



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA VACUNA INACTIVADA CONTRA INFLUENZA
PORCINA INCLUYENDO LOS SEROTIPOS DEL VIRUS H1N1 Y H3N2 DE
INFLUENZA PREVALENTES EN MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA

JUAN CARLOS MORA DÍAZ

Tutor Principal: JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Comité tutorial: EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

SUSANA LÓPEZ CHARRETÓN
Instituto de Biotecnología, UNAM

México D.F.

Septiembre 2014



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.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis padres y a mis hermanas, por su valioso apoyo en este proceso.

Gracias por demostrarme de nuevo que en los momentos más duros puedo contar con ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Ivan Sánchez Betancourt. Por haberme permitido participar en este interesante proyecto. Muchas gracias por su confianza y apoyo en la realización del presente trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial Dra. Edda Lydia Sciutto Conde y Dra. Susana López Charretón. Por todo el apoyo recibido durante este trabajo y por los consejos que me brindaron.

Al equipo de trabajo de influenza M. en C. Jacquelyne Cervantes, Dr. René Segura Velázquez, Dra. Gladis Frago González y M. en C. María del Carmen Mercado Segura y M. en C. Paulina Avalos. Por su apoyo y colaboración en la realización del presente trabajo.

A Berenice Salgado. Por todo el apoyo que me brindó durante la maestría, por su amistad y por estar siempre dispuesta a apoyarme.

A la M. en C. Rosalba Carreón Nápoles. Por el apoyo en la realización de este trabajo y por sus consejos.

Al M. en C. Marco Antonio Herradora. Por el apoyo brindado durante el cuidado de los lechones y por todos los consejos que me brindó.

A Pamela Arriaga. Por apoyarme en el cuidado de los cerdos y en la parte final del experimento.

A la M. en C. Mireya Juárez. Por los consejos que me brindó y el apoyo durante los primeros días de los cerdos.

A Víctor Carrera, Eva Montero. Por su apoyo durante la vacunación y toma de muestras de los animales.

A Brenda Sáenz. Por todos los consejos que me brindó durante estos dos años.

Al señor Inocente Lara. Por estar siempre dispuesto a ayudarme en el laboratorio, ya fuera con material, reactivos o consejos.

A Alicia Sotomayor. Por su gran amistad, por acercarme al DMZC y por todo su apoyo. A Lourdes Marion. Por el apoyo que me brindó durante la maestría, en especial durante el cuidado de los cerdos. Agradezco a las dos por estar cerca cuando más lo necesitaba.

Al Laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis. Por permitirme utilizar su Nanodrop y principalmente a la Dra. Beatriz Arellano Reynoso por todos sus consejos.

A la Dra. Amy Vincent. Por haberme permitido realizar la estancia de investigación en su laboratorio, fue una experiencia que nunca olvidaré y que me permitió aprender más de este virus.

A Chucho. Por la ayuda en el transporte de los lechones y su gran apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme una beca para la realización de mis estudios de maestría.

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT IN223514 “Determinación de la capacidad infecciosa de virus porcinos en células humanas.

RESUMEN

Influenza es una enfermedad viral zoonótica de gran importancia a nivel mundial por la amenaza que representa a la salud pública y animal. El virus de influenza porcina se encuentra ampliamente distribuido en las producciones porcinas del mundo, y es el principal agente causante de problemas respiratorios agudos en los cerdos. El virus de influenza A tiene un genoma RNA de cadena sencilla de sentido negativo (ssRNA) el cual consta de 8 segmentos, que codifica para 11 proteínas. Este genoma viral no cuenta con mecanismos de edición viral, lo que resulta en una alta capacidad mutacional. Esta causa de variación aunada a la que resulta de las posibles alteraciones por recombinación interespecie de material genético, promueve la generación de nuevas variantes virales con potencial patogénico en humanos y animales. La vacunación contra influenza porcina es una herramienta eficiente para prevenir la generación de nuevas variantes virales, que tiene el objetivo de limitar los efectos de la infección en las granjas y así mitigar las pérdidas económicas que esta enfermedad produce.

En este estudio se evaluó la capacidad protectora de una nueva formulación de vacuna parenteral de influenza porcina basada en las cepas prevalentes en la población porcina mexicana utilizando como adyuvante el péptido GK1 expresado en el fago filamentoso M13 (FGK1).

Se utilizaron 33 lechones libres de anticuerpos contra el virus de influenza, los cuales fueron distribuidos en seis grupos –vacuna con adyuvante (una y dos dosis), vacuna sin adyuvante (una y dos dosis), vacuna comercial y no vacunados (control positivo)– de cinco cerdos cada uno. Tres cerdos se dejaron sin ningún tratamiento para ser utilizados como control negativo. Se registró diariamente la temperatura corporal, signos clínicos y carga viral en secreciones nasales mediante RT-PCR después del desafío. Al cuarto día posterior a la infección, los cerdos fueron sacrificados y se obtuvieron muestras pulmonares para su evaluación histopatológica y cuantificación de la carga viral por RT-PCR.

La nueva vacuna formulada con el adyuvante FGK1 redujo la severidad de las lesiones pulmonares resultantes de la infección, aunque no previno la eliminación del virus de influenza en muestras nasales.

Palabras clave: Virus de influenza, Vacuna, Vacunación, Porcinos, Subtipos.

ABSTRACT

Influenza is a zoonotic viral disease of worldwide importance because the threat to public and animal health. Swine Influenza Virus is widely distributed in pig herds around the world, and is the main cause of acute respiratory diseases in pigs. Influenza A virus has a single-stranded RNA genome of negative-sense, which consists of 8 segments, encoding 11 proteins. This virus lacks of a viral editing mechanism, which allows a high mutational capacity of the genome, and even more important, a recombination of the RNA genome between the viruses may occur. This kind of recombination is not common, but when this happens, a pandemic disease may befall. Vaccination is the most efficient strategy to prevent the disease caused by Influenza A virus. This seems to limit the infection effects on the herds, reducing clinical disease and viral shedding, so this could mitigate the economic losses.

In this study we evaluated a new parenteral formulation of swine flu vaccine, based on the prevalent strains of Mexican herds with the adjuvant FGK1.

Thirty three piglets free from SIV antibodies, were divided into six groups – vaccine with FGK1 adjuvant (one and two doses), vaccine without FGK1 adjuvant (one and two doses), commercial vaccine, and non vaccinated pigs– of five pigs each one. Three pigs did not receive any treatment, and were used like a negative control.

After intranasal inoculation with influenza A virus, pigs were observed daily for signs of clinical disease and fever. Nasal swabs were taken daily to evaluate nasal shedding. The virus detection was performed by RT-PCR. Pigs were humanly euthanized on 4 days post infection to evaluate the lung lesions through histopathological examinations and the viral load in the lungs with RT-PCR.

The new vaccine formulated with the adjuvant FGK1 decreased the severity of the lung lesions. However, failed to prevent the nasal shedding of the virus, and it was detected in the lungs.

Keywords: influenza A virus, Vaccine, Vaccination, Swine, Influenza subtypes.

INDICE

	Página
Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Resumen	V
Abstract	VII
Cuadro de contenido	VIII
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Antecedentes	1
1.2 Historia de influenza porcina	2
1.3 Virus Influenza	3
1.4 Replicación del virus de influenza	6
1.5 Mecanismos de variación	7
1.6 Nomenclatura	8
1.7 Transmisión y patogenia	9
1.8 Signos clínicos	10
1.9 Lesiones	11
1.10 Respuesta inmune	11
1.11 Diagnóstico	16
1.12 Tratamiento	17
1.13 Prevención	17
1.13.1 Vacunación	18
1.13.2 Adyuvantes	21
1.13.2.1 FGK1	23
1.14 Influenza porcina en humanos	23
1.15 Producción porcina	25
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS	27

	Página
4. OBJETIVO	27
5. MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1 Animales	28
5.2 Virus de influenza porcina	28
5.2.1 Replicación del virus	28
5.2.2 Recolección del suero	29
5.2.3 Titulación del virus	29
5.3 Selección del método de inactivación	30
5.3.1 Inactivación por temperatura	30
5.3.2 Inactivación por rayos UV	31
5.3.3 Inactivación por rayos gamma	31
5.4 Formulación del vacuna	32
5.5 Vacunación	33
5.5.1 Primera vacunación	33
5.5.2 Segunda vacunación	33
5.6 Desafío de los cerdos	33
5.7 Toma de muestras	34
5.8 RT-PCR Tiempo real de muestras nasales	34
5.8.1 Extracción de RNA viral	34
5.8.2 RT-PCR Tiempo real	35
5.9 Necropsia y toma de muestras pulmonares	36
5.10 RT-PCR Tiempo real de muestras pulmonares	36
5.10.1 Extracción de RNA viral	36
5.10.2 RT-PCR Tiempo real de muestras pulmonares	36
6. RESULTADOS	
Inactivación del virus por temperatura	37
Inactivación del virus por rayos UV	37

	Página
Inactivación del virus por rayos gamma	38
Temperatura corporal tomada después de la infección	39
Signos clínicos	40
Carga viral de las muestras nasales	41
Carga viral de las muestras pulmonares	42
Histopatología	43
7. DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIONES	53
9. APENDICES	
9.1 Apéndice I	54
9.2 Apéndice II	55
9.3 Apéndice III	56
10. REFERENCIAS	57

INDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

	Página
Tabla 1. Grupos experimentales	28
Tabla 2. Condiciones de amplificación de RT-PCR tiempo real para diagnóstico de influenza.	35
Tabla 3. Número de embriones de pollo inoculados con influenza con título de 64 UH expuesto a rayos UV con diferentes tiempos en donde se presentó o no replicación viral.	37
Tabla 4. Número de embriones de pollo inoculados con influenza con título de 128 UH expuesto a rayos UV con diferentes tiempos en donde se presentó o no replicación viral.	38
Tabla 5. Número de embriones de pollo inoculados con influenza expuesta a rayos gamma donde se presentó o no replicación viral.	38
Gráfica 1. Temperatura promedio de los diferentes grupos experimentales.	40
Gráfica 2. Severidad de los signos clínicos por día después del desafío con el virus de influenza porcina.	41
Gráfica 3. Carga viral de las muestras nasales en las 48 horas post infección.	42
Gráfica 4. Carga viral de las muestras pulmonares de los diferentes grupos experimentales.	43
Gráfica 5. Promedio de severidad de lesiones pulmonares por grupo.	44
Gráfica 6. Severidad acumulada de lesiones pulmonares por grupo.	45

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Las enfermedades respiratorias causadas por virus que afectan a los cerdos domésticos, tales como Influenza porcina y el Síndrome respiratorio y reproductivo porcino han adquirido en los últimos años una importancia considerable a nivel mundial por su impacto en la salud pública y en la economía.

La influenza porcina es una enfermedad viral altamente contagiosa que afecta a los cerdos domésticos y silvestres, provocando problemas respiratorios que aunados a patógenos oportunistas (virus, bacterias) puede complicar el cuadro clínico. Esta enfermedad se caracteriza por tener un inicio muy rápido de los signos clínicos y una recuperación del animal de igual manera rápida (Vincent *et al.* 2008).

El virus de influenza porcina tiene un genoma RNA segmentado lo que le confiere una ventaja evolutiva que permite a los genes de diferentes cepas virales (de origen aviar, porcino o humano) el recombinarse durante la infección de una célula, creando así una progenie de virus con características únicas. Debido a que estas recombinaciones pueden concluir en una variante epidémica, es necesario tener sistemas de vigilancia para virus de influenza humana e influenza de animales (Krauss *et al.* 2003).

En los Estados Unidos aproximadamente del 25 - 33 % de los cerdos de finalización de 6 a 7 meses y el 45 % de los cerdos de cría tienen anticuerpos contra el virus de influenza porcina clásica H1N1 (CFSPH 2009).

La vacunación de los cerdos es una forma muy efectiva de controlar la enfermedad y teniendo en cuenta la capacidad de recombinación que tiene este virus, las vacunas actuales se formulan utilizando mínimo dos diferentes antígenos virales y en algunos casos tres (MacLachlan y Dubovi 2011).

En estudios anteriores se ha demostrado que las cepas virales presentes en las vacunas comerciales no protegen contra la influenza porcina en México, ya

que no son los serotipos prevalentes en la producción porcina mexicana (Avalos 2012).

Es por eso que en el presente estudio se realizó una vacuna inactivada contra el virus de influenza porcina utilizando cuatro virus de los serotipos H1N1 y H3N2 presentes en diferentes estados de la República Mexicana. Además esta vacuna inactivada incluyó al péptido GK1 de 18 aminoácidos expresado en el fago M13 (FGK1) como adyuvante, que en otros estudios ha sido demostrada su capacidad inmunopotenciadora co-administrado con vacuna comercial (Segura 2004).

1.2 Historia de influenza porcina

En 1918 se presentó la pandemia de influenza más catastrófica de la historia, el 40% de la población humana fue infectada, muriendo más de 20 millones de personas en todo el mundo. Esta pandemia fue causada por un virus de influenza H1N1 el cual se estableció en la población humana (Brockwell-Staats *et al.* 2009).

Se cree que el virus de influenza pudo haber sido introducido a la población porcina durante esta pandemia, debido a que durante el mismo periodo se empezó a describir una enfermedad con signos clínicos similares a la influenza humana en la población porcina (Vincent *et al.* 2008). Aunque los virus de influenza de 1918 de humanos y cerdos tuvieron un linaje similar y quedaron establecidos en estas poblaciones, los dos evolucionaron por separado (Brockwell-Staats *et al.* 2009).

El virus de influenza fue aislado por primera vez en 1931 por Richard E. Schope en muestras porcinas obtenidas durante un brote epizootico de Peste porcina clásica en Iowa en 1928 (Artenstein 2010). El virus fue aislado en humanos en 1933 de filtrados de lavados traqueales en el Instituto Nacional Británico de Investigación Médica (Artenstein 2010).

En 1940 Frank Macfarlane logró cultivar exitosamente el virus de influenza en saco amniótico de embriones de pollo (Artenstein 2010).

Durante casi 70 años la cepa predominante de influenza en los cerdos de Norteamérica fue el subtipo H1N1 o también conocido como virus de influenza porcina clásico H1N1 (cH1N1) (Vincent *et al.* 2008). En 1998 se aisló en los Estados Unidos el subtipo H3N2 triple recombinante en la población porcina, el cual contenía los genes HA, NA y PB1 de origen humano, genes NP, M y NS del virus porcino clásico y genes PB2 y PA de virus de influenza aviar de Norteamérica (Schnitzler y Schnitzler 2009).

En América se han identificado cuatro grupos filogenéticos del subtipo H3N2, los cuales son nombrados I, II, III y IV. También se han identificado cuatro grupos filogenéticos en el subtipo H1 porcino: α (cH1N1), β (rH1N1), δ (huH1N1, huH1N2) y γ (H1N2). Los virus pandémicos forman otro grupo separado de los virus de influenza porcina de Norteamérica (Chen *et al.* 2012).

1.3 Virus Influenza

El virus de influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* la cual está conformada por 5 géneros: el virus de Influenza tipo A, B y C, Thogotovirus e Isavirus. Los virus de influenza tipo A, B y C se clasifican en base a su diferencia antigénica entre sus nucleoproteínas y proteínas de matriz (Ardans 1999; Vincent *et al.* 2008).

De esta familia solo el virus de influenza A es de importancia zoonótica, debido a que los virus de influenza B y C sólo afectan a los humanos (Krauss *et al.* 2003; Vincent *et al.* 2008). El virus de influenza tipo A tiene la capacidad de infectar muchas especies como son aves, humanos, cerdos, caballos, perros y mamíferos marinos (Ardans 1999).

