisis filogenético sugiere que la repetida transmisión entre especies, ocurrió desde el huésped aviar a los cerdos. Los virus Sydney97 (H3N2) aislados de cerdos estaban estrechamente relacionadas con el virus humano contemporáneo H3N2 en todos los segmentos de genes y no había sido objeto de redistribución génica.

**El virus aviar H5N1, se ha aislado esporádicamente de cerdos en China e Indonesia**, pero no parecen ser altamente patógenos en la especie porcina y no se ha establecido en la población. Últimamente, los virus recombinantes de virus aviar H5N1 y H9N2 provocaron enfermedades y muerte en los cerdos en algunas partes de China y actualmente el virus H5N1 aviar se está transmitiendo entre humanos de diferentes países asiáticos.

Durante la vigilancia del virus de influenza porcina entre el 2004 y el 2006, **dos cepas del virus de la influenza H3N8 fueron aislados de cerdos en China central**. La secuenciación y el análisis filogenético de los ocho segmentos de genes revelaron que los dos aislamientos fueron de origen equino y más relacionado con el virus europeo de influenza equina de la década de los noventa. Una comparación de la secuencia de aminoácidos de la hemoaglutinina demostró varias sustituciones importantes.

Esta expansión de la gama de huéspedes de los virus de la influenza equina H3N8 con mutaciones en la proteína HA podría plantear la posibilidad de transmisión de estos virus a los seres humanos.

En el **2006, Shin y colaboradores, reportaron el aislamiento de un virus de influenza H3N1 en cerdos** que presentaron una infección respiratoria en dos granjas comerciales en Corea. El análisis filogenético demostró que los genes HA del virus porcino de Corea H3N1 se encontraba colocado en un fragmento diferente que los otros virus porcinos H3. Sin embargo, comparten la misma raíz con los grupos II y III de los virus porcinos H3N2 encontrados en Estados Unidos. El gen NA está colocado en el "cluster" porcino de Estados Unidos y está más relacionado con el virus Sw/Wisconsin/238/97, que es un virus aislado en Estado Unidos. Los genes restantes están más estrechamente relacionados con los virus Coreanos H1N1 y H1N2, esto sugiere que el virus H3N1 es una recombinación entre un linaje desconocido del virus H3N2 y el virus de influenza porcina.

A principios del 2008, dos virus porcinos **H5N2 fueron aislados en Corea**. La secuenciación y análisis filogenético de las proteínas de superficie revelaron que los virus Sw/Corea/C13/08 y Sw/Corea/C12/08, fueron derivados de virus de influenza aviar del linaje euroasiático. Sin embargo, aunque el virus Sw/Korea/C12/08 es un virus enteramente aviar, el

virus aislado Sw/Korea/C13/08 es una recombinación entre virus aviar y porcino, con los genes PB2, PA, NP y M procedente del virus porcino Coreano del 2006, H3N1.

Todos los datos antes mencionados son una recopilación de información que nos sirve para darnos cuenta que Asia es uno de los continentes que por sus usos y costumbres en el manejo de un solo hábitat para diferentes especies, así como la sobrepoblación que existe en algunos de sus países, permite que los virus evolucionen y se recombinen más rápido para poder infectar a otras especies, siendo quizá más patógena en la especie recién adaptada, esperando alguna modificación en sus regiones antigénicas que le permita reconocer nuevos receptores o quizá ser más virulento en una nueva especie. Por otro lado la responsabilidad de la enfermedad en nuestro país, recae en nosotros por tal motivo nos fijamos 2 objetivos en el presente estudio, los cuales fueron identificar variantes del virus de influenza y ver si hay cepas antigénicamente diferentes.

