



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

**DINÁMICA DE INFECCIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL
CUADRO CLÍNICO DEL SUBTIPO DE INFLUENZA
H5N2 AVIAR, AISLADO EN CERDO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

BRENDA ALINE MAYA BADILLO

Asesor:

Dr. José Iván Sánchez Betancourt



Ciudad Universitaria, CDMX

2017



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

A la vida misma por permitirme estar en el ahora.

*A mis padres, mi mami **Lourdes Badillo Sánchez** por ser la mejor madre, amiga, consejera y siempre hacerme sentir protegida y segura, a mi papiringo **José Francisco Maya Sánchez** por todo el esfuerzo del día a día por nosotras, por nuestra familia, eres el mejor hombre que conozco, el mejor padre, el más trabajador y amoroso, aunque seas un gruñón. En realidad, no tengo una descripción precisa para hacerles saber que son el soporte y pilar de mi vida, sin su apoyo no hubiera podido lograr este sueño llamado Medicina Veterinaria y Zootecnia. Los amo infinitamente, siempre serán mi ejemplo a seguir y mi inspiración.*

*A mis hermanas **Sandra Lizeth Maya Badillo** (Meri I), **Diana Ivette Maya Badillo** (Meri II) y mi hermano perruno **Spaiky Maya Badillo** por ser mis compañeros de vida y soportarme cuando entraba en crisis escolar, por apoyarme y amarme a su manera, por las locuras que hacemos al estar juntos, a ustedes dos las amo para siempre loquitas y tú Spaiky siempre serás uno de los amores de mi vida, sé que muy en el fondo de tu corazón perruno lo entiendes, gracias por brindarme la fascinación de vivir y crecer con una especie animal diferente a la humana.*

*A mi novio **Guillermo Orta Pineda** (Memo, Ludi, Peludi, etc.), por conquistarme con pequeños grandes detalles que me hacen muy feliz, por hacerme reír y enojar, por cocinarme y también regañarme, por vivir conmigo esta relación llena de extremos y contradicciones, pero al mismo tiempo llena de amor, crecimiento y apoyo mutuo. Te amo de una manera impresionante, gracias por vivir esta etapa tan importante conmigo y por tu ayuda en todo sentido.*

*A mi sobrina **Hanna Rodríguez Maya** y a mi cuñado **César Valentín Rodríguez** por su apoyo incondicional, su cariño y ánimo, son muy importantes en mi vida, los adoro para siempre.*

*Al resto de mi familia y amigos, entre ellos tú, tía **Patricia Badillo** que eres una segunda madre para mí, a mis amigos, entre ellos **Karen Marina**, ya que estuvimos apoyándonos anímicamente en este proceso llamado tesis.*

*A todos los animales que fueron parte de mi formación académica, experiencia profesional y pacientes, pero en especial a mis cerdos experimentales (**Álbin, Brandón, Anne, Blusita, Strench, Diego, Erisipelo, Dayana, Cristiano y Erick**), gracias a ustedes este proyecto se pudo lograr, gracias infinitas mis lechones.*

AGRADECIMIENTOS

*De nuevo a mis padres, **Lourdes Badillo Sánchez** y **José Francisco Maya Sánchez**, todos mis logros son gracias a ustedes, los amo para siempre y resto de mi familia nuclear, **Sandra Maya, Diana Maya, Spaiky Maya, Hanna Rodríguez y Valentín Rodríguez**, son un rubro de mi vida bastante importante.*

*Al **Dr. José Iván Sánchez Betancourt** por todo su apoyo, siempre incondicional, por recibirme y aceptarme de una manera tan cálida en su grupo de investigación, por ofrecerme trabajar con un proyecto tan interesante y que me apasiona al máximo, usted realmente es un ejemplo que seguir, mi admiración por usted es muy grande y mi cariño aún mayor, muchas gracias.*

*A mi novio **Guillermo Orta Pineda** porque sin tu ayuda el experimento no hubiera sido lo mismo, ni las aventuras con los hermosos lechones, las fiestas en la playa al estilo lechón, los juegos de pelota y los enojos a causa de Dayana, gracias por brindarme tu apoyo, aquel diciembre nunca lo olvidaré, te amo.*

*A los miembros del **grupo de investigación del DMVZ** quienes serán mencionados a continuación, teniendo como titular al **Dr. José Iván Sánchez Betancourt**:*

*A **María José Martínez Mercado** por ser mi maestra en laboratorio y fuera de él, realmente te admiro y te quiero mucho, eres una gran persona, muy brillante y talentosa, fuiste mi salvación en este proceso de aprendizaje, te debo bastante y me siento muy contenta de haberte conocido, ya eres una amiga muy especial y que me gustaría conservar el resto de mi vida.*

*A **Saúl Reveles Félix** por apoyarme de una manera muy especial, eres una persona muy noble, nunca olvidaré la fuerza y disposición que aplicaste al ayudarme con esos macerados, ni todas las veces que esperabas a que terminara mis pruebas en el laboratorio (casi siempre de noche) para acompañarme a casa, mil gracias Sauli.*

A **Carmen Gaitán Carmona** por ser mi maestra de las IH's, y formar parte de mi video "Introducción al uso de la centrífuga", eres una persona muy talentosa y muy tierna, mil gracias por apoyarme, nunca lo olvidare.

Al resto de mis compañeros de investigación **Manuel Saavedra**, por estar siempre dispuesto a resolver mis dudas, eres un maestro pokemón de la influenza y te admiro mucho, a **Rebeca Martínez** por apoyarme con la secuenciación y mil cosas más a pesar de ser una de las mujeres más ocupadas y talentosas que conozco, a **Guadalupe Chávez** por ayudarme aquel 24 de diciembre a muestrear a mis cerdos y por los consejos, a **Mariana Pérez**, eres un ejemplo a seguir, gracias por tus consejos y apoyo, a **María José Contreras**, por tu apoyo, consejos y ánimos, a **Mariana García** por tu disposición, tus consejos y observaciones y **Alef González** por tu apoyo, consejos y todas las risas con el filtro de más belleza.

A los investigadores **Jacqueline Cervantes** y **René Segura** por apoyarme en este proceso de formación académica, aún recuerdo mis pensamientos de admiración al estar con ustedes en Biomédicas, gracias por todo.

Como agradecimiento especial a **Oscar Rico Chávez** por su apoyo, tiempo y espacio, definitivamente eres un maestro de "R studio", eres muy talentoso y te admiro mucho. A **Pablo Velasco**, por su apoyo con la descripción patológica, sé que serás de los mejores patólogos del futuro y a Roberto **González**, por tu apoyo aquel 24 de diciembre, fue un gesto muy lindo, en serio lo valoro mucho.