Dada la interacción mundial de este virus entre estas especies, existe un alto potencial de transmisión entre especies del virus de influenza en la naturaleza (Ardans 1999).

Los virus de influenza A tienen una envoltura lipídica proveniente de la membrana celular de las células que infectan. Es un virus pleomórfico esférico o filamentoso con un diámetro de aproximadamente 80 – 120 nm (Vincent *et al.*

2008). Posee un genoma RNA segmentado de cadena sencilla de sentido negativo (Bouvier *et al.* 2008). Este virus tiene 8 segmentos genómicos que varían de longitud entre los 890 y 2341 nucleótidos y en total codifica 11 proteínas. Cada uno de los segmentos codifica una proteína, a excepción del segmento 7 (Matriz, M) y el segmento 8 (No estructural, NS) que codifican 2 proteínas cada uno (Vincent *et al.* 2008; Carter *et al.* 2012). Y en algunas cepas virales el segmento 2 (Polimerasa básica 1, PB1) codifica una segunda proteína pequeña llamada PB1-F2, la cual tiene una actividad pro-apoptótica (Bouvier *et al.* 2008).

Los segmentos 1, 2 y 3 codifican a las proteínas polimerasas: polimerasa básica 2 (PB2), polimerasa básica 1 (PB1) y polimerasa ácida (PA). Estas proteínas se unen formando el complejo RNA polimerasa dependiente de RNA el cual es responsable de la transcripción y replicación del genoma viral. Este complejo trimérico se une a la terminación 5' y 3' del RNA viral formando un complejo circular no covalente (Vincent *et al.* 2008).

El segmento 5 codifica para la proteína de la nucleocápside (NP) la cual se une a los fragmentos de RNA. La nucleoproteína, el RNA viral y el complejo RNA polimerasa dependiente de RNA forman el complejo ribonucleoproteínico (RNP) (Vincent *et al.* 2008).

La nucleoproteína es la encargada de transportar el complejo ribonucleoproteínico al núcleo de la célula huésped (Klenk 2012).

Los segmentos 4 y 6 codifican las glicoproteínas de superficie viral hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) respectivamente. La hemaglutinina es la mayor proteína de la envoltura la cual forma proyecciones como puntas en la superficie del virión (Crisci *et al.* 2013). También es la proteína determinante de la virulencia y de la especificidad del huésped, debido a que se une a los ácidos siálicos (que son los receptores virales en las células huésped), por lo que promueve la fusión de las membranas viral y celular en la endocitosis (Lorusso *et al.* 2013). La neuraminidasa es una sialidasa responsable de escindir ácido siálico de las células huésped y las partículas virales (Vincent *et al.* 2008; Crisci *et al.* 2013). También se cree que la neuraminidasa es parte esencial de la infectividad

del virus, ya que ayuda a romper las mucinas de las secreciones del tracto respiratorio, permitiendo que el virus pueda pasar a través del epitelio respiratorio, haciendo que esta glicoproteína tenga un papel muy importante en la entrada del virus en las células epiteliales respiratorias (Bouvier *et al.* 2008; Klenk 2012). Estas dos proteínas son el principal blanco de la respuesta inmune (CFSPH 2009). La hemaglutinina y la neuraminidasa se encuentran en el virión en una proporción de 4 a 1 (Bouvier *et al.* 2008). Los subtipos del virus de influenza A se definen por la naturaleza de su hemaglutinina y neuraminidasa que proyectan en la envoltura viral y que a su vez determina su antigenicidad (Crisci *et al.* 2013).

Actualmente se han identificado 17 formas de hemaglutinina (H1 – H17) y 9 formas de neuraminidasa (N1 – N9) y la combinación define el subtipo (Olsen *et al.* 2006; Crisci *et al.* 2013). Los virus de influenza porcina de mayor circulación contienen H1, H2 o H3 y N1, N2 o N3, aunque también se ha logrado el aislamiento de virus que contienen otras hemaglutininas y neuraminidasas. (CFSPH 2009)

El segmento 7 codifica para la proteína estructural de matriz viral M1 que es la más abundante en el virión y se encuentra debajo de la envoltura lipídica. La proteína M1 es esencial en la gemación del virus y también regula el movimiento del complejo ribonucleoproteínico afuera del núcleo e inhibe la síntesis de RNA viral en las últimas etapas de la replicación viral (Klenk 2012). También codifica la glicoproteína M2 la cual funciona como canal iónico (Vincent *et al.* 2008), siendo la responsable de la acidificación del núcleo del virus, desencadenando la disociación de la proteína M1 del complejo ribonucleoproteínico (Klenk 2012).

El segmento 8 codifica la proteína no estructural NS1 y la proteína nucleica de exportación (NEP). La proteína NS1 es un antagonista de la respuesta inmune innata del huésped e interfiere con la expresión génica del huésped, mientras NEP está involucrada en la exportación nuclear de RNPs hacia el citoplasma antes del ensamblaje viral (Vincent *et al.* 2008).

1.4 Replicación del virus de Influenza

La replicación del virus de influenza porcina inicia cuando la hemaglutinina se une a los receptores AS- α 2-3-Gal o AS- α 2-6-Gal de las células epiteliales, con lo que se da una fusión con la membrana celular e inmediatamente se presenta la endocitosis mediada por receptores (Bouvier *et al.* 2008; Kawaoka y Neumann 2012).

Una vez que el virus es endocitado, la acidez del compartimiento endosomal va a desencadenar el desnudamiento del virus. Primero la baja del pH desencadena cambios morfológicos en la hemaglutinina, exponiendo el péptido de fusión que medía la fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal, en consecuencia, abre un poro a través del cual los RNPs virales son liberados en el citoplasma celular del huésped (Bouvier *et al.* 2008).

En segundo lugar el canal iónico M2 provoca la disminución del pH en la partícula vírica lo que provoca el desnudamiento del virus y permite la liberación de los componentes internos ó complejo ribonucleoproteínico (Bouvier *et al.* 2008; Klenk 2012).

Posteriormente el complejo ribonucleoproteínico es transportado al núcleo de la célula huésped gracias a la nucleoproteína la cual realiza esta acción mediante la interacción con la maquinaria de importación nuclear de la célula (Klenk 2012), y es en el núcleo en donde tiene lugar la transcripción y la replicación. El RNA viral (vRNA) sirve como template para otros dos tipos de RNA: el RNA complementario (cRNA) el cual es un copia completa del RNA viral y la otra estructura es un RNA mensajero (mRNA). El RNA complementario es un template para nuevas moléculas de RNA viral. El mRNA viral utiliza la maquinaria de traducción celular para la síntesis de proteínas virales (Bouvier *et al.* 2008; Kawaoka y Neumann 2012; Klenk 2012).

La traducción de la nucleoproteína, las proteínas polimerasas, proteínas de matriz y proteínas NS1 y NS2 ocurre en los polisomas libres. Las ribonucleoproteínas son ensambladas en el núcleo y posteriormente son exportadas al citoplasma con la ayuda de las proteínas M1 y NEP (Kawaoka y

Neumann 2012). Las proteínas de envoltura hemaglutinina, neuraminidasa y M2 son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso, luego son plegadas y transportadas a la aparato de Golgi en donde sufren una modificación postraducciona, finalmente son exportadas por el aparato exocitótico a la membrana plasmática (Bouvier *et al.* 2008). En este lugar las proteínas virales recién sintetizadas y el complejo ribonucleoproteínico son ensamblados y acto seguido se da la liberación de los viriones de influenza (Kawaoka y Neumann 2012).

El virus de influenza es completamente infeccioso hasta que el virión tiene el genoma completo compuesto de los 8 segmentos (Bouvier *et al.* 2008).

La gemación del virus de influenza inicia en la membrana celular posiblemente por una acumulación de la proteína M1 en el lado citoplasmático de la bicapa lipídica. Cuando ocurre la liberación del virus, las hemaglutininas continúan uniendo al virión con los ácidos siálicos de la célula huésped hasta que las partículas virales son activamente liberadas por la actividad de una sialidasa de la neuraminidasa (Kawaoka y Neumann 2012).

La sialidasa escinde los residuos de ácido siálico terminales de las glicoproteínas de la superficie celular y de los gangliósidos, con la finalidad de liberar la nueva progenie viral de la célula huésped (Bouvier *et al.* 2008; Kawaoka y Neumann 2012; Klenk 2012).

1.5 Mecanismos de variación

La naturaleza segmentada del genoma RNA del virus de influenza contribuye a que este patógeno se encuentre en un continuo cambio de su contenido genético (Webster y Hulse 2004).

Este virus carece de un mecanismo de edición viral, lo cual tiene como consecuencia que sea incapaz de reparar los errores que ocurren durante la replicación viral (Webster y Hulse 2004). Es por eso que durante la replicación el virus de influenza acumule mutaciones puntuales dentro del genoma viral, resultando en un desplazamiento de las cepas existentes por nuevas variantes.

Este proceso se le conoce como deriva antigénica (Webster y Hulse 2004; CFSPH 2009).

Este mecanismo es más marcado en las proteínas de superficie como hemaglutinina y neuraminidasa en donde la selección es mediada por anticuerpos, siendo más aparente en los virus de influenza humana (Webster y Hulse 2004).

Otro mecanismo que utiliza el virus de influenza el cual es más abrupto es el reordenamiento genético. Esto ocurre cuando virus distintos de influenza infectan una célula al mismo tiempo y dada la naturaleza genómica segmentada del virus al formarse la nueva progenie existe un intercambio de genes. La nueva progenie tiene genes del virus progenitor y de un virus distinto. Este mecanismo puede formar nuevas variantes virales, las cuales pueden ser causantes de pandemias (Webster y Hulse 2004; CFSPH 2009).

El virus de influenza porcina puede recombinarse con virus de influenza aviáres, humanos o equinos, y formar virus híbridos. Por ejemplo una recombinación de este tipo entre los virus de influenza humana y porcina puede formar un virus con proteínas de origen humano y porcino (Webster y Hulse 2004).

El cambio antigénico puede resultar de tres mecanismos: el reordenamiento genético entre subtipos, la transferencia directa de un virus de una especie a otra y la re emergencia de un virus que se encontró previamente pero que ya está en circulación (Webster y Hulse 2004).

1.6 Nomenclatura

Los virus de influenza porcina son nombrados utilizando la siguiente nomenclatura: A (tipo), especie de origen, lugar de aislamiento, número de aislamiento y año del aislamiento. Entre paréntesis se pone el subtipo al que pertenece (hemaglutinina y neuraminidasa). Por ejemplo A/swine/New Jersey/8/79 (H1N1) (Ardans 1999; Olsen *et al.* 2006).

1.7 Transmisión y patogenia

El virus de influenza porcina se propaga entre cerdos a través de contacto directo de secreciones vía nasal y a través de la inhalación de virus aerolizado en gotas generado por estornudos, tos y por fómites (Olsen *et al.* 2006; CFSPH 2009). La ruta nasofaríngea es el método primario de transmisión directa entre cerdo y cerdo. Las células blanco de infección son las células epiteliales de cavidad nasal, tráquea, tonsilas, bronquios, bronquiolos y alveolos, así como linfonodos y casi nunca entran a otros tejidos (Van Reeth 2007; Janke 2013). El virus tiene preferencia por pulmones sobre tracto respiratorio superior (Van Reeth *et al.* 2013).

Una vez que el virus de influenza porcina entra a la granja continúa circulando tanto tiempo como haya cerdos susceptibles y es usualmente persistente en la granja (Olsen *et al.* 2006; CFSPH 2009).

Únicamente los virus de los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 se han recuperado de forma habitual del cerdo aunque se ha detectado la presencia de otros subtipos serológicamente o por aislamientos esporádicos en animales infectados subclínicamente como H9N2, H4N6, H1N7 y H5N1 (Webby y Webster 2001) (pero no han quedado establecidos en los cerdos), y no existen indicaciones que existan diferencias en la virulencia entre los subtipos o las cepas (Yoon y Janke 2004; Van Reeth 2007).

Los cerdos jóvenes son más susceptibles a la infección por el virus de influenza porcina que los cerdos adultos (Chen *et al.* 2012).

Los cerdos son susceptibles a la infección con virus de influenza A humano y aviar debido a que en su tracto respiratorio expresa los receptores AS- α 2-3-Gal, que es utilizado preferentemente por virus de influenza aviar y AS- α 2-6-Gal, que es utilizado por los subtipos virales H1, H2 y H3 de influenza humana (Olsen *et al.* 2006; Thacker y Janke 2008).

1.8 Signos clínicos

La infección por influenza porcina se manifiesta como una enfermedad respiratoria aguda caracterizada por fiebre ($> 42^{\circ}\text{C}$), apatía, inapetencia, diestres respiratorio, tos, estornudos, conjuntivitis, rinitis, dificultad respiratoria y descarga nasal (Vincent *et al.* 2008; MacLachlan y Dubovi 2011; Janke 2013).

El inicio de la enfermedad es abrupto generalmente de 24 a 72 horas y la recuperación es rápida empezando desde el día 3 de la infección. Generalmente a los 7 días de inicio de la enfermedad los cerdos comen normalmente (Van Reeth 2007; Vincent *et al.* 2008; MacLachlan y Dubovi 2011).

Es muy común que los cerdos presente la infección de manera subclínica y que sean infectados con uno o más subtipos virales de influenza sin presentar ningún signo clínico (Van Reeth 2007), puede ocurrir que solo del 25 al 30% de los animales presenten signos clínicos (CFSPH 2009).

Esta enfermedad se caracteriza por tener una morbilidad del 100% y una mortalidad baja menor al 1%, a menos de que la enfermedad se encuentre de manera recurrente en la granja y/o los lechones sean muy jóvenes (Olsen *et al.* 2006; Vincent *et al.* 2008).

La eficacia reproductiva de los machos y de las hembras puede verse afectada por el virus de influenza porcina, principalmente por el subtipo H3N2 triple recombinante (Yoon y Janke 2004; Schnitzler y Schnitzler 2009). Dependiendo de la fase de gestación, las hembras pueden mostrar diversos problemas reproductivos que incluyen las repeticiones, abortos, aumento de la infertilidad, disminución del tamaño de las camadas y una disminución de la viabilidad de los lechones recién nacidos (Yoon y Janke 2004; Olsen *et al.* 2006; Janke 2013).

Los signos clínicos y la patogénesis de influenza en cerdos muestran notables similitudes con los de influenza estacional en humanos, pero la epidemiología es diferente (Van Reeth y Nicoll 2009).

La enfermedad y la infección es muy transitoria la secreción nasal y la replicación en los pulmones dura entre 6 y 7 días (Van Reeth 2007).

1.9 Lesiones

Los cerdos desarrollan bronconeumonía intersticial la cual está caracterizada por lesiones pulmonares bien delimitadas en los lóbulos apical y craneal, con hiperemia, consolidación multifocal a coalescente morado rojiza y la presencia de exudado inflamatorio en vías aéreas (Olsen *et al.* 2006; Vincent *et al.* 2008; MacLachlan y Dubovi 2011). Otras partes de los pulmones pueden estar pálidas y enfisematosas. Las vías aéreas a menudo están dilatadas y con exudado mucopurulento (CFSPH 2009). Algunas cepas de influenza porcina producen lesiones más marcadas que otras (CFSPH 2009).