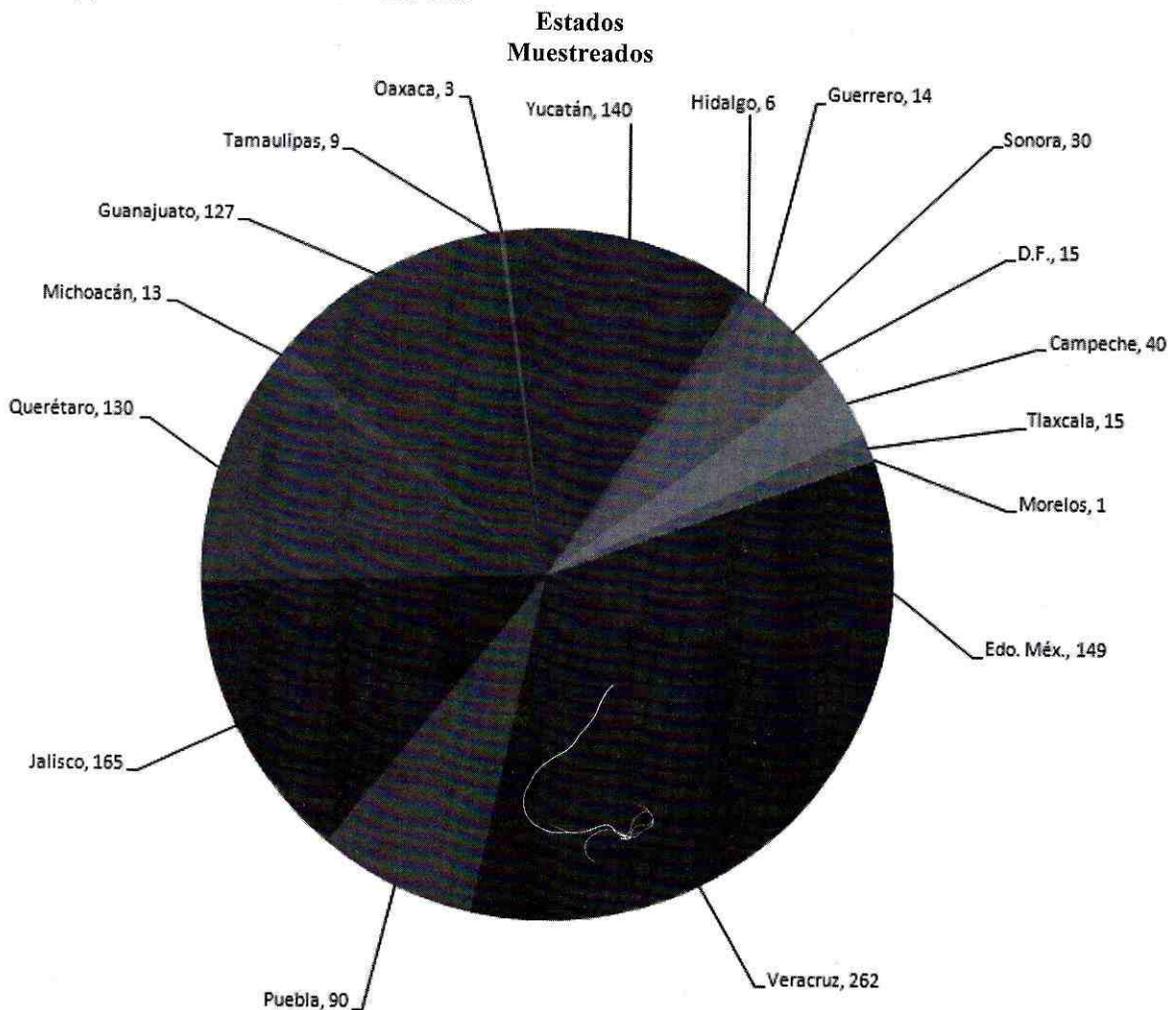
## MATERIAL Y MÉTODOS

### Identificación de variantes del virus de influenza porcina en México

Se realizó muestreo a nivel de rastro y se obtuvieron muestras de pulmón, tráquea y linfonodos, además también se consiguieron muestras de semen y suero.