A mi amada **Universidad Nacional Autónoma de México** y en especial a mi adorada **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**, así como al **Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos**, dentro de este, personas muy talentosas y especiales, doctoras y doctores, así como laboratoristas y compañeros.

Finalmente:

Esta investigación no pudo haberse realizado sin el financiamiento y apoyo de **CONACYT** bajo el número de proyecto CB-2015 254244 a cargo del **Dr. José Iván Sánchez Betancourt**, gracias por la oportunidad. **Gracias por el apoyo de la Unidad de Investigación de la FMVZ.**

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Características del virus de influenza.....	5
Etiología.....	5
Identificación de los virus de influenza.....	8
Mecanismos determinantes de la variabilidad del virus de influenza.....	8
Deriva antigénica.....	8
Cambio antigénico.....	9
Replicación viral.....	10
Historia del virus de influenza porcina.....	13
Historia del virus de influenza aviar.....	16
Historia del virus de influenza en humanos y pandemias a lo largo del tiempo.....	20
Situación epidemiológica del virus de influenza.....	25
Subtipo H5N2.....	26
Cruce de barrera interespecie o salto taxonómico.....	29
Receptores celulares.....	31
Subtipos aviares aislados en cerdos.....	32
H9N2.....	32
H4N6.....	33

H3N3.....	34
H2N3	34
H5N2	34
Influenza en cerdos	35
Influenza en aves	40
Diagnóstico	43
Aislamiento viral	43
Histopatología	44
Pruebas serológicas	44
Inhibición de la hemoaglutinación (IH)	44
ELISA	44
Inmunofluorescencia indirecta (ID)	45
Pruebas moleculares	46
RT-PCR	46
Prevenición y control	47
Antivirales	48
Amantadina	49
Oseltamivir	49
 JUSTIFICACIÓN	 51
HIPÓTESIS	51
OBJETIVO GENERAL	52
Objetivos específicos	52
MATERIAL Y METODOS	53
Virus y origen de los animales	53
Muestreo	53

Desafío	54
Registros clínicos	54
Eutanasia y técnica de necropsia	54
Manejo de las muestras	55
Inhibición de la hemoaglutinación “IH” (método beta, suero diluido- virus constante)	56
Extracción de RNA viral	58
PCR en tiempo real	59
Aislamiento viral	62
Titulación viral	63
RESULTADOS	65
Signos clínicos observados	65
Resultados a la necropsia	72
Histopatología	78
Serología: Inhibición de la hemoaglutinación	80
RT-PCR	85
Aislamiento viral	97
DISCUSIÓN	102
CONCLUSIONES	109
REFERENCIAS	110
ANEXOS	123

FIGURAS

Figura 1. Virus de influenza	6
Figura 2. Reordenamiento y deriva antigénica	9
Figura 3. Replicación del virus de influenza.....	13
Figura 4. Mapa de distribución de las pandemias y línea del tiempo.....	24
Figura 5. Mapas de casos de pandemia de A / H1N1 confirmado por estudios de laboratorio en México durante el periodo de abril-diciembre de 2009.....	25
Figura 6. Reservorios y eventos de transmisión entre especies de virus de influenza aviar de baja patogenicidad	31
Figura 7. Receptores celulares	32
Figura 8. Lesiones macroscópica y microscópicas en pulmón, producidas por el virus de influenza	39
Figura 9. Lesiones macroscópicas (a-i), cambios histopatológicos (j-l) e inmunohistoquímicos en aves experimentalmente infectadas con HPAI	42
Figura 10. Inoculación viral en cavidad alantoidea de embrión de pollo ..	64
Figura 11. Observación de secreción nasal en los grupos experimentales, infectado y centinela	67

Figura 12. Observación de edema palpebral en los grupos experimentales infectados y centinelas	68
Figura 13. Observación de depresión en los grupos experimentales infectados y centinelas	69
Figura 14. Observación de diarrea en el grupo experimental infectado ...	70
Figura 15. Gráfica de temperaturas rectales de los grupos experimentales a lo largo del experimento	71
Figura 16. Comparación de bloques cardiopulmonares entre los tres grupos experimentales	73
Figura 17. Comparación de linfonodos mediastínicos entre los grupos experimentales centinelas e infectados	74
Figura 18. Cavidad oral, comparación de la tráquea entre los tres grupos experimentales	75
Figura 19. Comparación de linfonodos submandibulares entre los tres grupos experimentales	76
Figura 20. Comparación de linfonodos inguinales entre los tres grupos experimentales	77
Figura 21. Gráfica de promedio de lesiones a la histopatología por grupo experimental	79

Figura 22. Gráfica de resultados de la inhibición de la hemoaglutinación para los subtipos H5N2, H1N1 y H3N2 del día cero, 6 y 12 posterior a la infección en los diferentes grupos experimentales.....	84
Figura 23. Gráfica de RT-PCR de la tráquea de los tres grupos experimentales	88
Figura 24. Gráfica de RT-PCR de pulmón de los tres grupos experimentales	90
Figura 25. Gráfica de RT-PCR de pulmón de los tres grupos experimentales	92
Figura 26. Gráfica de RT-PCR de los hisopos nasales tomados al día 6 pos inoculación de los tres grupos experimentales	94
Figura 27. Gráfica de RT-PCR de los hisopos nasales tomados al día 7 pos inoculación de los tres grupos experimentales	96
Figura 28. Gráfica de RT-PCR del líquido alantoideo colectado a las 48 h post inoculación en el segundo pase de los órganos positivos a la RT-PCR	101

CUADROS

Cuadro 1. Genes y proteínas del virus Influenza A	7
Cuadro 2. Fenotipos del virus de influenza que infectan a los cerdos alrededor del mundo	16
Cuadro 3. Relación de afectaciones por influenza aviar de alta patogenicidad (1959-2005) e influenza aviar notificable (2005-2006)	19
Cuadro 4. Situación sanitaria nacional del virus de influenza, subtipo H5N2 en los últimos tres años	27
Cuadro 5. Situación sanitaria nacional del virus de influenza, subtipo H7N3 en los últimos tres años	28
Cuadro 6. Informes de la situación zoonositaria del Estado de México por ser el virus experimental de dicho lugar	29
Cuadro 7. Semiología Clínica de los individuos experimentales	66
Cuadro 8. Resultados de Inhibición de la hemoaglutinación para el subtipo H5N2	80
Cuadro 9. Resultados de Inhibición de la hemoaglutinación para el subtipo H1N1	81
Cuadro 10. Resultados de Inhibición de la hemoaglutinación para el subtipo H3N2	82
Cuadro 11. Resultados positivos y negativos de la RT-PCR de los órganos de los cerdos experimentales	85
Cuadro 12. Resultados positivos y negativos de la RT-PCR de las muestras de hisopos nasales de los cerdos experimentales	86
Cuadro 13. Valores de Ct y de la concentración de la RT-PCR de tráquea de los tres grupos experimentales	87

