

## INFLUENZA PORCINA EN MÉXICO

\*Sánchez-Betancourt JI, Segura VA, Cervantes TJ, Harte BP, Avalos GP, Juárez DG, Mercado GMC, Carreón NR, Trujillo OME.  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Correo: aisb\_7@yahoo.com.mx

### INTRODUCCIÓN

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. 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.

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, 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. 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.

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.

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.

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.

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.

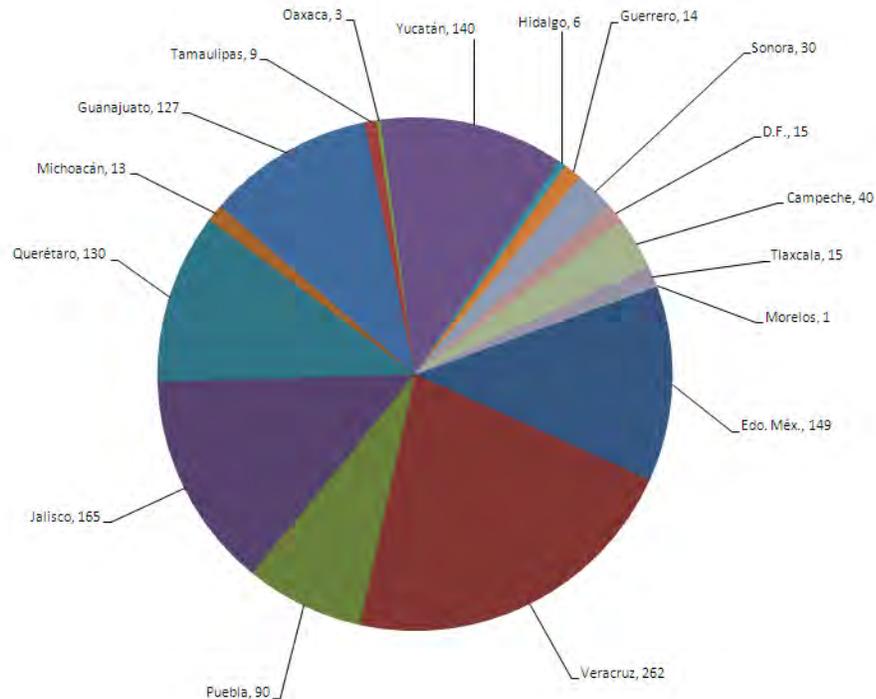
## **RESULTADOS EN MÉXICO**

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.

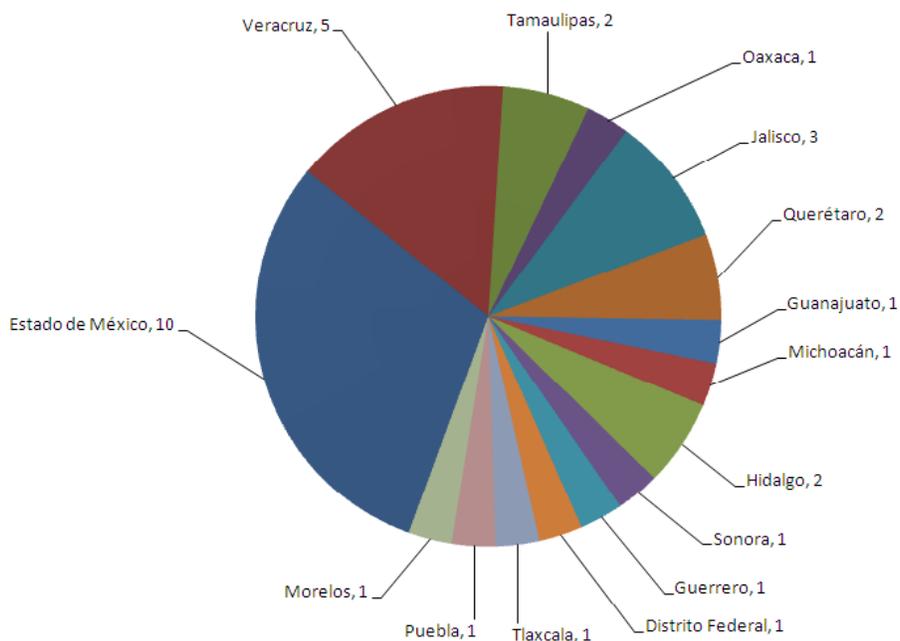
Se obtuvieron un total de 1209 muestras, los estados de la Republica Mexicana muestreados los siguientes:

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.

### Estados muestreados



### Muestras positivas qRT-PCR



## REPORTE DE LAS SECUENCIAS AL GEN BANK

Muestra	Nomenclatura	Acceso GenBank	Subtipo
Pulmón	(A/swine/Mexico/Mex19/2010(H1N1))	CY1223330	H1N1
Pulmón	(A/swine/Mexico/Ver29/2010(H1N1))	CY122386	H1N1
Pulmón	(A/swine/Mexico/Qro35/2010(H1N1))	CY122378	H1N1
Pulmón	(A/swine/Mexico/Ver37/2010(H1N1))	CY122401	H1N1
Pulmón	(A/swine/Mexico/Mich40/2010(H3N2))	CY122362	H3N2
Pulmón	(A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2))	CY122346	H3N2
Pulmón	(A/swine/Mexico/Mex52/2010(H1N1))	CY122354	H1N1

## DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN ANTIGÉNICA

**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 homóloga y heteróloga.

### 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 realizó el ensayo de Inhibición de la hemoaglutinación empleando la técnica descrita anteriormente, utilizando diferentes diluciones de anticuerpos, confrontadas con los virus heterólogos a una concentración de 8 UH. Después de 1 hora se realizó la lectura. La interpretación de resultados se efectuó con los mismos criterios descritos en la IH Homóloga.

**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  $r1 = \text{título heterólogo \#2} / \text{título homólogo \#1}$ , y  $r2 = \text{título heterólogo} / \text{homólogo \#2}$ . 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 ( $r1 \times r2$ ), del cual el resultado fue multiplicado por 100 para convertirlo en porcentaje.

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

Virus	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7
V1	<b>1.00</b>	0.7	0.7	0.5	0.5	0.5	0.5
V2		<b>1.00</b>	0.7	0.5	0.5	0.3	0.3
V3			<b>1.00</b>	0.7	0.7	0.5	0.5
V4				<b>1.00</b>	1.0	1.0	1.0
V5					<b>1.00</b>	1.0	1.0
V6						<b>1.00</b>	0.7
V7							<b>1.00</b>

## 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.

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.