Los cambios microscópicos en el pulmón consisten de necrosis de las células del epitelio bronquiolar aguda y desprendimiento de estas células al lumen de las vías respiratorias, las cuales a menudo contienen debris celular, fluido proteínico y pocos leucocitos (Vincent *et al.* 2008; Chen *et al.* 2012). Las células inflamatorias causan obstrucción de las vías aéreas y un daño pulmonar substancial por la liberación de sus enzimas (Van Reeth 2007). Hay colapso de espacios aéreos adyacentes, neumonía broncointersticial y enfisema (Olsen *et al.* 2006; MacLachlan y Dubovi 2011).

1.10 Respuesta inmune

La primera línea de defensa contra la infección del virus de influenza porcina es la respuesta inmune innata, la cual inhibe la replicación del virus de influenza de una forma no específica, por lo tanto es muy importante en la contención temprana de la infección del virus (Ma y Richt 2010). Las células huésped contienen receptores de reconocimiento de patógenos que detectan patrones moleculares específicos asociados a patógenos virales, procariontes y protozoarios y que pueden unirse selectivamente a ellos (Vincent *et al.* 2008; Tizard 2009). Los receptores de reconocimiento de patógenos están localizados en sitios en donde comienzan las primeras etapas de la infección (Flint *et al.* 2009). Algunos receptores que reconocen virus de cadena sencilla como el virus de influenza son las helicasas RNA Rig-I y MDA-5, las cuales son capaces de

detectar modificaciones químicas en el RNA viral y que no aparecen en el RNA celular (Vincent *et al.* 2008; Flint *et al.* 2009). Los receptores tipo Toll TLR 3 y TLR 7, se expresan en las membranas endosomales al interior celular y son necesarios para el reconocimiento de RNA vírico monocatenario (Flint *et al.* 2009; Tizard 2009).

Cuando ocurre el ataque del virus al tejido mucoso del tracto respiratorio los receptores de reconocimiento de patógenos se unen al patógeno y sobreviene una cascada de transducción de señales que resulta en la activación de proteínas reguladoras de transcripción citoplasmática como Nf-kb y el factor regulador de interferones 7 (Irf7) (Flint *et al.* 2009). Las proteínas reguladoras estimulan la expresión génica de interferón tipo 1 (IFN α/β) y citocinas proinflamatorias (Flint *et al.* 2009). Los interferones de tipo 1 que son secretados por las células infectadas se unen al receptor CDw118 de la célula productora y de células vecinas, originando un estado antivírico en pocos minutos, el cual alcanza su máximo entre 5 y 8 horas más tarde (Tizard 2009).

La presencia de citocinas en la sangre es uno de los primeros indicadores de que el cerdo ha sido infectado y que las defensas humanas han sido activadas (Flint *et al.* 2009).

La presencia de interferones tipo 1 regula la producción de proteínas de la célula huésped como Mx, PKR y OAS, las cuales inhiben la replicación del virus o lo destruyen (Vincent *et al.* 2008). La proteína Mx es una GTPasa que tiene una fuerte actividad antiviral, la cual inhibe la traducción del RNAm de los virus de influenza mediante la supresión de la actividad de la proteína G (Tizard 2009; Kreijtz *et al.* 2011).

El virus de influenza ha desarrollado mecanismos para interferir con la cascada de señalización de los interferones α y β como parte de su supervivencia. La proteína NS1 del virus interactúa con la respuesta antivírica de los interferones α y β mediante un dominio efector que se encuentra en la terminación carboxi de esta proteína y que antagoniza con la vía del interferón (Vincent *et al.* 2008). La

proteína NS1 secuestra el RNA viral evitando la detección por parte de los sensores de la célula huésped (Vincent *et al.* 2008).

La respuesta inmune adquirida forma la segunda línea de defensa contra la infección del virus de influenza. Esta respuesta consiste de la inmunidad humoral mediada por anticuerpos y la inmunidad mediada por células, las cuales están entrelazadas y son necesarias para proporcionar una inmunidad protectora (Vincent *et al.* 2008; Kreijtz *et al.* 2011).

En la inmunidad humoral se producen anticuerpos virus-específicos contra las principales proteínas virales (Ma y Richt 2010). Los anticuerpos específicos contra la hemaglutinina son los más importantes ya que se unen a la cabeza globular trimérica de la hemaglutinina e inhiben la entrada del virus a la célula huésped (Kreijtz *et al.* 2011), provocando la neutralización del virus de influenza y por lo tanto previene la infección (Ma y Richt 2010). Estos anticuerpos se pueden unir también a la región del tallo de la hemaglutinina, la cual es una región más conservada que la cabeza globular y que se encuentra más protegida del sistema inmune (Kreijtz *et al.* 2011). Es por eso que estos anticuerpos se encuentran en títulos bajos, pero se ha observado que tienen la capacidad de reconocer y unirse a la hemaglutinina de diferentes subtipos y tienen una amplia capacidad neutralizante (Kreijtz *et al.* 2011). Además estos anticuerpos facilitan la fagocitosis de las partículas virales (Kreijtz *et al.* 2011). Los anticuerpos contra la neuraminidasa también participan en la respuesta humoral, pero estos son menos efectivos previniendo la infección que los anticuerpos específicos contra la hemaglutinina (Ma y Richt 2010).

Estos anticuerpos no neutralizan directamente al virus de influenza, pero sí inhiben la capacidad enzimática de la neuraminidasa, provocando que limite la liberación del virus (Kreijtz *et al.* 2011).

Las principales inmunoglobulinas presentes en la respuesta inmune humoral son IgA, IgG e IgM. Los anticuerpos IgA secretados son producidos localmente y son transportados a lo largo de la mucosa del tracto respiratorio, permitiendo la protección de las células epiteliales frente a la infección viral (Kreijtz

et al. 2011). Estos anticuerpos son capaces de neutralizar el virus intracelularmente (Kreijtz *et al.* 2011).

Los anticuerpos IgG pasan a tracto respiratorio y permiten una protección de larga duración (Kreijtz *et al.* 2011).

La inmunidad humoral contra el virus de influenza tiene como limitante el continuo cambio antigénico del virus (Ma y Richt 2010).

La inmunidad mediada por células es la más importante en el control de la infección del virus de influenza, esto se debe a que las células T están más ampliamente dirigidas a las regiones conservadas de todas las proteínas internas y de superficie (Van Reeth y Ma 2013). Estas células eliminan al virus de las células infectadas del tracto respiratorio, lo que contribuye a que el cerdo se recupere de la enfermedad (Ma y Richt 2010).

Durante la infección se inducen las células T CD4+, CD8+ y reguladoras (Kreijtz *et al.* 2011). La respuesta de estas células es principalmente hacia los epítomos de las nucleoproteínas, las cuales son de las más conservadas del virus de influenza. Para que estos antígenos virales puedan ser reconocidos por las células T deben ser degradados en pequeños péptidos inmunogénicos en las células presentadoras de antígeno y ser presentadas en la superficie de estas células en asociación con moléculas del Complejo Principal de histocompatibilidad (CMH) (Van Reeth y Ma 2013).

Las células T CD4+ son activadas después de reconocer proteínas exógenas en la superficie de las células presentadoras en el CMH clase II (Flint *et al.* 2009). Después de esta interacción las células T colaboradoras (Th) CD4+ maduran en células Th1 o Th2 (Flint *et al.* 2009). Las células Th2 estimulan una respuesta de células B, es decir una respuesta más humoral que mediada por células (Kreijtz *et al.* 2011). Estas células producen IL-4 e IL-13 (Kreijtz *et al.* 2011). La IL-4 estimula el crecimiento y diferenciación del linfocito B y activa a mastocitos. Y la IL-13 estimula el crecimiento de linfocitos B y suprime las funciones del macrófago (Tizard 2009).

Las células Th1 promueven una respuesta inmune mediada por células estimulando la maduración de células T citotóxicas precursoras mediante la producción de INF- γ e IL-2, es por eso que son muy importantes para controlar la enfermedad (Flint *et al.* 2009; Kreijtz *et al.* 2011). El INF- γ inhibe a los linfocitos Th2, estimula a linfocitos Th1, activa a células NK y activa a macrófagos. Mientras que la IL-2 activa a linfocitos T, linfocitos B, células NK y macrófagos (Tizard 2009). Las células T CD8+ a diferencia de las CD4+ son activadas por péptidos virales sintetizados intracelularmente y son presentados en asociación con el CMH clase I (Van Reeth y Ma 2013).

Las células T CD8+ se diferencian en linfocitos T citotóxico (CTL) los cuales durante la infección son activados en el tejido linfoide y enviados al sitio de la infección (Kreijtz *et al.* 2011). Los CTL están muy bien equipados para matar células infectadas por virus, evitando que se forme nueva progenie y una vez que logran matar una célula pueden despegarse y matar de nuevo (Flint *et al.* 2009; Kreijtz *et al.* 2011).

Los CTL matan a las células infectadas mediante la transferencia de gránulos citoplasmáticos a la célula blanco y también inducen la apoptosis (Flint *et al.* 2009). Los gránulos citoplasmáticos contienen perforinas y granzinas (GrA y GrB), las cuales tienen una función lítica (Kreijtz *et al.* 2011). Las perforinas hacen hoyos en la membrana endosomal, permitiendo la liberación de granzimas que inducen la apoptosis de la célula infectada (Flint *et al.* 2009; Kreijtz *et al.* 2011). La muerte de las células por los CTL es muy rápida ocurriendo pocos minutos después del contacto y reconocimiento (Flint *et al.* 2009).

La GrA está asociada con la inducción de citocinas proinflamatorias y despliega actividades no citotóxicas (Kreijtz *et al.* 2011). Las actividades no citotóxicas de los CTL se enfocan en inhibir la replicación del virus mediante la ruptura de las proteínas virales y de las proteínas celulares que están relacionadas con la síntesis de proteínas (Kreijtz *et al.* 2011), de esta manera se evita la lisis de la célula (Flint *et al.* 2009).

La inducción de la apoptosis mediada por los CTL se realiza mediante la unión Fas/FasL situado en la superficie de la célula blanco (Flint *et al.* 2009; Kreijtz *et al.* 2011).

Además los CTL producen IFN- γ que inducen un estado antiviral en las células vecinas (Flint *et al.* 2009) y mejoran la presentación del antígeno mediante la síntesis de proteínas del CMH clase I y II (Kreijtz *et al.* 2011).

También se ha observado que las células T reguladoras y las células Th17 regulan la respuesta inmune celular durante la infección por el virus de influenza (Kreijtz *et al.* 2011).

Las células T reguladoras controlan a las células T cooperadoras y a las células T CD8+ después de la infección (Kreijtz *et al.* 2011). La función primaria de estas células es terminar con la respuesta inmune y regresar al sistema a su estado fundamental. También son importantes en la supresión inmune, en la autotolerancia y en el control de la respuesta inflamatoria (Flint *et al.* 2009).

Las células Th17 mejoran la respuesta de las células T cooperadoras mediante la producción de IL-6, la cual inhibe la función de las células T reguladoras (Flint *et al.* 2009).

1.11 Diagnóstico

La primera sospecha de la presencia de influenza porcina se da cuando aparece súbitamente una enfermedad respiratoria con alta morbilidad entre los cerdos. Sin embargo, para tener un diagnóstico preciso del agente etiológico se debe realizar el aislamiento del virus en embriones de pollo o en cultivo celular, RT-PCR y PCR punto final (Vincent *et al.* 2008). El aislamiento del virus se realiza de muestras de hisopo nasal de cerdos, encontrando una mayor cantidad durante el periodo febril (Olsen *et al.* 2006), así como de tejido pulmonar recolectado durante la necropsia (CFSPH 2009). Actualmente la técnica de RT-PCR ha remplazado al aislamiento viral gracias a su rapidez (MacLachlan y Dubovi 2011).

La inmunofluorescencia es otra técnica utilizada para detectar el virus en muestras de tejido pulmonar fresco, células nasales epiteliales y lavados

bronqueoalveolares (CFSPH 2009; MacLachlan y Dubovi 2011). La inmunohistoquímica también es utilizada para detectar el antígeno (CFSPH 2009).

Pruebas serológicas como ELISA pueden ser utilizadas para detectar la infección en cerdos no vacunados (MacLachlan y Dubovi 2011).

La inhibición de la hemoaglutinación es un técnica serológica que puede ser utilizada para realizar un diagnóstico retrospectivo, la cual es específica del subtipo, aunque no detecta nuevas cepas virales (CFSPH 2009).

El virus de influenza es parte de un complejo de enfermedad respiratorias porcinas actuando junto con otros patógenos como son *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, PRRS y Circovirus porcino tipo 2, por lo que es recomendable realizar el diagnostico diferencial con estos agentes (Vincent *et al.* 2008).

1.12 Tratamiento

El tratamiento que reciben los animales enfermos solamente es curativo y de descanso. Solamente en caso de infecciones secundarias bacterianas los cerdos son tratados con antibióticos (CFSPH 2009).

1.13 Prevención

La enfermedad se controla con vacunación y adecuadas medidas de bioseguridad en las granjas porcinas para prevenir la entrada del virus por fómites o vectores mecánicos (CFSPH 2009; MacLachlan y Dubovi 2011). Actualmente en muchas granjas se utiliza un sistema de “todo dentro – todo fuera” lo que permite el control del virus (MacLachlan y Dubovi 2011). La despoblación es una medida muy efectiva que puede ser utilizada para eliminar la enfermedad de las piaras (Brown 2000; CFSPH 2009). Cuando no es posible realizar este tipo de manejo es recomendable la vacunación. Las vacunas ahora son formuladas con mínimo dos antígenos virales diferentes y en algunos casos tres. Los trabajadores que estén enfermos de influenza humana no deben entrar en contacto con los cerdos (MacLachlan y Dubovi 2011).

1.13.1 Vacunación

La vacunación contra influenza porcina es una herramienta utilizada en las granjas porcinas para prevenir la enfermedad. Es una manera efectiva de disminuir la infección del virus, las lesiones pulmonares de la neumonía y las pérdidas económicas causadas por el virus de influenza (Chen *et al.* 2012).

Las vacunas no siempre previenen la infección o la excreción de virus, pero la enfermedad es usualmente más leve si se realiza la vacunación (CFSPH 2009). De acuerdo a *Vincent et al.* (2008) existen tres problemas principales en el control y prevención del virus de influenza: uno, el virus de influenza porcina está cambiando más rápido de lo que pueden desarrollarse las vacunas tradicionales, dos, existe una necesidad por vacunas que puedan inducir una mejor protección cruzada entre los diferentes aislados de influenza porcina y tres, se cree que la inmunidad pasiva adquirida a través de la lactancia bloquea la eficiencia de las vacunas en cerdos (*Vincent et al.* 2008).

Para que una vacuna sea considerada efectiva se deben tener en cuenta tres aspectos: que tenga buena inmunogenicidad, que sea segura y que el costo de producción de la vacuna no sea muy elevado (Tetsutani e Ishii 2012). La vacuna ideal debe ser segura, fácil de aplicar, barata y capaz de prevenir la enfermedad y la eliminación del virus (Ma y Richt 2010).

Actualmente en las granjas porcinas se realiza la vacunación contra el virus de influenza porcina utilizando vacunas inactivadas comerciales de inyección intramuscular (Van Reeth y Ma 2013), las cuales se encuentran disponibles desde 1994 (*Vincent et al.* 2008). Estas vacunas inactivadas contienen adyuvantes, son bivalentes o trivalentes, y son preparadas con virus de influenza completo, los cuales son crecidos en embriones de pollo (Thacker y Janke 2008; Ma y Richt 2010). Estas vacunas contienen varias cepas con la finalidad de incrementar las posibilidades de coincidir con el virus circulante en las granjas porcinas (Chen *et al.* 2012).

Las vacunas inactivadas de influenza estimulan altos títulos de IgG en suero y pulmones, provocando que se pueda prevenir la infección por el virus y por lo tanto proteger contra la enfermedad (Thacker y Janke 2008).