Cuadro 14. Valores de Ct y concentración de la RT-PCR de pulmón de los tres grupos experimentales	89
Cuadro 15. Valores de Ct y de la concentración de la RT-PCR de duodeno de los tres grupos experimentales	91
Cuadro 16. Valores de Ct y de la concentración de la RT-PCR de los hisopos nasales al día 6 pos inoculación de los tres grupos experimentales	93
Cuadro 17. Valores de Ct y de la concentración de la RT-PCR de los hisopos nasales al día 7 pos inoculación de los tres grupos experimentales	95
Cuadro 18. Titulación por hemoaglutinación en microplaca del líquido alantoideo de los embriones colectado a las 48 h pos inoculación en el primer y segundo pase	98
Cuadro 19. Relación de muertes de los embriones de pollo inoculados a las 24, 48 y 72 h post inoculación	99
Cuadro 20. Valores de Ct y de la concentración de la RT-PCR del líquido alantoideo colectado a las 48 h al segundo pase post inoculación de los resultados positivos a la RT-PCR	100

RESUMEN

MAYA BADILLO BRENDA ALINE. Dinámica de infección y descripción del cuadro clínico del subtipo de influenza H5N2 aviar, aislado en cerdo (bajo la dirección de: MVZ, MC, Dr.C José Iván Sánchez Betancourt).

Los Influenzavirus A están entre los virus más desafiantes que amenazan la salud humana y animal, ya que son únicos en muchos aspectos, desde la gran diversidad de hospederos que infectan hasta su capacidad única para evolucionar y adaptarse, tras atravesar la barrera entre especies. En México en el año 2015 se reportó el aislamiento viral del subtipo H5N2 en cerdos del Estado de México. El objetivo del trabajo fue identificar si el subtipo H5N2 aviar se replica y genera un cuadro clínico en cerdos. Se utilizaron 10 lechones, divididos en: grupo infectado, centinela y control. Se inoculó al grupo infectado con 2 ml del virus aislado con un título de 1:256 UHA, se tomaron muestras de suero a los 6 y 12 días post inoculación para serología, hisopados nasales diarios. Además, se colectaron linfonodos submandibulares, inguinales, glándula salival, tonsilas, tráquea, pulmón, duodeno, hígado y bazo para histopatología y qRT-PCR, con las muestras positivas a esta prueba se realizó el aislamiento viral. Se juntó al grupo infectado con el centinela para observar la infección intraespecie. Los resultados muestran un cuadro subclínico en los cerdos del grupo infectado y centinela, éstos presentaron lesiones a la necropsia y en la histopatología, sugerentes a una

infección viral. No se observó seroconversión por IH. La tráquea del grupo infectado, pulmón y duodeno del grupo centinela, así como los hisopos nasales del día 6 y 7 posts inoculaciones resultaron positivos a la qRT-PCR. El aislamiento viral fue positivo a la hemoaglutinación en microplaca, obteniendo un título de 1:64 UHA para el inóculo de tráquea del grupo infectado y 1:8 UHA para el inóculo de pulmón del grupo centinela, se confirmó el resultado positivo con la qRT-PCR.

INTRODUCCIÓN

El virus de Influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, posee un RNA de cadena simple, compuesto de 8 segmentos, es de polaridad negativa y su genoma consta de 13,588 nucleótidos. Con base en sus diferencias antigénicas existentes entre su nucleoproteína y la proteína de matriz, se dividen en los tipos A, B, C y D (Mc Cauley *et al*, 2012). Los virus de Influenza tipo A poseen distintos subtipos de acuerdo a las 16 hemoaglutininas y 9 neuraminidasas (Arbeláez, Calderón, Rincón, Lora, & Mercado, 2008). Actualmente se sabe de la existencia de dos nuevos subtipos de hemoaglutinina y neuraminidasa (Rejmanek, Hosseini, Mazet, & Daszak, 2015). Los subtipos recientemente identificados de virus de influenza A son el H17N10 y el H18N11 encontrados en hisopos rectales de murciélagos *Sturnira lilium* y *Artibeus jamaicensis planirostris* (Short *et al.*, 2015).

Los virus de influenza A infectan a una gran variedad de animales, incluidos los humanos, porcinos y diversas especies de aves (Rajao & Vincent, 2015). El virus de influenza presenta variaciones genéticas frecuentes en los segmentos de RNA. Ellas originan cambios en la secuencia nucleotídica de la neuraminidasa y/o de la hemoaglutinina, modificando su composición amínica e identidad antigénica (Arbeláez *et al.*, 2008).

Al tener un genoma segmentado, los virus de Influenza tienen una evolución continua, que es mucho mayor en las glucoproteínas de superficie, pero también ocurre en menor grado en cada uno de los ocho segmentos génicos (Stephenson & Nicholson, 2001). Esta variabilidad da como resultado la acumulación de

cambios moleculares en los ocho segmentos de RNA y pueden ocurrir por una serie de diferentes mecanismos que incluyen mutaciones puntuales “drift” (deriva antigénica), reordenamiento del gen “shift” (cambio genético), defectos de interferencia de partículas y la recombinación de RNA. Las mutaciones, incluyendo sustituciones, deleciones e inserciones, son uno de los mecanismos más importantes para producir variaciones en los virus de influenza (R. Webster, Bean, Gorman, Chambers, & Kawaoka, 1992).

La HA del virus de influenza en los humanos se une preferentemente al ácido siálico α 2,6-galactosa (SAa2,6-Gal) encontrado en las superficies celulares de las células epiteliales respiratorias. Contrariamente los virus de influenza en las aves se unen preferentemente a un ácido siálico α 2,3-galactosa (SAa2,3-Gal) encontrados principalmente en las células epiteliales del intestino aviar (siendo este el sitio principal de replicación en aves). Por otro lado el tracto respiratorio, principalmente la tráquea del cerdo, tiene ambos receptores, lo que lo vuelve el principal foco de atención ya que se ha propuesto que en él se pueden reorganizar genéticamente virus aviarios y humanos, dando lugar a nuevas cepas (Stephenson & Nicholson, 2001).