Se obtuvieron un total de 1209 muestras, los estados de la Republica Mexicana muestreados los siguientes:

Estado de México (149), Veracruz (262), Puebla (90), Jalisco (165), Querétaro (130), Michoacán (13), Guanajuato (127), Tamaulipas (9), Oaxaca (3), Yucatán (140), Hidalgo (6), Guerrero (14), Sonora (30), D.F. (15), Campeche (40), Tlaxcala (15), Morelos (1). Total de muestras obtenidas: 1209



Se realizó la técnica de RT PCR de Tiempo Real dirigido hacia la proteína M para identificar las muestras positivas al virus de la Influenza Porcina.

Se obtuvieron un total de 33 muestras positivas.

#### Estado de México

(A/swine/Estado de México 1/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)  
(A/swine/Estado de México 2/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)  
(A/swine/Estado de México 19/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)  
(A/swine/Estado de México 23/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)  
(A/swine/Estado de México 47/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)  
(A/swine/Estado de México 48/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)  
(A/swine/Estado de México 49/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)  
(A/swine/Estado de México 50/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)  
(A/swine/Estado de México 51/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)  
(A/swine/Estado de México 52/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)

#### Veracruz

(A/swine/Veracruz 0/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)  
(A/swine/Veracruz 7/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)  
(A/swine/Veracruz 29/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)  
(A/swine/Veracruz 31/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)  
(A/swine/Veracruz 37/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)

#### Tamaulipas

(A/swine/Tamaulipas 3/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)  
(A/swine/Tamaulipas 4/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)

#### Oaxaca

(A/swine/Oaxaca 20/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)

#### Jalisco

(A/swine/Jalisco 26/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)  
(A/swine/Jalisco 27/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)  
(A/swine/Jalisco 27/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)

#### Querétaro

(A/swine/Querétaro 32/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)  
(A/swine/Querétaro 35/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)

#### Guanajuato

(A/swine/Guanajuato 36/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)

#### Michoacán

(A/swine/Michoacán 40/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)

#### Hidalgo

(A/swine/Hidalgo 74/DMZC.FMVZ.UNAM/2011)  
(A/swine/Hidalgo 46/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)

#### Sonora

(A/swine/Sonora 67/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)

#### Guerrero

(A/swine/Guerrero 68/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)

#### Distrito Federal

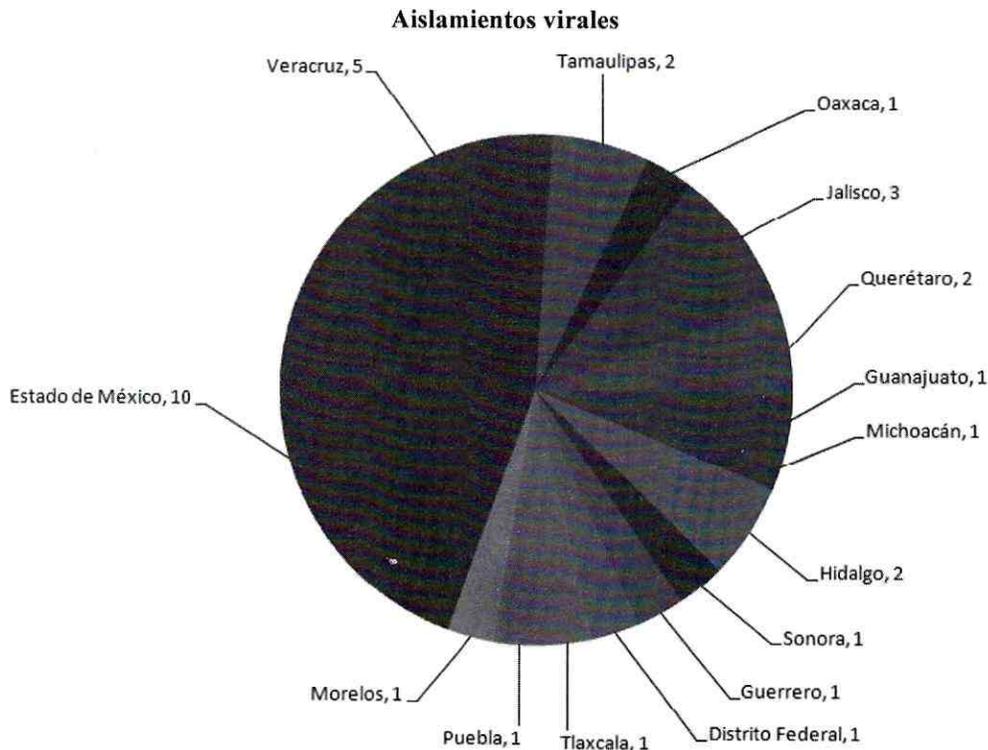
(A/swine/Distrito Federal 69/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)