Se ha observado que los anticuerpos contra la hemaglutinina son los más protectores contra la infección. Las vacunas inactivadas de influenza protegen de forma más efectiva cuando la hemaglutinina del virus utilizado en la vacuna y el virus que infecta a los cerdos están antigénicamente relacionados, es decir con los virus homólogos. Caso contrario ocurre con los virus heterólogos donde la protección es solo parcial (Ma y Richt 2010). La protección contra la infección no es completa, pero la multiplicación y eliminación del virus es altamente reducida (Thacker y Janke 2008).

Las vacunas inactivadas de influenza están asociadas con una relativamente pobre inmunidad de mucosas y mediada por células, y debido a la poca fiabilidad en la protección cruzada contra nuevas variantes virales es necesario reformularlas con los subtipos y cepas que estén circulando en una región en específico, con la finalidad de mejorar la protección contra el virus (CFSPH 2009; Artenstein 2010). Los virus de influenza porcina tienen un menor grado de deriva antigénica por lo que no es necesario cambiar las cepas con tanta regularidad como ocurre con las vacunas contra influenza humana (CFSPH 2009).

La inmunidad de mucosas inducida por una infección natural de influenza es más efectiva y protectora contra los virus heterovariantes que la inmunidad sistémica inducida por la vacunación (Ma y Richt 2010).

En algunas granjas porcinas se utilizan vacunas autógenas inactivadas contra el virus de influenza, esto se debe a la diversidad viral que está circulando entre la población porcina (Vincent *et al.* 2008). La ventaja que tiene es que es específica para los subtipos que están circulando en una granja y puede ser rápidamente actualizada, aunque esto solo puede ser llevado a cabo por un médico veterinario. Pero la desventaja que tienes es que sólo puede ser utilizada en la granja de donde fue aislado el virus (Chen *et al.* 2012). Esta práctica es más común en Norteamérica que en Europa (Van Reeth y Ma 2013).

Existe una nueva generación de vacunas contra influenza porcina que se han estado desarrollando y probando experimentalmente, pero ninguna de ellas han sido aprobadas para su uso comercial (Van Reeth y Ma 2013).

Las vacunas vivas modificadas para uso en cerdos no han sido aprobadas, aunque existen muchas vacunas experimentales (Chen *et al.* 2012). Con el uso de la técnica de genética reversa es posible modificar el genoma del virus de influenza para generar vacunas vivas modificadas (Chen *et al.* 2012).

Algunos ejemplos de vacunas con virus vivo modificado son: vacuna con virus atenuado con proteína NS1 modificada, vacuna con virus vivo atenuado elastasa dependiente y vacuna con virus vivo atenuado adaptado al frío (Chen *et al.* 2012; Van Reeth y Ma 2013).

La vacuna con virus vivo atenuado con proteína NS1 modificada, como su nombre lo indica contiene un virus modificado H3N2 (A/Swine/Texas/4199-2/98, Tx/98) que expresa una proteína NS1 truncada (Van Reeth y Ma 2013). La función de la proteína NS1 del virus de influenza porcina tiene la función de inhibir la respuesta antiviral mediada por interferón tipo 1 (Ma y Richt 2010). Las mutaciones en el gen que codifica la proteína NS1 provocan que se pierda la potencia de inhibición de IFN α/β (Chen *et al.* 2012). El virus que expresa la proteína NS1 modificada tiende a disminuir la replicación del virus *in vitro* e *in vivo* en comparación con la cepa de campo (Ma y Richt 2010). En experimentos en cerdos se ha observado que la mejor vía de administración es intranasal y que puede administrarse una sola dosis, con lo cual se confiere una protección completa contra virus homólogos y casi completa contra virus heterólogos (Ma y Richt 2010).

La vacuna con virus vivo atenuado elastasa dependiente contiene un virus que sufrió una mutación en el sitio de escisión de la hemaglutinina (Chen *et al.* 2012). La desventaja de esta vacuna es que requiere de dos dosis intratraqueales para producir protección completa contra virus homólogos durante el desafío (Van Reeth y Ma 2013).

La vacuna con virus vivo atenuado adaptado al frío solo ha sido aprobada en humanos y equinos. Es una vacuna que se administra vía intranasal y que se logra induciendo una combinación de mutaciones en los genes que codifican las proteínas PB1 y PB2 del virus de influenza porcina, provocando que la replicación del virus sea sensible a la temperatura (Chen *et al.* 2012).

La ventaja de las vacuna de virus vivo modificado es el mejoramiento de la estimulación de la inmunidad mediada por células, dirigida primariamente contra la nucleoproteína, proporcionando así una inmunidad mas heterosubtípica (Thacker y Janke 2008).

La principal preocupación que existe con las vacunas con virus vivo modificado es la seguridad. Debido a que los segmentos del genoma de influenza son capaces de recombinarse con facilidad, existe la preocupación que exista la recombinación entre los virus vacunales y los virus de campo; y que se pueda producir nuevas variantes virales virulentas (Thacker y Janke 2008; Chen *et al.* 2012).

Otra preocupación es que los virus vivos modificados puedan volverse virulentos después de un tiempo si ocurren mutaciones naturales (Chen *et al.* 2012).

Existen otras vacunas contra influenza porcina que aún continúan bajo experimentación, como son: vacunas subunitarias; producidas utilizando el sistema de expresión baculovirus para producir proteínas recombinantes, vacunas DNA; las cuales solo contienen ácido nucleicos y las vacunas vectorizadas; elaboradas con vectores como adenovirus los cuales transportan genes de influenza a la célula (Chen *et al.* 2012).

1.13.2 Adyuvantes

Los adyuvantes son compuestos que cuando se administran con un antígeno, ayudan a incrementar ampliamente la respuesta inmune, permitiendo inocular menor cantidad de antígeno o reducir el número de dosis, por lo que son capaces de maximizar la eficiencia de las vacunas (Tizard 2009).

Existe una gran variedad de compuestos que han sido utilizados como adyuvantes en las vacunas, algunos ejemplos son las sales minerales, productos microbianos, saponinas, citocinas, polímeros, emulsiones, micropartículas y liposomas (Awate *et al.* 2013).

Algunos de los adyuvantes más habituales son los de liberación prolongada, los particulados y los inmunoestimuladores (Tizard 2009). Los adyuvantes de liberación prolongada retrasan la liberación del antígeno, provocando que la respuesta inmune dure más tiempo (Awate *et al.* 2013). Este tipo de adyuvantes promueven en una mayor proporción la respuesta de anticuerpos y en menor medida la respuesta mediada por células. Algunos ejemplos de adyuvantes de liberación prolongada son el hidróxido de aluminio, sulfato de aluminio y fosfato de calcio (Tizard 2009). Los adyuvantes particulados liberan el antígeno de manera eficaz a las células presentadoras de antígenos, con la finalidad de que sean fácilmente fagocitados. Algunos ejemplos son las emulsiones, micropartículas y liposomas (Tizard 2009). Finalmente los adyuvantes inmunoestimuladores promueven la respuesta de los linfocitos T colaboradores, esto lo realizan mediante la activación de las células dendríticas y de los macrófagos a través de los TLR y la estimulación de las citocinas IL-1 e IL-2. Estas citocinas promueven a los linfocitos T colaboradores y focalizan la respuesta inmune adquirida. Algunos ejemplos son la saponina, lisolecitina y glucanos (Tizard 2009).

Los adyuvantes con licencia más utilizados en la vacunación humana contra el virus de influenza pandémico y estacional son MF59 y AS03, los cuales son adyuvantes de aceite en agua que prolongan la liberación del antígeno y realizan una estimulación inmune no específica (Egli *et al.* 2014). El adyuvante MF59 promueve una respuesta balanceada de Th1 y Th2 y el adyuvante AS03 aumenta la respuesta de anticuerpos y la memoria inmune (Awate *et al.* 2013).

1.13.2.1 Fago GK1

Es un péptido de 18 aminoácidos derivado de *Taenia crassiceps* el cual ha demostrado tener una buena efectividad en activar células dendríticas presentadoras de antígenos, incrementar la expresión del CMH clase II y promover la secreción de citocinas proinflamatorias (Segura-Velazquez *et al.* 2013).

Se ha observado que el péptido GK1 tiene la habilidad de inducir una respuesta de anticuerpos, además de estimular la proliferación de CD8+ y en un menor grado las células CD4+. En células estimuladas con este péptido se ha observado altos niveles de INF γ e IL-2 y bajos niveles de IL-4 (Segura 2004).

1.14 Influenza porcina en humanos

Como se mencionó anteriormente en 1931 y 1933 los virus de influenza H1N1 de cerdos y de humanos fueron aislados y se encontró que estaban estrechamente relacionados entre ellos (Morens y Taubenberger 2014). El virus de influenza H1N1 de humanos de 1918 fue reemplazado en la población humana en 1957 por un H2N2 y fue reintroducido de nuevo en 1977 (Brockwell-Staats *et al.* 2009).

La infección en humanos por influenza porcina ha sido detectada esporádicamente desde la década de 1950 (Van Reeth y Nicoll 2009).

En 1976 se presentó una epidemia de virus de influenza porcina en humanos en reclutas de un campo militar en Fort Dix, Nueva Jersey en los Estados Unidos (Gaydos *et al.* 2006).

Fue causado por un nuevo virus al cual se le llamó A/New Jersey/76 (Hws1N1), provocando una enfermedad respiratoria severa en 13 soldados y la muerte de uno de ellos. Este virus probablemente circuló solamente por un mes y posteriormente desapareció. La epidemia en Fort Dix pudo haber sido una zoonosis anómala causada por la introducción de un virus animal en una población estresada en estrecho contacto, en unas instalaciones llenas y con un clima muy frío (Gaydos *et al.* 2006).

Antes de 2005 en los Estados Unidos se reportaba un caso cada 1-2 años (CFSPH 2009), de diciembre de 2005 a febrero de 2009 fueron diagnosticadas 11 personas con influenza porcina por el CDC. Estas infecciones fueron causadas por virus triple recombinante H1N1 o H1N2 de cerdos (Brockwell-Staats *et al.* 2009). En 2009 se presentó una epidemia de influenza con un virus triple recombinante, el cual contenía genes PB2 y PA originarios de virus de influenza aviar Norteamericanos; el gen PB1 de virus de influenza humana H3N2; genes HA, NP y NS de virus de influenza porcina clásica y genes NA y M de virus de influenza porcina euroasiáticos (Klenk 2012).

La enfermedad en humanos por influenza porcina es usualmente similar clínicamente a la enfermedad causada por infecciones con los virus de influenza humanos (Van Reeth y Nicoll 2009). No existen características clínicas únicas que distinguen influenza porcina en humanos de la influenza típica (Myers *et al.* 2007).

Las infecciones humanas con el virus de influenza porcina, a la fecha, han sido diferentes y mucho más leves que las que se ven con influenza aviar A (H5N1) y más similares a las infecciones con virus de influenza aviar de baja patogenicidad (Van Reeth y Nicoll 2009).

La mayoría de los casos de infecciones zoonóticas por el virus de influenza porcina se ha debido a personas con contacto directo con los cerdos (Olsen *et al.* 2006; Van Reeth y Nicoll 2009), aunque los virus también se pueden propagar a los humanos a través de otro huésped (CFSPH 2009). Existe un mayor riesgo de infección de influenza porcina en trabajadores de granjas porcinas o por cuestiones ocupacionales (médicos veterinarios, investigadores) (Myers *et al.* 2007).

Personas en estrecho contacto con cerdos pueden convertirse en los primeros en ser infectados en un evento de surgimiento de nuevas variantes virales en cerdos, y estas personas pueden servir como un puente para la transmisión del virus a sus comunidades (Myers *et al.* 2007).

Aunque la enfermedad en los humanos parece estar limitada a una sola persona, hay casos donde personas allegadas a la persona enferma adquieren la enfermedad (CFSPH 2009).

La infección por influenza porcina en humanos es caracterizada por fiebre alta y bronquitis, principalmente en tracto respiratorio alto, lo cual puede desencadenar una enfermedad secundaria mediada por bacterias y neumonía (Krauss *et al.* 2003; Schnitzler y Schnitzler 2009). La influenza porcina en humanos es más severa que los resfriados comunes en tracto respiratorio alto (Krauss *et al.* 2003; Van Reeth y Nicoll 2009).

1.15 Producción porcina

La carne de mayor consumo a nivel mundial es la de cerdo, siendo Hong Kong, la Unión Europea, Taiwán y China los principales consumidores de carne de cerdo del mundo. En México el consumo per cápita de carne de cerdo es de 15.7 kg, por lo que se ubica como la segunda carne más consumida en México (PORCIMEX).

En 2012 la población porcina del país fue de 15,857,899 cabezas (SIAP 2013).

La producción de carne en canal ha mantenido un aumento del 2% desde el año 2009 en México, en el año 2013 la producción fue de 1,259,000 toneladas, siendo Sonora, Jalisco, Puebla y Guanajuato los principales estados productores (SIAP 2012; SIAP 2013).

La pérdida económica estimada por cerdo en el Reino Unido como consecuencia de la reducida ganancia de peso en los cerdos causado por el virus de influenza es de £7, equivalente a un total de £60 millones por año (Brown 2013).

2. JUSTIFICACIÓN

La infección de influenza en cerdos con virus de influenza provenientes de aves y humanos aunados a la baja signología que genera en esta especie, coloca al cerdo como un hospedero propicio para generar nuevas variantes virales patogénicas, que pueden afectar no solo a los cerdos sino al propio humano con cepas más virulentas.

La influenza es una enfermedad viral zoonótica que representa una amenaza a la salud de los humanos y los animales y a pesar de la baja mortalidad que existe en los cerdos tiene un impacto considerable a la economía mundial. Los cerdos de finalización enfermos con influenza pueden presentar pérdida de peso o tardanza en llegar al peso de venta y las hembras pueden presentar fallas reproductivas debido a la fiebre alta; lo cual conlleva a generar pérdidas económicas a los productores.

La exportación de carne en nuestro país desde el 2009 ha tenido un aumento anual del 12%, siendo de 84 mil toneladas en el año 2013. La vacunación contra el virus de influenza continúa siendo una estrategia efectiva para prevenir la enfermedad, aunque la alta variación antigénica del virus de influenza y las quasiespecies dificulta la producción de vacunas eficientes.

Estos antecedentes justifican la formulación de una nueva vacuna parenteral contra el virus de influenza porcina constituida con cepas prevalentes en México, incluyendo en su formulación el adyuvante FGK1.

3. HIPÓTESIS

La vacuna inactivada contra el virus de influenza porcina constituida de los virus prevalentes en México y formulada con el adyuvante FGK1 confiere una buena protección de los cerdos contra el virus de influenza porcina.

4. OBJETIVO

- Evaluar la inmunogenicidad e inocuidad de una nueva formulación de vacuna parenteral de influenza porcina basada en las cepas prevalentes en la población mexicana con el adyuvante FGK1.

- Determinar la eficiencia (protección) de la nueva vacuna desarrollada en presencia del adyuvante FGK1.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales

Se trabajó con 33 lechones libres de anticuerpos contra el virus de influenza porcina, los cuales fueron mantenidos en las instalaciones de aislamiento del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (FMVZ UNAM).

Se establecieron siete grupos experimentales; los grupos A, B, C, D, E y F estuvieron conformados por cinco lechones y el grupo G por tres lechones.