La capacidad que tiene el virus de influenza A, de infectar a una variedad de animales ha despertado el interés a nivel mundial, en 2005 la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE), de manera conjunta con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), crearon un organismo llamado OFFLU (OIE FAO Influenza), encargado de vigilar y controlar

las infecciones causadas por el virus de influenza, una enfermedad de distribución mundial (OFFLU, 2015).

CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DE INFLUENZA

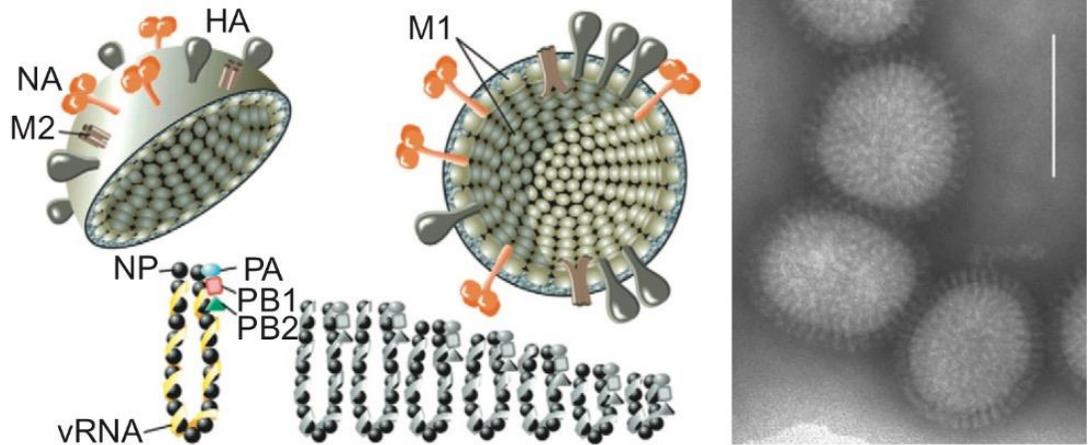
ETIOLOGÍA

Los virus de influenza pertenecen a la familia Orthomyxoviridae que consta de los géneros: influenzavirus A, influenzavirus B, influenzavirus C, Influenzavirus D, thogotovirus y los Isavirus (Fenner's, 2011.; Gramer, 1999).

Los virus de la familia Orthomyxoviridae son virus pequeños de 80 a 120 nm de diámetro, pleomórficos que posteriormente se vuelven generalmente esféricos. Estas partículas virales consisten en una envoltura de bicapa lipídica derivada del huésped en la que están incrustadas las glicoproteínas codificadas por el virus, la hemoaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) así como la proteína de matriz M2, una cubierta interna de proteína de matriz y en el centro, la nucleocápside del genoma viral (R. Webster *et al.*, 1992).

Los ocho segmentos génicos de RNA comprenden el genoma del virus tipo A, estos son responsables de la traducción de 10 u 11 proteínas virales, las cuales son: tres polimerasas (PB1, PB2 y PA) la hemoaglutinina (HA), nucleoproteína (NP), neuraminidasa (NA), proteínas de matriz M1 y M2 y las proteínas no estructurales NS1 y NS2 (Gramer, 1999; R. G. Webster, Bean, Gorman, & Chambers, 1992).

Figura 1. Virus de influenza



Tomada de: MACLACHLAN, J., DUBOVIE.: Fenner's Veterinary Virology. 4th. Ed. London: Academic Press, 2011.

Cuadro 1. Genes y proteínas del virus Influenza A

Gen ID	Segmento	Nombre de la proteína	Función de la proteína
1	Polimerasa B2 (PB2)	Polimerasa B2 (PB2)	Proteína interna, replicación viral
2	Polimerasa B1 (PB1)	Polimerasa B1 (PB1) PB1 – F2	Proteína interna, replicación viral Orientación mitocondrial y apoptosis
3	Polimerasa A (PA)	Polimerasa A (PA)	Proteína interna, replicación viral
4	Hemoaglutinina (HA)	Hemoaglutinina (HA)	Glicoproteína de superficie, unión viral, determinante antigénico, subtipo específico (H1 a H16)
5	Nucleoproteína (NP)	Nucleoproteína (NP)	Proteína de nucleocápside, recubrimiento de RNA, focalización nuclear, transcripción de RNA, tipo (A, B, C) específica.
6	Neuraminidasa (NA)	Neuraminidasa (NA)	Proteína de superficie, determinante antigénico, liberación viral de las células huésped, subtipo específico (N1 a N9)
7	Matriz (M)	Matriz 1 (M1) Matriz 2 (M2)	Estabilidad de la proteína de membrana, tipo específico (A, B, C) Proteína de membrana, desprendimiento viral, tipo específico (A, B, C)
8	No estructural (NS)	No estructural 1 (NS1) No estructural 2 (NS2)	Proteínas internas La regulación del ciclo de vida del virus, especialmente la transcripción de RNAm y la localización de proteínas ribonucleicas virales

Tomada de: Gramer M R. Defining swine influenza virus. Journal of Swine Health and Production, 2005.

IDENTIFICACIÓN DE LOS VIRUS DE INFLUENZA

Debido a la alta variabilidad que experimentan los virus de influenza A, existe un sistema de nomenclatura establecido para cada subtipo aislado, basado en las proteínas de superficie, HA (HA 1 - HA 18) y NA (NA 1 - NA 11) (Rivera, 2000; Straw *et al.*, 2002).

Tipo / Especie / Origen / Localización geográfica / Identificación de laboratorio / Año de aislamiento / (HA y NA).

En cuanto a la clasificación de los virus de influenza tipo B y C, es realizada únicamente por cepas (Córdoba *et al.*, 2010).

MECANISMOS DETERMINANTES DE LA VARIABILIDAD DEL VIRUS DE INFLUENZA

La variabilidad antigénica de los virus de influenza es muy alta, esto en gran parte se debe a su genoma segmentado, pero también existen dos mecanismos principales que determinan esta variabilidad. Uno de ellos es llamado “DRIFT” o deriva antigénica y el otro es llamado “SHIFT” o reordenamiento antigénico (Schmuke, García-Sastre; 2010).