Tlaxcala  
(A/swine/Tlaxcala 70/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)

Puebla  
(A/swine/Puebla 71/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)

Morelos  
(A/swine/Morelos 75/DMZC.FMVZ.UNAM/2011)

### Las muestras positivas fueron procesadas para Aislamiento Viral



Una vez aislados los virus de las muestras se realizó RT-PCR Punto Final, para identificar el subtipo presente en las muestras positivas, mediante el uso de los siguientes primers para cada uno de los genes:

H1= 1008 pb: H1F= (5' GGGACATGTTACCCAGGAGAT 3'), H1R= (5' GCATTGTATGTCCAAATATCCA 3')

N1= 850 pb: N1F= (5' GGTTCCAAAGGAGACATTTTGTG 3'), N1R= (5' CTATCCAAACACCATTGCCATA 3')

H3= 650 pb: H3F= (5' TATGCCTGGTTTTTCGCTCAA 3'), H3R= (5' CAGACACATCTATGCCTGG 3')

N2= 500 pb: N2F= (5' TGCGATCCTGACAAGTGTATC 3'), N2R= (5' CAGACACATCTGACACCAGGAT 3')

Los controles positivos que se utilizaron fueron los virus de referencia:

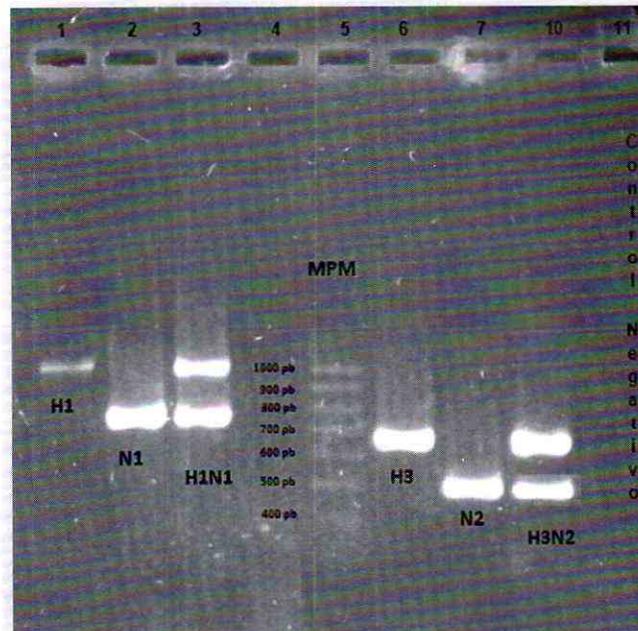
H1: Influenza A virus [(A/swine/New Jersey/11/1976(H1N1)).

N1: Influenza A virus [(A/swine/New Jersey/11/1976(H1N1)).