Grupo	Vacunación
Grupo A	Una dosis de vacuna con adyuvante FGK1
Grupo B	Dos dosis de vacuna con adyuvante FGK1
Grupo C	Vacuna comercial
Grupo D	Una dosis de vacuna sin adyuvante FGK1
Grupo E	Dos dosis de vacuna sin adyuvante FGK1
Grupo F	No vacuna, si desafío
Grupo G	No vacuna, no desafío

Tabla 1. Grupos experimentales

5.2 Virus de Influenza porcina

Se utilizaron 4 virus de influenza porcina tipo A de los subtipos H1N1 y H3N2 provenientes del banco de virus del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos.

Los virus utilizados fueron:

A/swine/Estado de México 19/DMZC.FMVZ.UNAM/2009 (H1N1)

A/swine/Querétaro 35/DMZC.FMVZ.UNAM/2010 (H1N1)

A/swine/Veracruz 37/DMZC.FMVZ.UNAM/2010 (H1N1)

A/swine/Michoacán 40/DMZC.FMVZ.UNAM/2010 (H3N2)

5.2.1 Replicación del virus

Los virus de influenza tipo A se replicaron en embriones de pollo de 11 días de edad utilizando el método de inoculación del virus en cavidad alantoidea

(Castillo y Gómez 2006). Conforme a este protocolo, primero se debe examinar el huevo con un ovoscopio para verificar la viabilidad del embrión. Posteriormente delimita la cámara de aire con un lápiz y se marca la posición del embrión con una "X". Se señala el punto de inoculación 5 mm arriba de la cámara de aire y del lado contrario al embrión. Luego se desinfectan los embriones con alcohol al 70% y se perfora el cascarón en el punto de inoculación. A continuación se inserta la jeringa cargada con el inóculo verticalmente en el orificio realizado, se introduce la aguja completa y se inoculan 200 µl del virus con una concentración de 64 unidades hemaglutinantes (UH). Finalmente se retira la aguja y se sella el orificio con pegamento blanco.

Los embriones se incubaron a 37°C durante 48 a 72 horas (dependiendo de la virulencia del microorganismo) (Castillo y Gómez 2006). Pasado este tiempo los embriones se pusieron en refrigeración durante 2 horas con la finalidad de sacrificarlos.

5.2.2 Recolección del líquido alantoideo

Después de 72 horas de incubación del embrión y su posterior sacrificio, se recolecta el líquido alantoideo. Esto se realizó retirando el cascarón de la parte superior del huevo en donde está localizada la cámara de aire (Castillo y Gómez 2006). Posteriormente utilizando una pipeta de 1000 µl se recolectó el líquido alantoideo. Este líquido se depositó en tubos de centrifugación, y a continuación se realizó la titulación del virus.

5.2.3 Titulación del virus

La titulación de los virus replicados se realizó en placas de 96 pozos.

Del pozo A1 al A12 se pusieron 50 µl de solución salina fosfatada (PBS) estéril. Posteriormente en el pozo A1 se depositaron 50 µl del virus obtenido del líquido alantoideo, se pipeteó de 3 a 5 veces y posteriormente se tomaron 50 µl que se transfirieron al pozo A2 y de nuevo se pipeteó de 3 a 5 veces, se realizó el

mismo procedimiento con todos los pozos hasta llegar al pozo A12 (Castillo y Gómez 2006).

Luego a todos los pozos se les puso 50 µl de eritrocitos de ave al 0.5%. Y se realizó la lectura de la placa a partir de los 15 minutos.

5.3 Selección del método de inactivación

Se compararon tres métodos de inactivación física del virus de influenza, con la finalidad de determinar el método a utilizar en la formulación de la vacuna, en base a la capacidad hemoaglutinante.

Los métodos de inactivación física comparados fueron: por temperatura, por rayos UV y por rayos gamma.

Se trabajó con el virus A/Swine/Michoacán 40/DMZC.FMVZ.UNAM/2010 (H3N2) que forma parte del banco de virus del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos, FMVZ-UNAM.

5.3.1 Inactivación por temperatura

La inactivación del virus por temperatura se realizó conforme a lo establecido por la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) (OIE 2009).

Se transfirieron 1.5 ml de virus con un título de 128 Unidades Hemoaglutinantes (UH) a un tubo eppendorf, el cual se puso en baño María a 56°C durante 60 minutos. Posteriormente se inoculó con 200 µl de virus inactivado a 4 embriones de pollo de 11 días de edad. Como control positivo de esta prueba de inactivación se inocularon 2 embriones de pollo con 200 µl de virus sin inactivar. Se incubaron los embriones a 37°C durante 72 horas (Castillo y Gómez 2006).

Se determinó la replicación del virus o la ausencia de ésta mediante la titulación del líquido alantoideo.

5.3.2 Inactivación por rayos UV

La inactivación por rayos UV se realizó mediante un foco de rayos UV de 300 nm de longitud de onda. Dentro de una campana de bioseguridad clase II se pusieron 3 ml de virus en una caja de petri, la cual se colocó a 30 cm del foco de luz UV y sobre refrigerante a 4°C (McDevitt *et al.* 2012).

El tiempo de exposición del virus a luz UV fue de 30, 45, 60, 75 y 90 minutos.

El virus de influenza se tituló previamente, utilizando el protocolo antes descrito y se trabajó con títulos de 64 y 128 UH.

Se inocularon 4 embriones de pollo de 11 días con 200 µl de virus inactivado con luz UV por cada tiempo y UH. Como control positivo se inocularon 2 embriones con 200 µl de virus sin inactivar para cada tiempo y UH. Los embriones fueron incubados a 37°C durante 72 horas.

Se determinó la replicación del virus o la ausencia de ésta mediante la titulación del líquido alantoideo.

5.3.3 Inactivación por rayos gamma

La inactivación por rayos gamma se realizó utilizando el irradiador Gammacell 1000 Elite. Este irradiador está localizado en el Instituto de Biomédicas de la UNAM.

Se seleccionó un virus con título de 1024 UH y se transfirió 1 ml a un tubo eppendorf estéril y posteriormente se realizó una dilución seriada hasta 2 UH. En un contenedor del irradiador se pusieron los tubos eppendorf con las diluciones de 2 a 1024 UH y refrigerante.

Los tubos eppendorf con el virus fueron irradiados con una dosis de 650 Gy (Alsharifi y Mullbacher 2010). Para determinar el tiempo de exposición de los virus a la radiación gamma se utilizó la siguiente fórmula:

$$\tau \text{ min} = \frac{\text{Dosis (Gy)}}{4.05 \text{ Gy/min} \text{ [Fd]}}$$

En donde 4.05 es una constante y Fd es el Factor de Decaimiento, el cual indica la condición de la barra de cesio. El Fd se determinó en la Tabla de Factor de Decaimiento radioactivo Cs-137 elaborada por la persona a cargo del equipo. El Fd del Cs-137 de junio de 2012 fue de 0.6636.

La operación para determinar el tiempo de exposición fue de la siguiente manera:

$$\tau \text{ min} = \frac{650 \text{ Gy}}{4.05 \text{ Gy/min} [0.6636]} = 241.85 \text{ min}$$

El tiempo de exposición fue 4 horas, 1 minuto y 22 segundos.

Se seleccionaron los tubos con virus inactivado con radiación gamma con título de 32, 128 y 1024 UH, y se inocularon 3 embriones de pollo por cada título, con 200 µl de virus inactivado. Como control positivo se inocularon 2 embriones de pollo con 200 µl de virus sin inactivar. Los embriones de pollo se incubaron a 37°C por 72 horas.

Se determinó la replicación del virus o la ausencia de ésta mediante la titulación del líquido alantoideo.

5.4 Formulación de la vacuna

Los virus replicados en los embriones de pollo se utilizaron como antígeno vacunal. La concentración de virus utilizado en la vacuna fue de 1×10^7 copias / reacción. Antes de realizar la mezcla de los cuatro virus seleccionados se inactivaron individualmente. Los virus fueron inactivados con luz Ultravioleta (UV) durante 75 min y con formaldehído al 0.02%.

El fago-GK1 (FGK1) se obtuvo de bacterias *E. coli*, el cual después de obtenerlo se inactivó en autoclave y posteriormente se agregó formaldehído al 0.05% (Segura 2004).

Una vez que se preparó la vacuna y el FGK1 se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta el momento de la vacunación.

La concentración del adyuvante inoculado en los cerdos fue de 4×10^{10} FGK1.

5.5 Vacunación

5.5.1 Primera vacunación

La primera vacunación se realizó en la sexta semana de edad de los cerdos.

Los cerdos de los grupos A, B, D y E fueron vacunados con 2 ml de la formulación preparada en el laboratorio vía intramuscular profunda en la tabla del cuello detrás de la oreja.

Los cerdos del grupo C fueron inmunizados con 2 ml de vacuna comercial vía intramuscular profunda en la tabla del cuello detrás de la oreja.

Los cerdos de los grupos A y B recibieron 2 ml de adyuvante FGK1 vía intramuscular profunda en la tabla del cuello detrás de la oreja.

Los grupos F y G no fueron vacunados.

5.5.2 Segunda vacunación

A los 30 días de la primera vacunación los cerdos de los grupos B y E recibieron una segunda dosis de la formulación preparada en el laboratorio. Al igual que la primera vacunación fueron 2 ml de la formulación vía intramuscular profunda en la tabla del cuello detrás de la oreja.

Estos dos grupos también recibieron una segunda dosis de adyuvante FGK1 vía intramuscular profunda en la tabla del cuello.

El grupo C recibió una segunda dosis de vacuna comercial. Fueron 2 ml de vacuna vía intramuscular profunda en la tabla del cuello.

5.6 Desafío de los animales

A los 45 días de la primera vacunación y 15 días después de la segunda vacunación los grupos A, B, C, D, E y F fueron desafiados con el virus de influenza

porcina A/swine/Querétaro 35/DMZC.FMVZ.UNAM/2010 (H1N1). Este virus se replicó previamente en embriones de pollo de 11 días de edad.

Se inoculó 1 ml del virus de influenza con una concentración de 128 UH vía intranasal, con la ayuda de un spray nasal.

Se observaron los cerdos dos veces al día durante 15 minutos con la finalidad de determinar signos clínicos característicos de la enfermedad. También se tomó la temperatura corporal dos veces al día de cada uno de los cerdos.

La severidad de cada uno de los signos clínicos se clasificó en tres grados: (1) leve, (2) moderado y (3) severo (Lee *et al.* 2007).

5.7 Toma de muestras

Antes de realizar el desafío se tomaron muestras nasales de todos los cerdos utilizando hisopos estériles, los cuales fueron sumergidos en PBS estéril una vez tomada la muestra.

Un día después del desafío hasta el sacrificio de los cerdos, se tomaron muestras nasales diarias de todos los cerdos utilizando hisopos estériles. Inmediatamente después de tomar las muestras se congelaron a -20°C hasta la realización de la extracción de RNA viral.

La finalidad de tomar las muestras nasales fue determinar la carga viral de la excreción nasal mediante la técnica de RT-PCR.

5.8 RT-PCR Tiempo real de muestras nasales

5.8.1 Extracción de RNA viral

Con la ayuda de pinzas estériles se exprimió el hisopo contra la pared del tubo contenedor. Posteriormente se transfirieron 500 µl de muestra a un tubo eppendorf estéril nuevo, en donde se realizó la extracción de RNA viral utilizando la técnica con trizol. Se adicionaron 500 µl de trizol y se homogenizó perfectamente, después se incubó durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se agregan 200 µl de cloroformo a 4°C y se agitó en el vortex durante 15 segundos y a continuación se incubó a 4°C durante 10 minutos. Una vez concluido este tiempo

se centrifugó a 11,500 xg durante 15 minutos a 4°C y se separó la fase de RNA en un nuevo tubo eppendorf. Se adicionó un volumen de isopropanol (1:1) a 4°C y se incubó por 2 horas a 4°C. Después se centrifugó a 11,500 xg durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se decantó el isopropanol y se lavó la pastilla de RNA con 200 µl de etanol al 70%. Se centrifugó a 11,500 xg por 10 minutos a 4°C y se decantó el etanol, a continuación se dejó secar completamente durante 2 horas en la incubadora. Finalmente se resuspendió la pastilla de RNA en 35 µl de H₂O DEPC al 0.1% durante 1 hora en refrigeración a 4°C (Chomczynski y Sacchi 1987).

5.8.2 RT-PCR tiempo real

Una vez realizada la extracción de RNA de las muestras se realizó la técnica de RT-PCR tiempo real con la intención de determinar la presencia del virus en las excreciones nasales de los cerdos.

Para realizar la técnica de RT-PCR tiempo real se utilizó el kit FIND-IT INFLUENZA de Biotecnologías Moleculares, S.A de C.V., la cual se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El kit utilizado amplifica el gen M del virus de influenza.

En un tubo de 0.2 ml se puso 10 µl de RNA de la muestra nasal y 10 µl del contenido del kit Super Mix Influenza. Se observó que no existieran burbujas y se metió en el termociclador de tiempo real Corbett Research.

Las condiciones de amplificación fueron (Avalos 2012):

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	42°C	30 min.
1 ciclo	95°C	10 min.
40 ciclos	95°C 60°C	15 seg. 45 seg.

Tabla 2. Condiciones de amplificación de RT-PCR para diagnóstico de influenza.

El software utilizado para realizar esta amplificación fue Rotor-Gene 6000 Series Software de Corbett Research.

5.9 Necropsia y toma de muestras pulmonares

Cuatro días después de la infección con el virus de influenza, los cerdos fueron sacrificados con la finalidad de observar las lesiones pulmonares. Se tomaron 2 muestras de 3 cm³ de pulmón de cada uno de los cerdos. Una muestra se puso en un frasco estéril y posteriormente se congeló a -20°C hasta su uso.

La otra muestra pulmonar se puso en formol al 10% y se mandó al Departamento de Patología en donde realizó la técnica de histopatología.

5.10 RT-PCR Tiempo real de muestras pulmonares

5.10.1 Extracción de RNA viral

La muestra de pulmón se descongeló y se cortó con tijeras estériles un trozo de 1 cm de pulmón. Posteriormente se puso la muestra en un mortero y con la ayuda de unas tijeras se cortó en trozos muy pequeños. A continuación se agregó nitrógeno líquido al pulmón cortado en trozos pequeños y con la ayuda de un pistilo se pulverizó la muestra. Una vez que quedó perfectamente pulverizado se transfirió a un tubo de centrifuga estéril. Se agregaron 500 µl de PBS estéril y se centrifugó a 11,500 xg durante 15 min. Se tomó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo de centrifuga y se refrigeró la muestra hasta su uso (Chomczynski y Sacchi 1987).

Se realizó la extracción de RNA de la muestra pulmonar utilizando la técnica de extracción antes mencionada.

5.10.2 RT-PCR Tiempo real de muestras pulmonares

Una vez obtenido el RNA viral de las muestras pulmonares se realizó RT-PCR tiempo real utilizando la misma técnica y programa utilizado en las muestras nasales.

6. RESULTADOS

Inactivación del virus por temperatura

No se presentó replicación del virus en los 4 embriones inoculados con el virus inactivado por temperatura. En los controles positivos si hubo replicación teniendo títulos de 256 y 512 UH.

Inactivación del virus por rayos UV

El virus de influenza porcina no se replicó en los embriones de pollo que fueron inoculados con el virus inactivado a partir de los 60 minutos y con una concentración de 64 UH.

El virus con título de 128 UH continuó replicándose en los embriones de pollo hasta los 90 minutos posteriores a la exposición a rayos UV.

Los siguientes cuadros muestran el número de embriones de pollo en donde existió o no la replicación del virus de influenza porcina.