Deriva antigénica

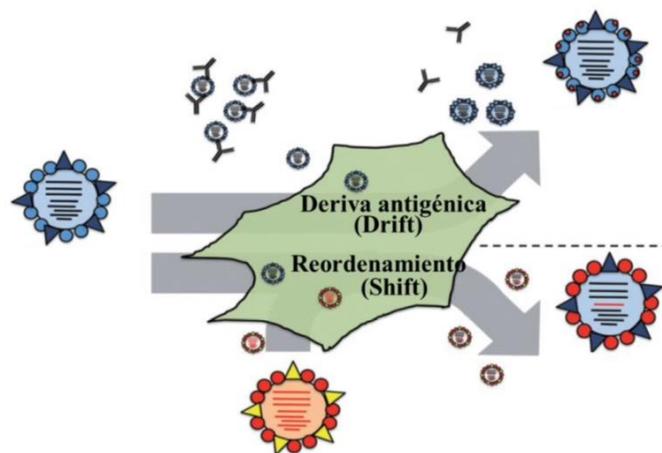
La deriva antigénica se debe a acumulaciones de mutaciones puntuales en el gen, que resultan en cambios de aminoácidos en las proteínas de superficie HA y NA, así como en genes internos. Los cambios en la secuencia de aminoácidos, pueden alterar los sitios antigénicos sobre la molécula, de este modo es posible que el virión escape al reconocimiento por el sistema inmune del huésped. Una variante debe experimentar dos o más mutaciones antes de que surja una cepa

nueva de importancia epidemiológica (Zambon, 1999). Por medio de este mecanismo es como se generan los virus de tipo estacional (Brown, 2000).

Cambio antigénico

Se trata de alteraciones antigénicas importantes en la HA y NA, que conducen a la aparición de un nuevo subtipo de influenza. Los segmentos genómicos virales del virus de influenza se redistribuyen con facilidad en células doblemente infectadas, generando así alteraciones drásticas en la secuencia de una proteína de la superficie viral. Estos cambios son demasiado grandes para poderlos considerar como una mutación (Zambon, 1999). Es probable que el cambio antigénico esté dado por el entrecruzamiento o reordenamiento genético entre virus de influenza humanos y animales, especialmente los de origen aviar y porcino (Vries *et al.*, 2010).

Figura 2. Reordenamiento y deriva antigénica



Tomada de: Gaitán, 2016. Modificado de Modificado de Schmolke, García-Sastre; 2010.

REPLICACIÓN VIRAL

La hemoaglutinina facilita la entrada del virus a la célula huésped mediante su unión a receptores de ácido siálico. Es el principal determinante antigénico de los virus tipo A y B, cabe mencionar que los anticuerpos neutralizantes y los componentes vacúnales van dirigidos contra esta. Una importante función de la neuraminidasa, que es el segundo determinante antigénico, es catalizar la escisión de los enlaces glicosídicos con ácido siálico, ayudando así a la liberación de la progenie de viriones de células infectadas. En consecuencia, la neuraminidasa se ha convertido en un objetivo de actividad antiviral. El canal iónico M2 del virus de influenza A, regula el pH interno del virus, que es crucial durante la fase viral temprana de la replicación (Nicholson, Wood, & Zambon, 2003).

La HA sufre tres tipos de procesamiento postraduccional: división proteolítica, glicosilación y acilación de ácidos grasos, dando como resultado final el corte de la HA0 en dos subunidades, HA1 y HA2 que están unidas por enlaces disulfuro (Zambon, 1999).

Una vez dada la unión de la hemoaglutinina a los receptores celulares de ácido siálico, los virus entran en las células huéspedes a través de endocitosis mediada por receptores, el bajo pH del endosoma desencadena un cambio conformacional en la proteína HA de forma que el dominio hidrofóbico del trímero HA2 media la fusión del virus con la membrana endosomal, liberando las proteínas polimerasa, nucleoproteína y el RNA viral en el citoplasma (RNP). Mientras que en el endosoma, el canal iónico M2 tetramérico transporta protones en la partícula del virus para la disociación de la unión de M1 al complejo RNP, liberándolo de la

envoltura viral. La amantadina y rimantadina inhiben la replicación del virus de influenza bloqueando el canal iónico de M2 (Fenner's, 2011).

Una característica única del virus de influenza es que toda la síntesis de RNA tiene lugar en el núcleo de la célula. Esto requiere de la RNP, que debido a su tamaño, es transportada activamente al núcleo. La nucleoproteína interactúa con la maquinaria de transporte nuclear de las células para transportar la RNP hacia el núcleo. Como con todos los virus con genomas RNA de sentido negativo, el genoma del virus de influenza cumple dos funciones: una plantilla para la síntesis de RNA mensajeros (mRNAs), y una plantilla para la síntesis de reacciones de sentido positivo para el RNA intermediario (RNAi), que es la plantilla para la progenie de la síntesis de RNA genómico (Fenner's, 2011).

La transcripción primaria implica un fenómeno inusual conocido como captura Cap, la endonucleasa viral de PB2 escinde la 5-metilguanosina Cap alrededor de 10-13 nucleótidos de mRNAs celulares que son capturados por PB2. Estas Caps entonces son utilizadas por el virus como cebadores para la transcripción por la RNA polimerasa viral (transcriptasa, PB1). Los RNAm víricos también se vuelven poliadenilados mediante la transcripción de siete residuos en el RNA del virión (Fenner's, 2011).

La síntesis de proteínas virales se produce en el citoplasma usando la maquinaria de traducción celular. En la infección temprana, hay síntesis de nucleoproteína y NS1, mientras que la síntesis de la hemoaglutinina, neuraminidasa y la proteína M1 se retrasa. La nucleoproteína es necesaria para la replicación del virión RNA, NS1 se ha demostrado que inhibe la respuesta antiviral desencadenada por la

infección. La nucleoproteína debe ser transportada al núcleo para interactuar con el RNA e iniciar la replicación (Fenner's, 2011).