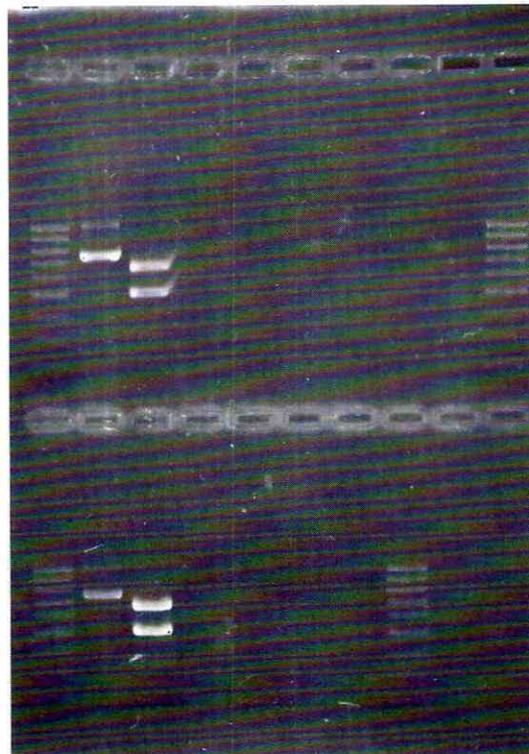
H3: Influenza A virus [(A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2)).

N2: Influenza A virus [(A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2)).

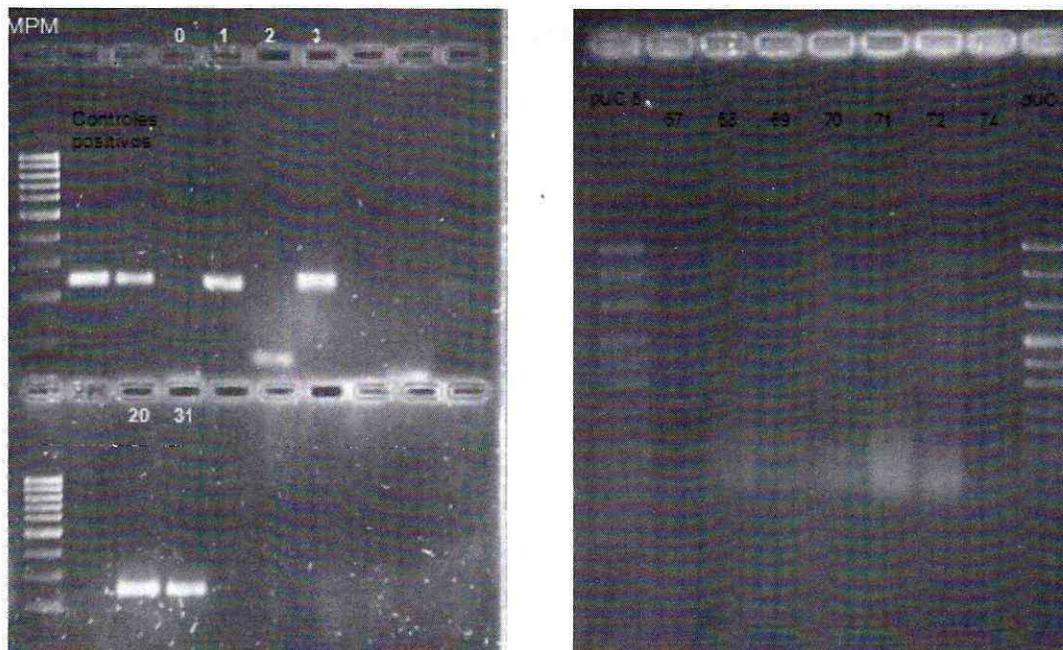
**RT-PCR de Controles positivos**



Se realizaron reacciones de RT - PCR de punto final múltiple para los genes H1N1 y H3N2, con el Kit de QIAGEN OneStep RT-PCR Kit, CAT. No. 210212, obteniéndose amplicones solo de los controles positivos, no todas las muestras de campo presentaron bandas sugerentes de alguno de los genes buscados.