	64 UH	
	Replicación del virus	No replicación del virus
30 min	4	0
45 min	3	1
60 min	0	4
75 min	0	4

Tabla 3. Número de embriones de pollo inoculados con influenza con título de 64 UH expuestos a rayos UV con diferentes tiempos en donde se presentó o no replicación viral.

	128 UH	
	Replicación del virus	No replicación del virus
30 min	3	1
45 min	1	3
60 min	1	3
75 min	2	2
90 min	1	3

Tabla 4. Número de embriones de pollo inoculados con influenza con título de 64 UH expuestos a rayos UV con diferentes tiempos en donde se presentó o no replicación viral.

En todos los embriones seleccionados como control positivo para cada uno de los tiempos y UH hubo replicación del virus. Los títulos obtenidos de estos virus fueron elevados.

En los Anexos 1 y 2 se muestran los resultados de la titulación de los virus replicados en los embriones de pollo y de los controles positivos.

Inactivación del virus por rayos gamma

No se logró la inactivación del virus de influenza porcina utilizando los rayos gamma con una dosis de 650 Gy. Como se muestra en el siguiente cuadro hubo replicación del virus en los embriones de pollo de las tres concentración virales, excepto en un embrión.

	Inactivación por rayos gamma	
	Replicación del virus	No replicación del virus
32 UH	3	0
128 UH	3	0
1024 UH	2	1

Tabla 5. Número de embriones de pollo en donde se presentó o no replicación del virus de influenza expuesto a rayos gamma.

Hubo replicación del virus en los embriones de pollo utilizados como control positivo.

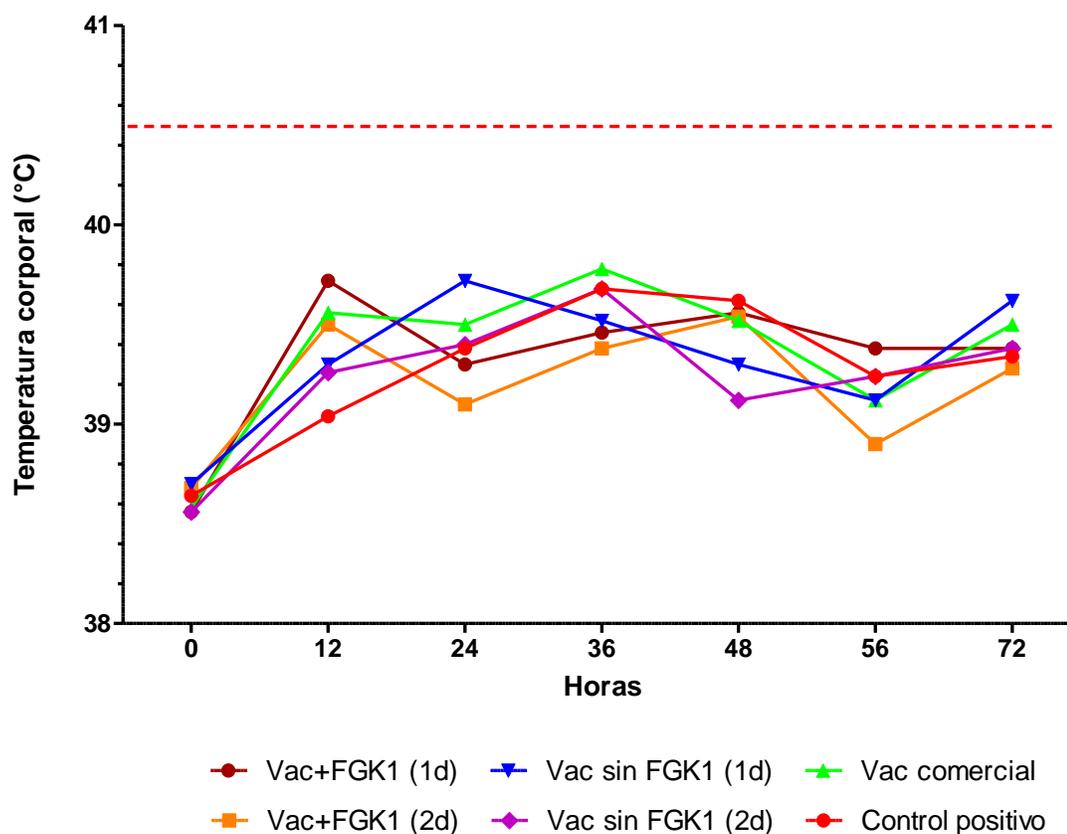
En Anexo 3 se muestran los títulos de la replicación viral en los embriones de pollo y del control positivo.

Temperatura corporal tomada después de la infección

En todos los grupos hubo aumento de la temperatura corporal, la cual fue de 1°C en promedio durante las primeras 12 a 36 horas. Muy pocos cerdos tuvieron una temperatura mayor a 40°C. Los grupos vacunados con una y dos dosis de virus mas adyuvante (Grupos A y B) alcanzaron el máximo de temperatura corporal a las 12 horas post infección, el grupo vacunado con una dosis de virus sin adyuvante (grupo D) fue a las 24 horas post infección y los grupos de vacuna comercial (Grupo C), vacuna con dos dosis de virus sin adyuvante (Grupo E) y los no vacunados pero sí desafiados (Grupo F) fue a las 36 horas post infección.

El grupo B fue el que registró un menor aumento de temperatura corporal comparado con todos los demás grupos.

En la siguiente gráfica se puede observar el comportamiento de la temperatura corporal de los diferentes grupos.



Gráfica 1. Temperatura corporal promedio de los diferentes grupos experimentales.

Signos clínicos

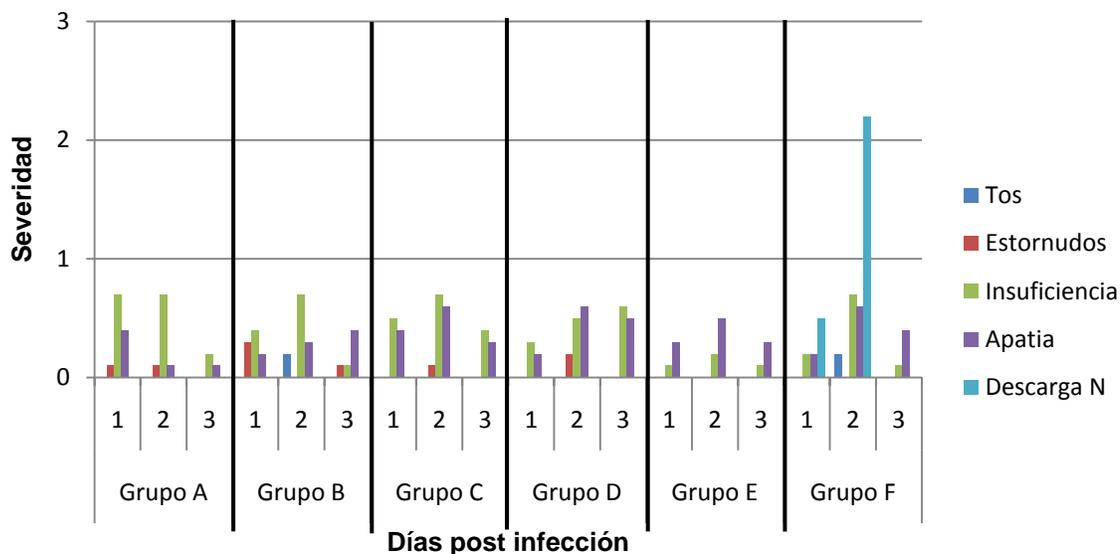
Los signos clínicos que se observaron en los cerdos fueron insuficiencia respiratoria, tos, apatía, estornudos y descarga nasal.

Ninguno de los cerdos en el estudio murió a causa de la infección causada por el virus de influenza.

Estos signos clínicos se empezaron a presentar a partir del primer día post infección y fueron de una severidad leve, excepto la descarga nasal la cual sólo se presentó en el grupo no vacunado pero sí desafiado con el virus (Grupo F) y fue de severidad moderada.

Como se ejemplifica en la siguiente gráfica la insuficiencia respiratoria y la apatía fueron los signos clínicos que más se presentaron después de la infección con el virus de influenza porcina. El segundo día post infección fue cuando un

mayor número de cerdos presentaron los signos clínicos, permaneciendo con una severidad leve. En el tercer día menos animales presentaron signos clínicos, excepto el grupo vacunado con una dosis de virus sin adyuvante (Grupo D), ya que la insuficiencia respiratoria y la apatía permanecieron estables.



Gráfica 2. Severidad de los signos clínicos por día después del desafío con el virus de Influenza Porcina.

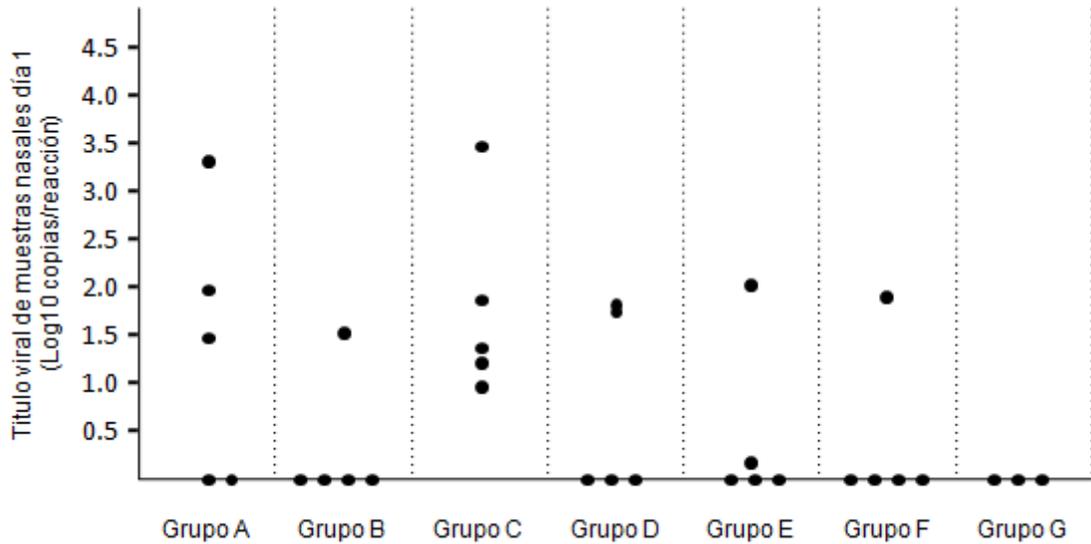
Carga viral de las muestras nasales

La vacuna con adyuvante FGK1 no previno la eliminación de virus vía nasal en los cerdos vacunados con una y dos dosis de vacuna. En todos los grupos hubo al menos un cerdo en el que se detectó la presencia del virus de influenza en muestras nasales mediante RT-PCR, excepto en el grupo control negativo (Grupo G) donde el virus de influenza no fue detectado, este permaneció negativo durante todo el experimento.

La identificación de este agente viral fue hasta las 48 horas post infección y no se detectó virus en las secreciones nasales en el tercer día post infección.

La carga viral en las muestras nasales fue desde 10^1 a $10^{3.5}$ copias por reacción. Como se puede observar en la siguiente gráfica, todos los cerdos del

grupo de vacuna comercial eliminaron el virus vía nasal en las 48 horas post infección.

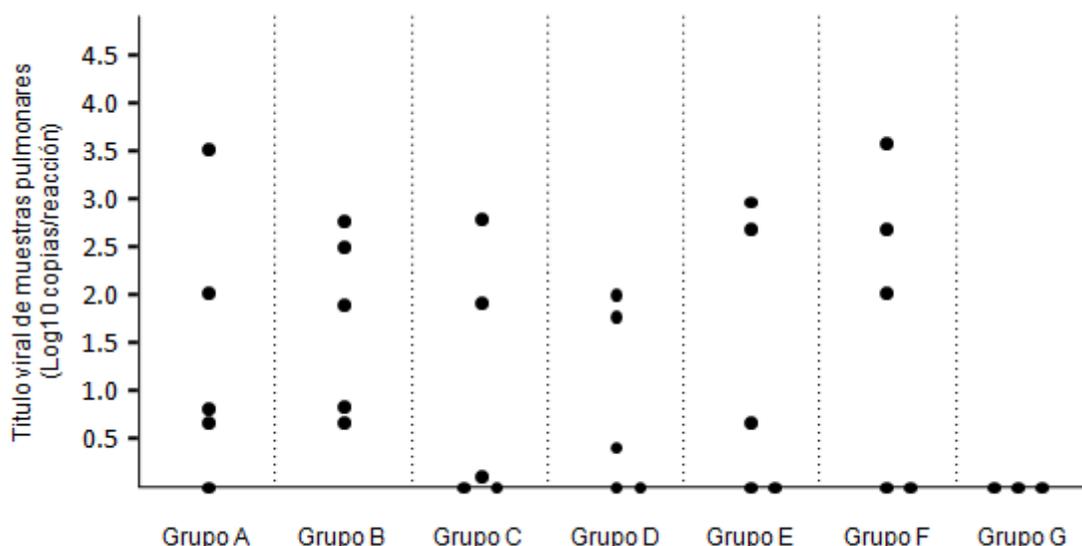


Gráfica 3. Carga viral de las muestras nasales en las 48 horas post infección.

Carga viral de las muestras pulmonares

En todos los grupos se detectó el virus de influenza de las muestras pulmonares obtenidas durante la necropsia, excepto en el grupo control negativo. Como se puede observar en la siguiente gráfica, el virus fue detectado mediante RT-PCR en un gran número de cerdos, siendo los grupos de cerdos vacunados con una y dos dosis de virus mas adyuvante en donde mayor fue la detección.

Comparando los datos mostrados en las gráficas 2 y 3, se puede observar que la carga viral fue mayor en las muestras pulmonares.



Gráfica 4. Carga viral de las muestras pulmonares de los diferentes grupos experimentales.

Histopatología

Las lesiones pulmonares descritas en el estudio histopatológico son compatibles con un cuadro de influenza porcina. Microscópicamente se observó neumonía intersticial en todos los grupos con grados variables y los septos alveolares se encontraron engrosados por linfocitos y células plasmáticas. La mayoría de las paredes alveolares se encontraron rotas exhibiendo clavos de retracción (enfisema).

El grupo A presentó una neumonía intersticial leve difusa con hiperplasia del tejido linfoide y enfisema leve multifocal.

El grupo B presentó neumonía intersticial leve a moderada difusa con hiperplasia del tejido linfoide y enfisema leve multifocal.

El grupo C presentó neumonía intersticial leve difusa con hiperplasia del tejido linfoide y enfisema leve multifocal.