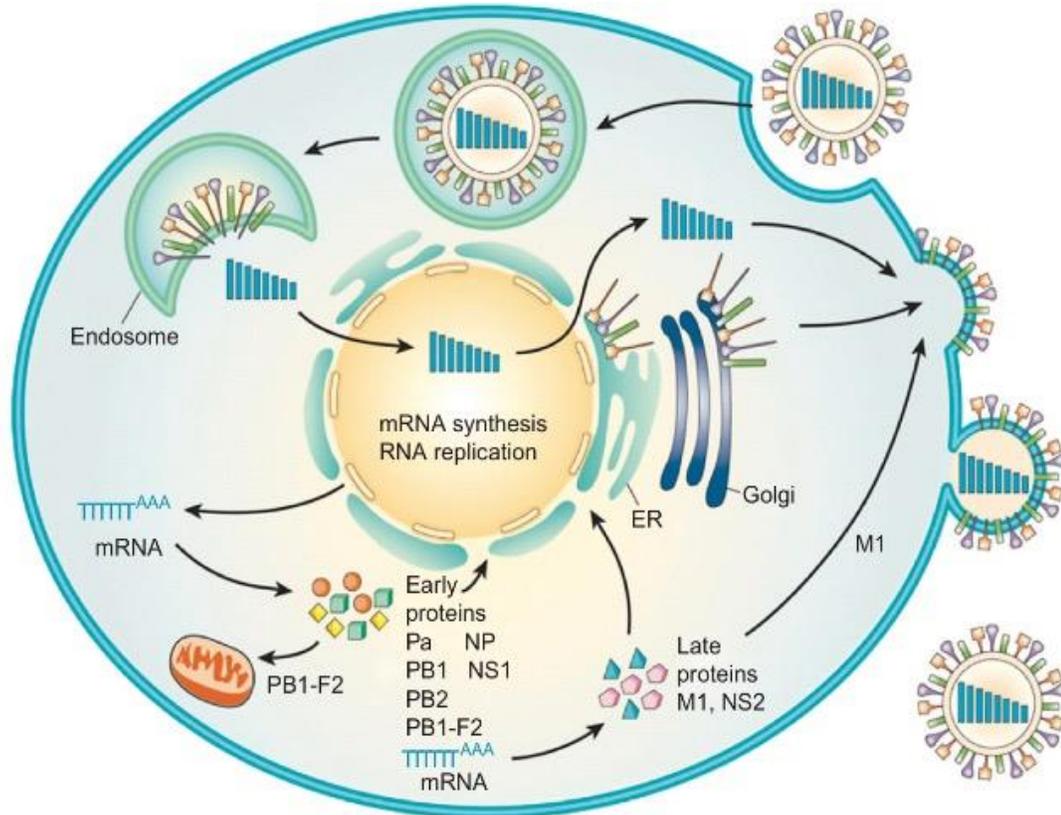
La replicación de los segmentos de RNA genómico requiere la síntesis completa de longitud, de sentido positivo RNAi, que a diferencia de los correspondientes mRNA transcritos, deben carecer de Cap de 5' y 3'-poli (A). Recientemente sintetizada la nucleoproteína se une a estos RNAs, facilitando su uso como plantillas para la síntesis de RNA genómicos. En la infección tardía, la proteína de matriz, M1, entra en el núcleo y se une al nucleótido genómico nascente del RNA, por lo que durante la transcripción se permite la exportación desde el núcleo. La "Proteína de Exportación Nuclear" NEP/ NS2 se unen a los complejos M1-RNP, proporcionando así las señales de exportación nuclear y la interacción que mueve la exportación de la RNP hacia el citoplasma (Fenner's, 2011).

Los viriones se forman por gemación, incorporando la proteína M1 y la nucleocápside que se han alineado por debajo de los parches en la membrana plasmática en la que la hemoaglutinina, neuraminidasa y la proteína de matriz, M2 están. En las células polarizadas, la gemación del virus de influenza se da en la parte apical de la célula, donde la proteína hemoaglutinina y neuraminidasa contienen dominios transmembrana que se asocian con áreas de la membrana enriquecidos con esfingolípidos y colesterol, designados como balsas lipídicas. Estas balsas lipídicas alteran la fluidez que parece ser crítica para el proceso de escisión y la capacidad infectante de las partículas virales (Fenner's, 2011).

La infectividad del virus depende del corte de HA por proteasas específicas, mientras que la NA está involucrada en la liberación de los viriones progenie de la

superficie celular y previene el agrupamiento de los virus recién formados (Zambon, 1999).

Figura 3. Replicación del virus de influenza



Tomada de: MACLACHLAN, J., DUBOVIE.: Fenner's Veterinary Virology. 4th. Ed. London: Academic Press, 2011.

HISTORIA DEL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA

En Illinois, Estados Unidos de América, la influenza porcina fue reconocida por primera vez como una enfermedad respiratoria infecciosa en los cerdos desde su primera aparición simultánea con la pandemia española de 1918 (Karasin et al., 2002). El virus no fue aislado hasta 1931, cuando la secreción nasal de los cerdos

fue inoculada en hurones y posteriormente en huevos embrionados de pollo por el Dr. Richard Shope, quien demostró que la enfermedad era causada por un virus y no por la bacteria llamada *Bacillus influenzae* como lo afirmaba el Dr. Richard Pfeiffer en 1892 (Heather, 2006). Otra de las hipótesis existentes, afirma que el virus tenía un origen de tipo aviar, este mutó y logro transmitirse a los cerdos (Hinshaw, Air, Gibbs, Graves, & Prescott, 1982).

Después del primer aislamiento de la gripe porcina no se observó enfermedad hasta las décadas de 1940 y 1950 en Checoslovaquia, Reino Unido y Alemania Occidental, aparentemente el virus había desaparecido hasta 1976, posteriormente reapareció en el Norte de Italia, extendiéndose a Bélgica y el sur de Francia en 1979, desde entonces las epizootias de influenza porcina ocurren en Europa de manera regular (Fenner's, 2011).

En la década de 1970 la población de cerdos en Europa fue hospedero de un nuevo virus aviar H1N1. De manera genética y antigénica este nuevo virus era diferente al virus H1N1 clásico, descendiente directo del virus de 1918. El nuevo virus aviar reemplazó al virus H1N1 clásico y evolucionó de manera continua durante los años siguientes, recombinándose con otros virus porcinos y humanos. A finales de 1990, se introdujeron en el pool genético de los virus porcinos, virus humanos y aviares, identificándose genes de las proteínas HA, NA y PB1 de origen humano, genes de NP, NS y M de origen porcino y genes PA y PB2 de origen aviar, de tal manera se establecieron en poblaciones porcinas de América del Norte (Brown, 2000).

En Estados Unidos de América y Canadá han surgido recombinantes del virus de influenza porcina desde 1998, un ejemplo de ello es el subtipo H3N2, que contiene

genes de origen humano y porcino, otro ejemplo ocurrido en China fue el surgimiento de otro virus H3N2 triple recombinante que contenía genes humanos, porcinos y aviares (Ma, Kahn, & Richt, 2009).

La recombinación entre virus H3N2 y virus H1N1 clásico originó la aparición de los virus H1N2, el cual a partir de 1999 surge y se distribuye en la población porcina de los Estados Unidos de América, este virus contenía genes de influenza A humana, aviar y porcina. Cabe mencionar que en años anteriores el virus H1N2 ya había sido reportado en poblaciones de cerdos en Japón en 1978, Francia en 1987, Reino Unido en 1994 y Bélgica en 1999 (Alexander, 2000).