Posteriormente se realizaron reacciones de RT - PCR de punto final para el gen M usando el Kit de QIAGEN OneStep RT-PCR, CAT. No. 210212. Se observaron que amplificaron bandas de muestras de campo y estas fueron de aproximadamente 239 pb. Se usaron los iniciadores con número 5643F (AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG) y 5649R (CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC) los cuales fueron diseñados en el DMZ:Cerdos, FMVZ. UNAM.



### Genes identificados en las muestras de campo

Se realizaron reacciones de RT - PCR de punto final para los genes H1 y N1 con el Kit de QIAGEN OneStep RT-PCR Kit, CAT. No. 210212, obteniéndose los siguientes resultados:

Para el gen H1 no se observaron amplicones sugerentes. Para el gen N1 se observaron amplicones en los pozos que correspondían a las muestras 0 (Veracruz), 1(Edo de Méx.), 2(Edo de Méx.), 3 (Tamaulipas), 7 (Veracruz), 19(Edo de Méx.), 20 (Oaxaca), 31(Veracruz) y el control positivo interno. Para el resto no se observaron amplicones, solamente se confirmó que había virus de influenza con RT-PCR con los primers que identifican el gen M.

### **Identificación de variación antigénica de diferentes aislamientos de influenza porcina**

**Aislamientos virales.** Se trabajaron con 8 aislamientos virales de Influenza porcina de diferentes partes de México, los cuales fueron reportados en párrafos anteriores.

**Replicación viral.** De cada uno de los aislamientos se realizó la replicación viral en embriones de pollo de 9-11 días. A las 72 horas postinoculación se procedió a titular con eritrocitos de ave al 0.5%. El virus recuperado de cada aislamiento sirvió para la elaboración del suero hiperinmune por aislamiento y para las pruebas de Inhibición de la hemoaglutinación homologa y heteróloga.

**Inactivación viral.** Los aislamientos con título viral de 128 a 256 unidades hemoaglutinantes (UH) fueron inactivados con luz UV a una longitud de onda de 300NM durante media hora y posteriormente se realizó una inactivación química utilizando formalina (formol al 5%), en una relación de 1:1 virus y formalina. Una vez inactivados fue evaluada la capacidad de replicación cada virus, inoculando 5 embriones de pollo de 9-11 días y a las 72 horas postinoculación se procedió a titular con eritrocitos de ave al 0.5%. Los aislamientos inactivados sin capacidad de replicación en el embrión fueron adyuvados con hidróxido de aluminio.

**Sueros hiperinmunes.** De cada uno de los virus obtenidos se inocularon 2 cerdos de raza York-Landrace de 2 meses de edad con 2 ml vía intramuscular y 1ml vía intranasal, repitiendo a los 7 y 14 días la misma inoculación para generar anticuerpos específicos hacia cada uno de los aislamientos. Se realizaron cuatro muestreos de sangre, el primero previo a la primera inoculación y tres posteriores a cada inoculación, para la obtención del suero que se utilizó en las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación. Una vez separados los sueros se mantuvieron en congelación (-20°C) hasta el momento de tener todas las muestras.

**Prueba de inhibición de la hemoaglutinación(IH).**

**IH Homóloga:** La prueba se utilizó para detectar la presencia de anticuerpos específicos de cada aislamiento con su suero hiperinmune respectivo por medio de la IH. Los sueros se pusieron en contacto con el virus para que se llevara a cabo una reacción antígeno-anticuerpo y el virus fuera neutralizado, la reacción fue evidenciada por medio de eritrocitos de ave al 0.5%, los cuales en presencia del virus aglutinan (suero negativo) y en ausencia de virus sedimentan (suero positivo). Las diluciones de los sueros iniciaron con 1:10 hasta 1:20480, se considero un título positivo a partir de una dilución de **1:80**. La lectura se realizó tomando la dilución inversa a donde comienzo a observarse la aglutinación de cada uno de los sueros.