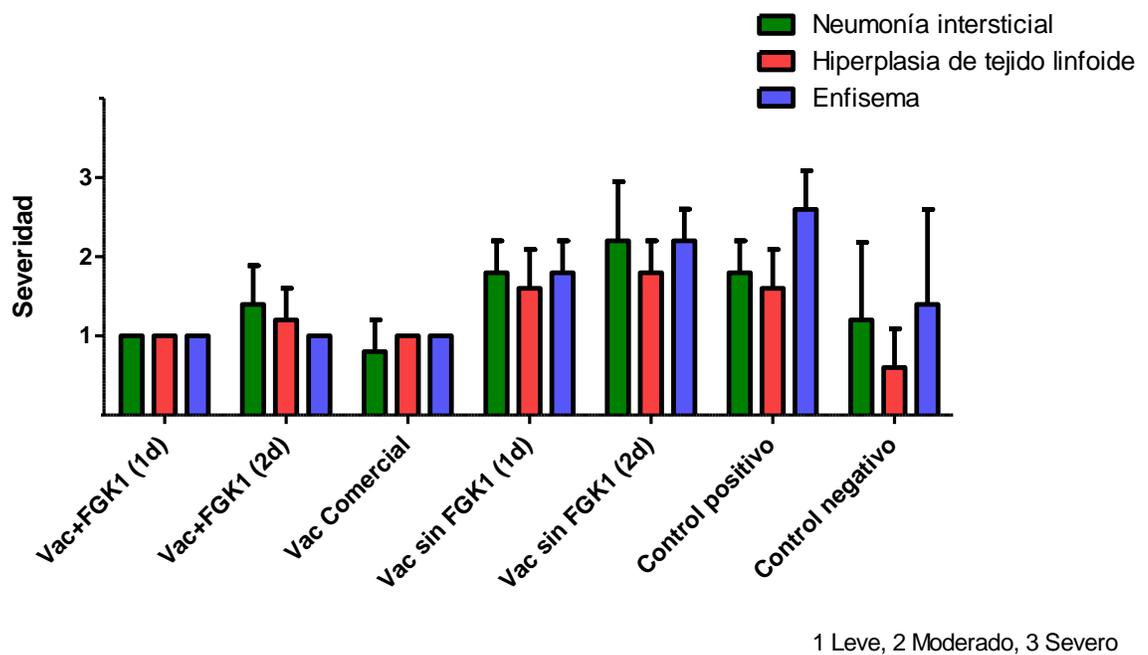
El grupo D presentó neumonía intersticial moderada difusa con hiperplasia del tejido linfoide leve a moderada y enfisema moderada multifocal.

El grupo E presentó neumonía intersticial moderada a grave con hiperplasia del tejido linfoide y enfisema moderado multifocal.

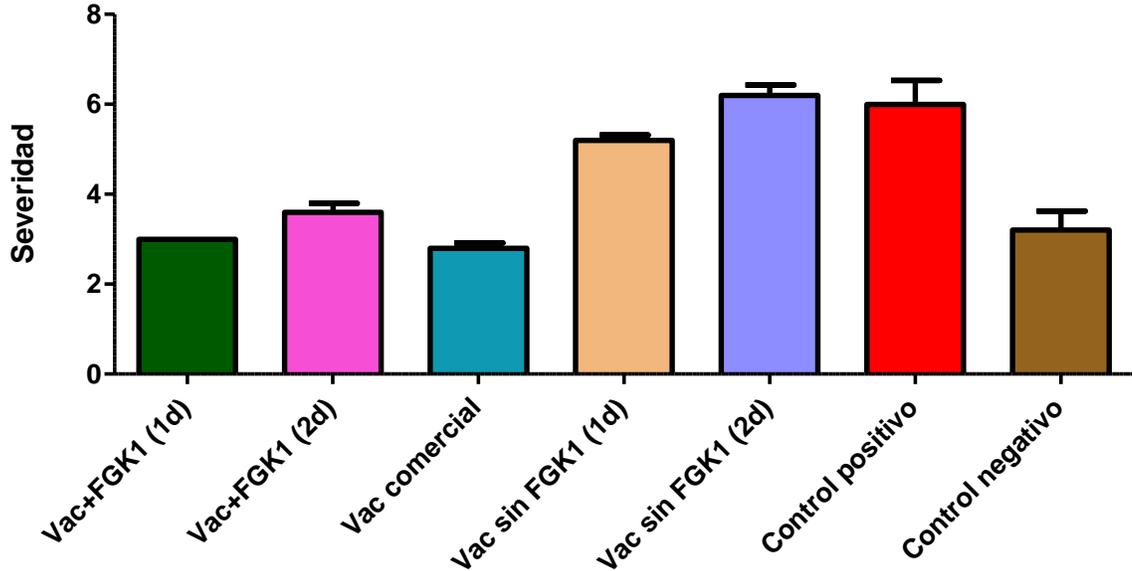
El grupo F presentó neumonía intersticial moderada con hiperplasia del tejido linfoide leve a moderada y enfisema moderado a grave multifocal.

El grupo G presentó neumonía intersticial moderada con hiperplasia del tejido linfoide leve y enfisema moderado multifocal.

En la siguiente tabla se puede observar de forma más concisa el resultado de diagnóstico histopatológico de los pulmones.



Gráfica 5. Severidad de lesiones pulmonares por grupo.



Gráfica 6. Severidad acumulada de lesiones pulmonares por grupo.

Como se puede observar en las Gráficas 5 y 6, la severidad de las lesiones pulmonares de los cerdos que recibieron una y dos dosis vacuna con adyuvante FGK1 y vacuna comercial fue menor a la presentada en los cerdos que fueron vacunados sin el adyuvante. En el grupo G se observaron lesiones pulmonares, aunque este grupo resulto negativo a RT-PCR Tiempo real, por lo que los animales pudieron estar pasando por otro cuadro clínico.

7. DISCUSIÓN

Los virus de influenza porcina A/swine/Estado de México/19/2009 (H1N1), A/swine/Querétaro/35/2010 (H1N1), A/swine/Veracruz/37/2010 (H1N1) y A/swine/Michoacán/40/2010 (H3N2) son parte del banco de virus del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos FMVZ, UNAM, los cuales fueron aislados de muestras pulmonares de cerdos de diferentes estados de México.

Estas cepas virales de influenza fueron seleccionadas para formar parte de la vacuna inactivada realizada en este estudio, por dos razones. La primera fue que de acuerdo a Avalos (2012), estas cepas son prevalentes en la población porcina de México, además se observó que los subtipos H1N1 y H3N2 son los que están circulando en México. La segunda razón fue que las cepas seleccionadas son antigénicamente diferentes.

Lo que se buscó en esta vacuna inactivada fue tener cepas representativas de diferentes regiones del México y tener una amplia cobertura antigénica.

Aunque es muy importante seleccionar las cepas virales de influenza que serán utilizadas en la formulación de la vacuna, es de igual forma esencial determinar el método de inactivación del virus que será utilizado. La inactivación de los virus para su uso en la producción de una vacuna de virus completo requiere de métodos que eliminen la infectividad del virus y a la vez preserve la integridad de los epítomos inmunogénicos de la envoltura viral (Raviv *et al.* 2008; Fedorova *et al.* 2012), lo cual es importante para la eficacia de la vacuna (Furuya *et al.* 2010).

En el caso de la inactivación del virus de influenza para uso en la vacunación se ha reportado el uso de métodos físicos, como radiación UV, radiación ionizante y por temperatura alta; y métodos químicos, como β -propiolactona y formaldehído (Raviv *et al.* 2008; Fedorova *et al.* 2012).

Con la finalidad de establecer el método de inactivación del virus de influenza que se utilizaría en la formulación de la vacuna, se compararon las técnicas de inactivación por rayos gamma, rayos UV y por temperatura alta.

Se observó que la inactivación del virus de influenza con una temperatura de 56°C durante una hora fue muy efectiva, debido a que no se presentó replicación viral en ninguno de los embriones de pollo inoculados. En la ficha técnica que publica la OIE sobre el virus de influenza se especifica que el microorganismo se puede inactivar a 56°C durante una hora o con temperaturas mayores y en un menor tiempo (OIE 2009). Aunque este tipo de inactivación del virus de influenza es muy efectiva, aún con títulos virales altos, tiene la desventaja de que existe desnaturalización de la hemaglutinina y de la neuraminidasa (De Flora y Badolati 1973). Esta desnaturalización de las proteínas virales de envoltura es un efecto no deseado para su uso en vacunas, debido a que la respuesta inmune se da principalmente contra la hemaglutinina (Kreijtz *et al.* 2011).

La inactivación del virus de influenza mediante rayos UV se logró a partir de una hora de exposición en virus con título de 64 UH. Como se puede observar en el Cuadro 2, no hubo replicación del virus en los embriones de pollo inoculados con virus inactivado con título de 64 UH. En contraparte el virus de influenza con título de 128 UH no se logró inactivar aún utilizando tiempos de exposición mayores a una hora. Se observó replicación del virus en embriones de pollo inoculados con virus expuesto a rayos UV durante 90 min.

Los rayos UV inactivan al virus de influenza mediante la interacción con los ácidos nucleicos virales para formar fotodímeros de pirimidina, provocando lesiones en el RNA (Hijnen *et al.* 2006; McDevitt *et al.* 2012). Esta acción va a inhibir la replicación y la transcripción y por lo tanto va a evitar que el virus se pueda multiplicar (Hijnen *et al.* 2006).

La inactivación del virus por rayos UV está relacionada con la intensidad de la radiación y el tiempo de exposición (Weiss *et al.* 2007). Con un mayor tiempo de exposición a rayos UV el virus de influenza con título de 128 UH podría ser

inactivado. De ser así, se podría establecer que entre mayor sea el título viral mayor tendrá que ser el tiempo de exposición del virus de influenza a rayos UV.

La inactivación del virus de influenza por rayos gamma tiene un gran potencial para ser utilizado en la formulación de vacunas debido a que produce cambios moleculares mínimos de las proteínas de envoltura y de la estructura viral (Alsharifi y Mullbacher 2010). Se necesitan dosis muy altas de rayos gamma para alterar la morfología de la hemaglutinina (De Flora y Badolati 1973). Los rayos gamma inactivan al virus de influenza mediante el rompimiento de las cadenas de los ácidos nucleicos del RNA viral (Furuya *et al.* 2010), sufriendo esta estructura un mayor daño que las proteínas de envoltura (Lowy *et al.* 2001). La Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA) establece que la exposición del virus de influenza a una dosis de 0.65 kGy de rayos gamma resulta en la total pérdida de la infectividad del virus (Alsharifi y Mullbacher 2010). En este estudio se utilizó esta dosis de radiación ionizante para inactivar el virus de influenza, pero como podemos observar en la Tabla 3 hubo replicación del virus en los embriones de pollo, aún en los inoculados con títulos virales bajos. La IAEA menciona que la destrucción de la actividad de la hemaglutinina requiere una exposición mayor de 200 kGy (Alsharifi y Mullbacher 2010), lo cual convierte a este método impráctico ya que se necesitaría muchos días para lograr la inactivación del virus de influenza.

De acuerdo a los resultados obtenidos con estos métodos de inactivación se decidió utilizar en la formulación de la vacuna el método de inactivación por rayos UV. Debido a que la vacuna estuvo formulada con virus de influenza con título de 128 UH, se utilizó formaldehído para asegurar la inactivación. Los formaldehídos inducen una amplia interacción y entrecruzamiento de las proteínas virales (Furuya *et al.* 2010).

La decisión de formular la vacuna con un título viral de 1×10^7 copias por reacción, fue tomada en base a un estudio anterior realizado en ratones. En ese estudio se utilizaron 1×10^8 copias por reacción para formular la vacuna, pero

debido a que en este estudio no todos los virus alcanzaron este título viral se decidió ajustar a 1×10^7 copias por reacción.

Aunque en muchos trabajos donde se estudia la eficacia de vacunas contra influenza porcina el desafío se realiza vía intratraqueal (Van Reeth *et al.* 2001; Vincent *et al.* 2010), en el presente estudio se seleccionó la vía intranasal para realizar el desafío de los cerdos. Se escogió esta vía de inoculación debido a que se buscó obtener la infección por la ruta natural de infección del virus de influenza.

Después del desafío de los cerdos con el virus de influenza se observaron los signos clínicos de la enfermedad y se tomó la temperatura dos veces al día durante todo el experimento. Se observó que hubo aumento de la temperatura corporal de los cerdos de todos los grupos, siendo de hasta 1°C durante las primeras 12 a 36 horas. En una infección natural de influenza los cerdos desarrollan fiebre durante los primeros dos días de la enfermedad, con temperaturas mayores a 40.5°C y posteriormente disminuye a partir del tercer día post infección (Janke 2013).

En este estudio la temperatura corporal de los cerdos no fue elevada, muy pocos tuvieron una temperatura mayor de 40°C y sólo dos alcanzaron los 40.5°C. En las infecciones inducidas de influenza la fiebre es bastante variable, como es la aparición de los signos clínicos (Janke 2013).

No hubo una diferencia significativa de la media de temperatura corporal entre los grupos experimentales.

A partir del primer día post infección se observaron signos clínicos característicos de la enfermedad, como insuficiencia respiratoria, estornudos, tos, apatía y descarga nasal. La enfermedad clínica de los cerdos fue de una severidad leve. De acuerdo a Janke (2013) la enfermedad clínica inducida experimentalmente raramente alcanza la severidad que es observada en campo. En trabajos realizados por Lee *et al.* (2007) también observaron signos clínicos de mínimos a moderados en cerdos desafiados con el virus de influenza después de haber sido vacunados.

Solamente insuficiencia respiratoria y apatía fueron una constante en todos los grupos y de los cinco signos clínicos observados, estos dos fueron los que se presentaron en un mayor número de cerdos. Como se puede observar en la Gráfica 2, estos dos signos clínicos tuvieron una mayor severidad en el segundo día post inoculación.

La descarga nasal solo se presentó en el grupo de cerdos no vacunados pero si desafiados. Esta descarga nasal se observó a partir del primer día post inoculación y fue el único signo clínico que tuvo una severidad moderada.

La tos fue el signo clínico de menor presencia en los cerdos, solamente un cerdo del grupo de los vacunados con dos dosis de virus mas adyuvante y un cerdo del grupo de los no vacunados pero si desafiados lo presentaron el segundo día post infección con una severidad moderada. En los cerdos infectados experimentalmente con influenza la tos es usualmente mínima, la cual es una tos suave ocasional y que se desarrolla uno o dos días después de la aparición de los otros signos clínicos (Janke 2013).

La vacuna tetravalente formulada con el adyuvante FGK1 no previno la eliminación del virus vía nasal en los cerdos y el virus también fue detectado en los pulmones. A menudo la vacunación limita la enfermedad pero no evita la eliminación del virus en las secreciones nasales, provocando que se pueda dar la transmisión a otros animales (Loving *et al.* 2013).

La eliminación del virus vía secreciones nasales ocurrió a partir del segundo día post infección, siendo este resultado similar a lo reportado por Romagosa *et al.* (2011), en donde detectaron el virus en secreciones nasales a las 48 horas post infección.

Se observó que ocurrió lo mismo con los cerdos vacunados con la vacuna comercial y con los que fueron vacunados sin el adyuvante. El comportamiento viral en las secreciones nasales en todos los grupos fue similar en el segundo día post infección, no se observó una variación significativa.

Aunque el virus fue detectado en las muestras nasales y en los pulmones, los títulos que se registraron fueron bajos. El título más alto detectado en las

secreciones nasales fue de $10^{3.47}$ copias por reacción en un cerdo del grupo de los vacunados con vacuna comercial.

En otros estudios se ha observado que la eliminación viral en secreciones nasales tiende a ser bastante constante los días 2-4 post infección con un pico de títulos descrito en un rango de $10^{3.5} - 10^{7.5}$ TCID₅₀ (Janke 2013). Romagosa *et al.* (2011) detectaron al virus de influenza en secreciones nasales por un periodo de 5 días post infección.

Y el título más alto detectado en las muestras pulmonares fue de $10^{3.50}$ copias por reacción en un cerdo del grupo de los vacunados con una dosis viral más adyuvante FGK1. De acuerdo a Janke (2013) en el tercer día post infección es cuando el pulmón alcanza el pico de carga viral, con títulos variando de $10^{4.5} - 10^{8.3}$ TCID₅₀, EID₅₀ o PFU/ml.

En un estudio realizado por Vincent *et al.* (2010), en donde comparaban vacunas trivalente y pentavalente comerciales, bivalente autógena y monovalente experimental en cerdos, observaron que solamente la vacuna monovalente que fue desafiada con un virus homólogo proveyó de una protección óptima ya que previno la eliminación del virus en secreciones nasales y también no se detectó virus en los pulmones.