Todos los virus de influenza de importancia en los cerdos son virus de tipo A, siendo los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 los reconocidos mundialmente en dicha población (Janke, 2014).

Cuadro 2. Fenotipos del virus de influenza que infectan a los cerdos alrededor del mundo

Subtipo	Área Geográfica	Comentarios	
H1N1	Norteamérica Europa Asia Sudamérica	Virus clásico aislado en 1930 en Norteamérica	
	Europa		Virus aviar aislado en 1970
	Asia		Virus aviar aislado en 1993
H3N2	Asia Europa Norteamérica Sudamérica África Asia	Virus Humano aislado en 1970 en Asia	
		Virus aviar aislado en 1978	
H1N2	Asia	Virus recombinante: Virus clásico/virus humano en Japón	
	Europa	Virus recombinante de virus humanos en Gran Bretaña	

Tomado de: Brown, I. H. (2000). The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs, 74.

HISTORIA DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR

La influenza aviar fue inicialmente descrita en 1878, como una enfermedad grave de las aves, por Perroncito en Turín, Italia con el nombre de “Peste aviar” (Alfonso, 2006). La enfermedad se propagó rápidamente por Europa y Asia, se informó también tanto en el Norte como en el Sur de América a mediados de los años veinte. El agente causal fue aislado en 1901, pero no se identificó como virus de influenza sino hasta 1955 (Fenner’s, 2011).

En 1961 ocurrió un brote con alta mortalidad en las poblaciones de charrán común (*Sterna hirundo*) en Sudáfrica, proporcionando la primera evidencia de la participación directa de las aves en la transmisión del virus de influenza. A partir

de los años setenta, el virus de la gripe aviar entró en el enfoque ecológico cuando la vigilancia indicaba la presencia de infecciones virales subclínicas en aves silvestres representando un riesgo sanitario para las industrias avícolas (Fenner's, 2011).

Los virus de influenza aviar fueron divididos en 2 grupos con base en su patogenicidad. Uno de los grupos es conocido como virus de influenza aviar altamente patógena (HPAI), causando enfermedad multisistémica y tasas de mortalidad cercanas al 100%. El otro grupo es llamado virus de influenza aviar de baja patogenicidad (LPAI), donde la mayoría de las cepas son avirulentas, produciendo infecciones leves en tracto respiratorio y gastrointestinal (Caron, Gaidet, Garine-wichatitsky, Morand, & Cameron, 2009; Causey & Edwards, 2008).

Las aves acuáticas silvestres particularmente las especies de *Anseriformes* (patos, cisnes y gansos) y *Charadriiformes* (gaviotas, charranes y limícolas) se consideran los depósitos naturales de los virus de influenza aviar de baja patogenicidad (Caron *et al.*, 2009; Lebarbenchon, Feare, Renaud, Thomas, & Gauthier-clerc, 2010). Entre los 16 subtipos de hemoaglutinina de los virus de influenza aviar perpetuados en aves silvestres, donde causaron enfermedad inaparente o leve, los virus H5 y H7 (y en menor medida los H9) se reconoce que tienen el potencial de convertirse en virus altamente patógenos en aves de producción. Generalmente se considera que los virus de HPAI emergen de virus de LPAI una vez adaptados a las poblaciones de aves de corral y no produciéndose en las aves silvestres (Gaidet *et al.*, 2008).

Desde 1955 se han producido brotes o epizootias de gripe aviar, causadas por mutantes de virus de LPAI (encontrados en las poblaciones de aves silvestres)

que mutaron a virus de HPAI, causando graves pérdidas económicas y millones de muertes en aves de producción y aves silvestres (Fenner's, 2011). De 1959 al inicio de la panzootia por el subtipo H5N1 en el 2003 se presentaron 26 brotes de influenza aviar en solo 21 países (Alfonso, 2006). Durante dichos brotes se ha podido aislar un H5N2 con genotipo HP en patos silvestres (*Platyrrhynchos de los anecdotarios*) (Gaidet *et al.*, 2008), otro ejemplo es el aislado del subtipo H5N3 letal en golondrinas de mar (*Sterna hirundo*) (Tern & Africa, 1966) (Becker, 1966). Finalmente la dispersión de los virus de influenza aviar se ha visto favorecida por la migración de aves silvestres, quienes han utilizado la región del estrecho de Bering, siguiendo dos rutas principales, una a lo largo de la costa oeste de EUA (para algunas especies hasta América del Sur) y la otra a lo largo de Australasia para el sudeste asiático y Australia (Wahlgren *et al.*, 2008). De esta manera los linajes de los virus aviares fueron divididos en dos, los de tipo Eurasiático y los de tipo Norteamericano (Krauss *et al.*, 2007; Makarova, Kaverin, Krauss, Senne, & Webster, 2017; Wahlgren *et al.*, 2008).

Cuadro 3. Relación de afectaciones por influenza aviar de alta patogenicidad (1959-2005) e influenza aviar notificable (2005-2006).

Año	Localización	Especie afectada	Subtipo
1959	Escocia, Reino Unido	Pollos	H5N1
1963	Gran Bretaña, Reino Unido	Pavos	H7N3
1966	Notario, Canadá	Pavos	H5N9
1976	Victoria, Australia	Pollos	H7N7
1979	Alemania	Pollos, gansos	H7N7
1979	Gran Bretaña, Reino Unido	Pavos	H7N7
1983 - 1985	Pennsylvania, EUA*	Pavos, pollos, gallina de Guinea	H5N2
1983	Irlanda	Pavos, pollos, patos	H5N8
1985	Victoria, Australia	Pollos	H7N7
1991	Gran Bretaña, Reino Unido	Pavos	H5N1
1992	Victoria, Australia	Pollos, patos	H7N3
1994	Queensland, Australia	Pollos	H7N3
1994 – 1995	México*	Pollos	H5N2
1994	Pakistán*	Pollos	H7N3
1997	Hong Kong, República Popular China	Pollos	H5N1
1997	New Wales del Sur, Australia	Pollos, emus	H7N4
1997 – 1998	Italia	Pollos	H5N2
1999 – 2000	Italia*	Múltiples	H7N1
2002	Chile	Pollos	H7N3
2003	Países Bajos*	Pollos	H7N7
2003	Bélgica	Pollos	H7N7
2003	Alemania	Pollos	H7N7
2003 – 2006	Asia, Europa y África*	Múltiples	H5N1
2004	Columbia Británica, Canadá*	Pollos	H7N3
2004	Texas, EUA	Pollos	H5N2
2004	Sudáfrica	Avestruces	H5N2
2005	Japón	Pollos	H5N2
2005	Zimbábue	Avestruces	H5N2
2006	Dinamarca	Aves de corral	H5
2006	Gran Bretaña, Reino Unido	Pollos	H7N3
2006	Sudáfrica	Avestruces	H5N2

*Brotos de mayor impacto económico según Harder y Werner

Tomado de: Alfonso, P. (2006). EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LA INFLUENZA AVIAR, 28(3), 137–146.