**IH Heteróloga (Estudios de desafío cruzado).** Se realizo el ensayo de Inhibición de la hemoaglutinación empleando la técnica descrita anteriormente, utilizando diferentes diluciones de anticuerpos, confrontadas con los virus heterólogos a una concentración de 8 UH. Después de 1 hora se realizo la lectura. La interpretación de resultados se efectuó con los mismos criterios descritos en la IH Homologa.

**Porcentajes de protección cruzada.** El porcentaje de protección obtenido con los desafíos de virus homólogos y heterólogos fue calculado de la siguiente manera. Los valores de protección (VP) fueron calculados para cada una de los aislamientos usando la ecuación de Archetti and Horsfall <sup>18</sup> que se describe a continuación. Los títulos de IH fueron usados en el cálculo de los valores de relación antigénica (VRA). Los títulos fueron usados para establecer los valores de r1 y r2, en donde r1= título heterólogo #2 / título homólogo #1, y r2 = título heterólogo / homólogo #2. Los porcentajes de protección antigénica (PPA) que tuvieron un valor de 0 fueron reemplazados con el valor 0.01 para poder realizar los cálculos mediante la multiplicación de los valores de r (r1 x r2), del cual el resultado fue multiplicado por 100 para convertirlo en porcentaje.

Se obtuvieron los siguientes resultados con los virus utilizados.

1. (A/swine/Estado de México 19/DMZC.FMVZ.UNAM/2009)
2. (A/swine/Veracruz 29/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)
3. (A/swine/Veracruz 31/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)
4. (A/swine/Querétaro 35/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)
5. (A/swine/Veracruz 37/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)
6. (A/swine/Michoacán 40/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)
7. (A/swine/Estado de México 51/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)
8. (A/swine/Estado de México 52/DMZC.FMVZ.UNAM/2010)

**Cuadro 1.- Título de anticuerpos obtenidos de la prueba de Inhibición la Hemoaglutinación cruzada.**

ANTISUERO	VIRUS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
AV 1	40	640	320	320	320	640	640	5120
AV 2	40	160	320	320	160	320	640	10240
AV3	40	160	320	320	640	160	320	5120
AV 4	40	40	160	640	640	320	640	5120
AV5	40	320	160	320	80	80	320	10240
AV 6	40	320	320	320	160	2480	2560	2560
AV 7	40	80	160	320	80	160	320	10240
AV 8	80	320	160	320	160	320	640	10240

**Cuadro 2. Valores de relación antigénica entre aislamientos virales.**

VRA	VIRUS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
ANTISUERO								
AV 1	1.00	2.00	1.00	0.71	2.00	0.51	1.41	1.00
AV 2		1.00	1.00	0.35	2.00	0.51	1.00	1.41
AV3			1.00	0.50	2.00	0.25	0.71	0.50
AV 4				1.00	2.00	0.25	1.00	0.50
AV5					1.00	0.25	1.00	1.41
AV 6						1.00	0.72	0.18
AV 7							1.00	1.41
AV 8								1.00

### CONCLUSIONES

Con los resultados de variación antigénica podemos asegurar que existen virus antigénicamente diferentes que se encuentran circulando en la población porcina de México. Los virus de valor 0.5 o menor indican que son antigénicamente otro subtipo. Con el cuadro 2 podemos identificar que el aislamiento viral 2 y 4 son antigénicamente diferentes. El aislamiento viral número 6 es antigénicamente diferente al AV3, AV4 y AV5. También el aislamiento viral 8 y el AV6 son antigénicamente diferentes.

También podemos asegurar que los resultados del diagnóstico serológico de los laboratorios estará determinado por el virus que maneje el laboratorio diagnóstico, ya que un suero generado por un virus de campo, antigénicamente diferente, puede dar resultados falsos negativos.