En condiciones experimentales los cerdos pueden ser protegidos parcialmente contra virus genéticamente diversos del mismo subtipo HA (protección heterovariante) y en algunos casos contra otro subtipo HA (protección heterosubtípica) (Van Reeth y Ma 2013).

La vacuna tetravalente formulada con el fago GK1 realizada en este experimento logró disminuir la severidad de las lesiones pulmonares en los cerdos que recibieron una y dos dosis, si se compara con los cerdos que fueron vacunados sin el adyuvante y los que no fueron vacunados. Los cerdos de estos últimos grupos tuvieron lesiones pulmonares de mayor severidad.

En cerdos no vacunados y en condiciones experimentales la enfermedad típica y la patología en pulmones solo se da cuando los cerdos son inoculados con altas dosis de virus directamente en la tráquea.

La vacuna comercial también fue benéfica en reducir las lesiones pulmonares de los cerdos, aunque no fue efectiva en prevenir la eliminación del virus en las secreciones nasales, además de que fue observado el agente en los pulmones. Esto concuerda con lo dicho por Romagosa *et al.* (2011) y Vincent *et al.* (2010), en donde observaron que las vacunas comerciales no son efectivas en proveer una protección contra el virus de influenza completa.

8. CONCLUSIONES

La inactivación del virus de influenza mediante altas temperaturas es muy eficiente para inactivar al agente, aún en altas concentraciones virales. Aunque tiene la desventaja de desnaturalizar la glicoproteínas virales de superficie.

Se necesita una dosis mayor de 650 Gy para inactivar al virus de influenza mediante rayos gamma. Esta característica la hace impráctica por el tiempo de exposición que necesitaría el virus para ser inactivado.

En la inactivación del virus de influenza mediante rayos UV existe una relación proporcional directa entre la concentración viral y el tiempo de exposición a los rayos UV. Entre mayor sea el título viral mayor debe ser el tiempo de exposición del virus a rayos UV para ser inactivado.

La vacuna tetravalente formulada con el adyuvante FGK1 fue efectiva en disminuir la severidad de las lesiones pulmonares. Aunque no previno la eliminación del virus de influenza en las secreciones nasales, ni su presencia en los pulmones.

La vacuna heteróloga comercial utilizada en este trabajo no logró proporcionar una protección completa contra el virus de influenza a los cerdos.

9. APENDICES

9.1 Apéndice I

Tabla con los títulos de los virus replicados en los embriones de pollo después de la inactivación por rayos UV con una concentración de 64 UH.

64 UH			
	Embrión	Título	Control positivo
30 min	1	256 UH	512 UH
	2	128 UH	
	3	128 UH	256 UH
	4	128 UH	
45 min	1	-	512 UH
	2	256 UH	
	3	256 UH	256 UH
	4	64 UH	
60 min	1	-	1024 UH
	2	-	
	3	-	512 UH
	4	-	
75 min	1	-	1024 UH
	2	-	
	3	-	512 UH
	4	-	

9.2 Apéndice II

Tabla con los títulos de los virus replicados en los embriones de pollo después de la inactivación por rayos UV con una concentración de 128 UH.

128 UH			
	Embrión	Título	Control positivo
30 min	1	-	512 UH
	2	64 UH	
	3	128 UH	256 UH
	4	128 UH	
45 min	1	-	128 UH
	2	16 UH	512 UH
	3	-	
	4	-	
60 min	1	-	128 UH
	2	-	512 UH
	3	-	
	4	128 UH	
75 min	1	-	1024 UH
	2	1024 UH	512 UH
	3	128 UH	
	4	-	
90 min	1	-	1024 UH
	2	1024 UH	512 UH
	3	-	
	4	-	

9.3 Apéndice III

Tabla con los títulos de los virus replicados en los embriones de pollo después de la inactivación por rayos gamma utilizando una dosis de 650 Gy.

Rayos gamma			
	Embrión	Título	Control positivo
32 UH	1	-	128 UH
	2	512 UH	
	3	1024 UH	
128 UH	1	512 UH	512 UH
	2	256 UH	
	3	256 UH	
1024 UH	1	256 UH	
	2	256 UH	
	3	1024 UH	

10. REFERENCIAS

- Alsharifi, M. and A. Mullbacher (2010). "The gamma-irradiated influenza vaccine and the prospect of producing safe vaccines in general." Immunol Cell Biol **88**(2): 103-104.
- Ardans, A. A. (1999). Orthomyxoviridae. Veterinary Microbiology. C. D. Hirsch and Z. Y. Chong. USA, Blackwell Publishing: 396-402.
- Artenstein, A. W. (2010). Influenza. Vaccines, A biography. A. W. Artenstein. USA, Springer.
- Avalos, P. G. (2012). Identificación de variantes del virus de la influenza porcina en México con la técnica de RT-PCR RFLP's. Maestría en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Awate, S., L. A. Babiuk and G. Mutwiri (2013). "Mechanisms of action of adjuvants." Front Immunol **4**: 114.
- Bouvier, N. M. and P. Palese (2008). "The biology of influenza viruses." Vaccine **26 Suppl 4**: D49-53.
- Brockwell-Staats, C., R. G. Webster and R. J. Webby (2009). "Diversity of influenza viruses in swine and the emergence of a novel human pandemic influenza A (H1N1)." Influenza Other Respir Viruses **3**(5): 207-213.
- Brown, I. H. (2000). "The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs." Vet Microbiol **74**(1-2): 29-46.
- Brown, I. H. (2013). "History and epidemiology of Swine influenza in Europe." Curr Top Microbiol Immunol **370**: 133-146.
- Carter, R. W. and J. C. Sanford (2012). "A new look at an old virus: patterns of mutation accumulation in the human H1N1 influenza virus since 1918." Theor Biol Med Model **9**: 42.
- Castillo, E. C. and F. A. Gómez (2006). El embrión de pollo. Texto y cuaderno de trabajo Laboratorio de Virología. E. C. Castillo and F. A. Gómez. México, FMVZ UNAM.
- Castillo, E. C. and F. A. Gómez (2006). Pruebas de hemoaglutinación viral en tubo y placa. Texto y cuaderno de trabajo Laboratorio de Virología. E. C. Castillo and F. A. Gómez. México, FMVZ UNAM.

CFSPH. (2009). "Swine influenza." Retrieved 28 Febrero 2014, from http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/swine_influenza.pdf.

Crisci, E., T. Mussa, L. Fraile and M. Montoya (2013). "Review: influenza virus in pigs." Mol Immunol **55**(3-4): 200-211.

Chen, Q., D. Madson, C. L. Miller and D. L. Harris (2012). "Vaccine development for protecting swine against influenza virus." Anim Health Res Rev **13**(2): 181-195.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.

De Flora, S. and G. Badolati (1973). "Thermal inactivation of untreated and gamma-irradiated A2-Aichi-2-68 influenza virus." J Gen Virol **20**(2): 261-265.

Egli, A., D. Santer, K. Barakat, M. Zand, A. Levin, M. Vollmer, M. Weisser, N. Khanna, D. Kumar, L. Tyrrell, M. Houghton, M. Battegay and D. O'Shea (2014). "Vaccine adjuvants--understanding molecular mechanisms to improve vaccines." Swiss Med Wkly **144**: w13940.

Fedorova, A. A., E. P. Goncharova, M. P. Kovpak, V. V. Vlassov and M. A. Zenkova (2012). "Influenza virus inactivated by artificial ribonucleases as a prospective killed virus vaccine." Vaccine **30**(19): 2973-2980.

Flint, S. J., A. S. f. M. Staff, L. W. Enquist, V. R. Racaniello and A. M. Skalka (2009). Principles of Virology: Pathogenesis and Control, ASM Press.

Furuya, Y., M. Regner, M. Lobigs, A. Koskinen, A. Mullbacher and M. Alsharifi (2010). "Effect of inactivation method on the cross-protective immunity induced by whole 'killed' influenza A viruses and commercial vaccine preparations." J Gen Virol **91**(Pt 6): 1450-1460.

Gaydos, J. C., F. H. Top, Jr., R. A. Hodder and P. K. Russell (2006). "Swine influenza a outbreak, Fort Dix, New Jersey, 1976." Emerg Infect Dis **12**(1): 23-28.

Hijnen, W. A., E. F. Beerendonk and G. J. Medema (2006). "Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review." Water Res **40**(1): 3-22.

Janke, B. H. (2013). "Clinicopathological features of Swine influenza." Curr Top Microbiol Immunol **370**: 69-83.

Kawaoka, Y. and G. Neumann (2012). "Influenza viruses: an introduction." Methods Mol Biol **865**: 1-9.

Klenk, H. D. (2012). Influenza Virology. Influenza virus sialidase - A drug discovery target. M. Von Itzen, Springer.

Krauss, H., A. Weber and M. Appel (2003). Zoonoses, Infectious diseases transmissible from animals to humans. USA, ASM Press.

Kreijtz, J. H., R. A. Fouchier and G. F. Rimmelzwaan (2011). "Immune responses to influenza virus infection." Virus Res **162**(1-2): 19-30.

Lee, J. H., M. R. Gramer and H. S. Joo (2007). "Efficacy of swine influenza A virus vaccines against an H3N2 virus variant." Can J Vet Res **71**(3): 207-212.

Lorusso, A., A. L. Vincent, M. E. Gramer, K. M. Lager and J. R. Ciacci-Zanella (2013). "Contemporary epidemiology of North American lineage triple reassortant influenza A viruses in pigs." Curr Top Microbiol Immunol **370**: 113-132.

Loving, C. L., K. M. Lager, A. L. Vincent, S. L. Brockmeier, P. C. Gauger, T. K. Anderson, P. Kitikoon, D. R. Perez and M. E. Kehrli, Jr. (2013). "Efficacy in pigs of inactivated and live attenuated influenza virus vaccines against infection and transmission of an emerging H3N2 similar to the 2011-2012 H3N2v." J Virol **87**(17): 9895-9903.

Lowy, R. J., G. A. Vavrina and D. D. LaBarre (2001). "Comparison of gamma and neutron radiation inactivation of influenza A virus." Antiviral Res **52**(3): 261-273.

Ma, W. and J. A. Richt (2010). "Swine influenza vaccines: current status and future perspectives." Anim Health Res Rev **11**(1): 81-96.

MacLachlan, N. J. and E. J. Dubovi (2011). Fenner's veterinary virology. USA, Academic Press.

McDevitt, J. J., S. N. Rudnick and L. J. Radonovich (2012). "Aerosol susceptibility of influenza virus to UV-C light." Appl Environ Microbiol **78**(6): 1666-1669.

Morens, D. M. and J. K. Taubenberger (2014). "A possible outbreak of swine influenza, 1892." Lancet Infect Dis **14**(2): 169-172.

Myers, K. P., C. W. Olsen and G. C. Gray (2007). "Cases of swine influenza in humans: a review of the literature." Clin Infect Dis **44**(8): 1084-1088.

OIE. (2009). "Swine Influenza." Retrieved 01 April 2014, from [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal Health in the World/docs/pdf/Disease_cards/SWINE_INFLUENZA.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/SWINE_INFLUENZA.pdf).

Olsen, C. W., I. H. Brown, B. C. Easterday and K. Van Reeth (2006). Swine influenza. Diseases of swine. B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire and D. J. Tylor. USA, Blackwell Publishing.

PORCIMEX. "Consumo Per Cápita de carne de cerdo." Retrieved 24 Febrero 2014, from <http://www.porcimex.org/estadisticas/analiticos/percapita.htm>.

Raviv, Y., R. Blumenthal, S. M. Tompkins, J. Humberd, R. J. Hogan and M. Viard (2008). "Hydrophobic inactivation of influenza viruses confers preservation of viral structure with enhanced immunogenicity." J Virol **82**(9): 4612-4619.

Romagosa, A., M. Allerson, M. Gramer, H. S. Joo, J. Deen, S. Detmer and M. Torremorell (2011). "Vaccination of influenza a virus decreases transmission rates in pigs." Vet Res **42**: 120.

Schnitzler, S. U. and P. Schnitzler (2009). "An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: a review." Virus Genes **39**(3): 279-292.

Segura-Velazquez, R., J. Cervantes, E. Acosta, I. Sanchez-Betancourt, N. Villalobos, L. F. Rodarte, M. Restelli, G. Frago and E. Sciutto (2013). "Influenza vaccine: development of a novel intranasal and subcutaneous recombinant adjuvant." Vaccine **31**(37): 4009-4016.

Segura, R. V. (2004). Immunopotenciación de la vacuna de influenza mediante la utilización del péptido sintético GK-1. Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

SIAP. (2012). "Principales estados productores de carne de cerdo en canal." Retrieved 24 Febrero 2014, from <http://www.porcimex.org/estadisticas/analiticos/prodcarneedos.htm>.

SIAP. (2013). "Porcino, Población ganadera 2003 - 2012 Cabezas." Retrieved 25 Febrero 2014, from http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pecuario/PoblacionGanadera/ProductoEspecie/porcino.pdf.

SIAP. (2013). "Producción de carne en canal." Retrieved 24 Febrero 2014, from <http://www.porcimex.org/estadisticas/analiticos/prodcanal.htm>.

Tetsutani, K. and K. J. Ishii (2012). "Adjuvants in influenza vaccines." Vaccine **30**(52): 7658-7661.

Thacker, E. and B. Janke (2008). "Swine influenza virus: zoonotic potential and vaccination strategies for the control of avian and swine influenzas." J Infect Dis **197 Suppl 1**: S19-24.

-
- Tizard, I. R. (2009). Introducción a la inmunología veterinaria. España, Elsevier.
- Van Reeth, K. (2007). "Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk." Vet Res **38**(2): 243-260.
- Van Reeth, K., G. Labarque, S. De Clercq and M. Pensaert (2001). "Efficacy of vaccination of pigs with different H1N1 swine influenza viruses using a recent challenge strain and different parameters of protection." Vaccine **19**(31): 4479-4486.
- Van Reeth, K. and W. Ma (2013). "Swine influenza virus vaccines: to change or not to change-that's the question." Curr Top Microbiol Immunol **370**: 173-200.
- Van Reeth, K. and A. Nicoll (2009). "A human case of swine influenza virus infection in Europe--implications for human health and research." Euro Surveill **14**(7).
- Vincent, A. L., J. R. Ciacci-Zanella, A. Lorusso, P. C. Gauger, E. L. Zanella, M. E. Kehrli, Jr., B. H. Janke and K. M. Lager (2010). "Efficacy of inactivated swine influenza virus vaccines against the 2009 A/H1N1 influenza virus in pigs." Vaccine **28**(15): 2782-2787.
- Vincent, A. L., W. Ma, K. M. Lager, B. H. Janke and J. A. Richt (2008). "Swine influenza viruses a North American perspective." Adv Virus Res **72**: 127-154.
- Webby, R. J. and R. G. Webster (2001). "Emergence of influenza A viruses." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1416): 1817-1828.
- Webster, R. G. and D. J. Hulse (2004). "Microbial adaptation and change: avian influenza." Rev Sci Tech **23**(2): 453-465.
- Weiss, M. M., P. D. Weiss, D. E. Weiss and J. B. Weiss (2007). "Disrupting the transmission of influenza a: face masks and ultraviolet light as control measures." Am J Public Health **97** **Suppl 1**: S32-37.
- Yoon, K. J. and B. H. Janke (2004). Influenza porcina: Etiología, epidemiología y diagnóstico. Enfermedades víricas emergentes del cerdo. A. Morilla, J. J. Zimmerman and K. J. Yoon, Multimedia Ediciones Veterinarias: 29-36.