Esto también tiene implicaciones en el control de la enfermedad ya que si las vacunas comerciales que actualmente existen no contemplan antígenos "semilla" con capacidad antigénica protectora, seguirán circulando los virus que no hayan sido controlados por los anticuerpos vacunales.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peiris, JSM., Guan, Y., Markwell, D., Ghose, P., Webster, RG, Shortridge, KF, 2001. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? *J. Virol.* 75, 9679–9686.
2. Brockwell-Staatsa C., Webstera GR, and Webbya RJ, 2009. Diversity of Influenza Viruses in Swine and the Emergence of a Novel Human Pandemic Influenza A (H1N1). *NIH* 1; 3(5): 207–213.
3. Guan, Y., K. F. Shortridge, S. Krauss, P. H. Li, Y. Kawaoka, and R. G. Webster. 1996. Emergence of avian H1N1 influenza viruses in pigs in China. *J. Virol.* 70:8041–8046.
4. Karasin, A. I., M. M. Schutten, L. A. Cooper, C. B. Smith, K. Subbarao, G. A. Anderson, S. Carman, and C. W. Olsen. 2000. Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977–1999: evidence for wholly human and reassortant genotypes. *Virus Res.* 68:71–85.
5. Yu H, Hua R-H, Zhang Q, Liu T-Q, Liu H-L, Li G-X, Tong G-Z: Genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in China from 1970 to 2006. *Journal of Clinical Microbiology* 2008, 46:1067-1075.
6. Zhou NN, Senne DA, Landgraf JS, et al. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J Virol* 1999; 73: 8851–56.
7. Ma, W., Vincent, A.L., Gramer, M.R., Brockwell, C.B., Lager, K.M., Janke, B.H., Gauger, P.C., Patnayak, D.P., Webby, R.J., Richt, J.A., 2007. Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 20949–20954.
8. Karasin et al., 2000b. A.I. Karasin, I.H. Brown, S. Carman and C.W. Olsen, Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. *J. Virol.* 74 (2000b), pp. 9322–9327.

9. Shin JY, Song MS, Lee EH, et al. Isolation and characterization of novel H3N1 swine influenza viruses from pigs with respiratory diseases in Korea. *J Clin Microbiol* 2006; 44:3923–7.
10. Yu H, Hua RH, Wei TC, Zhou YJ, Tian ZJ, et al. Isolation and genetic characterization of avian origin H9N2 influenza viruses from pigs in China. *Vet Microbiol*. 2008; 131:82–92.
11. Yu H, Zhang PC, Zhou YJ, Li GX, Pan J, Yan LP, et al. Isolation and genetic characterization of avian-like H1N1 and novel reassortant H1N2 influenza viruses from pigs in China. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 May 19. [Epub ahead of print].
12. Lee JH, Pascua PN, Song MS, Baek YH, Kim CJ, Choi HW, et al. Isolation and genetic characterization of H5N2 influenza viruses from pigs in Korea. *J Virol* 2009; 83:4205–15.
13. Ma, W., Gramer, M., Rossow, K., and Yoon, K. J. (2006). Isolation and genetic characterization of new reassortant H3N1 swine influenza virus from pigs in the midwestern United States. *J. Virol.* 80(10):5092–5096.
14. Tu J, Zhou H, Jiang T, Li C, Zhang A, Guo X, Zou W, Chen H, Jin M. Isolation and molecular characterization of equine H3N8 influenza viruses from pigs in China. *Arch Virol*. 2009;154:887–890
15. Liu S, Ji K, Chen J, Tai D, Jiang W, Hou G, Chen J, Li J, Huang B: Panorama phylogenetic diversity and distribution of type A influenza virus. *PLoS ONE* 2009, 4:e5022.
16. Liu W, Wei MT, Tong Y, Tang F, Zhang L, Fang L, Yang H, Cao WC. Seroprevalence and genetic characteristics of five subtypes of influenza A viruses in the Chinese pig population: A pooled data analysis. *Vet J*. 2009 Nov 26.
17. Olsen CW. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res* 2002;85:199–210.
18. Gall, A, Hoffmann, B, Harder, T, Grund, C, Beer, M. Universal primer set for amplification and sequencing of HA0 cleavage sites of all influenza A viruses. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2561–2567.