El subtipo H5N2 aviar fue detectado en cerdo por nuestro grupo de investigación en el laboratorio de investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos en el año 2014, y reportado a la autoridad sanitarias en el mes de diciembre del 2015, en donde se entregó el virus aislado junto con el llenado de los formatos oficiales (SIVE 01).

HISTORIA DEL VIRUS DE INFLUENZA EN HUMANOS Y PANDEMIAS A LO LARGO DEL TIEMPO

Las pandemias y epidemias surgen como resultado de cambios antigénicos de la HA, siendo la influenza A responsable de pandemias ocasionales, involucrando a millones de personas en todo el mundo y generando frecuentes epidemias anuales que suelen asociarse con una morbilidad y mortalidad considerable. Los brotes de la gripe B son menos frecuentes y se asocian con una menor carga de enfermedad en general y la influenza C está asociada con infecciones esporádicas y generalmente asintomáticas (Stephenson & Nicholson, 2001).

Los virus pandémicos requieren un pH más bajo para la fusión que hace la HA, por lo tanto las características de fusión de la HA representan una barrera de transmisión de aves a cerdos y de cerdos a humanos. Ejemplo de ello es la adaptación de un virus de influenza aviar que pasó a los cerdos en Europa en 1980, acompañado por mutaciones en la HA, reduciendo la estabilidad conformacional y aumentando el pH de la actividad de fusión de la membrana, lo que respalda la primer evidencia de alteración en la fusión durante la transmisión entre especies como un ajuste natural (Baumann, Kouassi, Foni, & Klenk, 2016).

El primer brote bien documentado que se ajusta a la descripción de una pandemia ocurrió en 1580, originado en Asia y diseminándose a través de Europa, África y América a lo largo de las rutas comerciales. En Asia se le dio el nombre de “enfermedad del viento” refiriéndose a la velocidad de propagación. Posteriormente, a intervalos de aproximadamente una a cuatro décadas, se han producido 31 pandemias de influenza: tres durante el siglo pasado en 1918-1919, 1957 y 1968. Durante el siglo XIX son seis las reportadas en 1800-1801, 1837, 1843, 1857, 1874 y en 1889-1892. Esta última fue conocida como la gripe rusa en Europa occidental, causando morbilidad extensa y una mortalidad general alta con aproximadamente 250,000 muertes en Europa debido a su rápida propagación comenzando en Bokara, Asia Central y viajando rápidamente a través de Rusia y Alemania y luego hacia Europa occidental a lo largo de las redes ferroviarias.

Las pandemias de influenza que han ocurrido durante el siglo XX con intervalos de 9 a 39 años comienzan con el virus H1N1 de la pandemia de 1918 – 1919 la cual fue de las más devastadoras, con 40 – 50 millones de muertes, con un estimado de 4.9 millones de muertes en exceso (Nicholson et al., 2003). La enfermedad recorrió América del Norte, Europa, Asia, África, Brasil y el Pacífico sur. Fue excepcionalmente grave, estimándose que un tercio de la población mundial estaba infectada. Las tasas de letalidad se calcularon en 2.5% en comparación con las epidemias de influenza anteriores que fueron estimadas en menos de 0.1% (Tognotti, 2009).

Después de la gripe española de 1918, hubo dos pandemias menos graves que comenzaron en Asia y se extendieron por todo el mundo. En 1957, un virus H2N2 apareció en China, fue llamada la gripe asiática. Rápidamente se diseminaron por

toda la población, reemplazando al virus H1N1 previamente circulante. De forma similar, en 1968, un virus H3N2 surgió en Hong Kong reemplazando al virus H2N2. En cuatro semanas se había extendido a Vietnam y Singapur. En septiembre de dicho año, el virus había llegado a Filipinas, India, el norte de Australia, el Reino Unido, Europa y los Estados Unidos de América (Tognotti, 2009).

En abril del 2009, emergió una nueva variante del virus de influenza H1N1 pandémica (pH1N1) siendo una triple recombinante, el cual contenía genes de origen aviar, porcino y humano, causando la primera pandemia del siglo XXI (Berhane *et al.*, 2010; Chao *et al.*, 2011; Morens, Taubenberger, & Fauci, 2010). Se reportó en México, Canadá, EUA, Guatemala, Argentina, Chile, Perú, Australia, Nueva Zelanda, UK, Holanda, Taiwán, Nepal y en otras partes del mundo (Chao *et al.*, 2011; Simonsen, Tamerius, & Miller, 2011; Xu *et al.*, 2009).

En varias ciudades se tomaron acciones inmediatas para mitigar los efectos clínicos y sociales provocados por el nuevo virus pandémico, que incluyó la vigilancia de probables casos de influenza pH1N1, detección de personas con fiebre en aeropuertos, confirmación de los casos probables por medio de pruebas de laboratorio, cuarentena y terapia antiviral (Chao *et al.*, 2011). Estudios demostraron la existencia de diferencias importantes en la sintomatología y semiología presente entre la influenza estacional y la pandémica, el rango de edad de los casos descritos fueron los jóvenes, un factor nuevo fue la obesidad y síntomas que antes no se había reportado como frecuentes ni asociados con la infección por influenza como diarrea y vómito (Simonsen *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2009).

Actualmente los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 circulan en la población humana a nivel mundial, así como subtipos emergentes aviarios como el H5N1 (Muñoz-medina *et al.*, 2015).

El virus H5N1 fue aislado en mayo de 1997, en Hong Kong, el cual no había sido previamente identificado en la población humana, este subtipo cumple con dos de los tres criterios que definen a un nuevo virus de influenza con carácter pandémico: el primero, es la habilidad para replicarse en las células humanas y el segundo, la ausencia de anticuerpos a este virus en la población humana. El tercer criterio es la suficiente transmisibilidad interhumana del virus para mantener brotes en la comunidad, lo cual no ha ocurrido hasta el momento (OPS, 2017).

Figura 4. Mapa de distribución de las pandemias y línea del tiempo

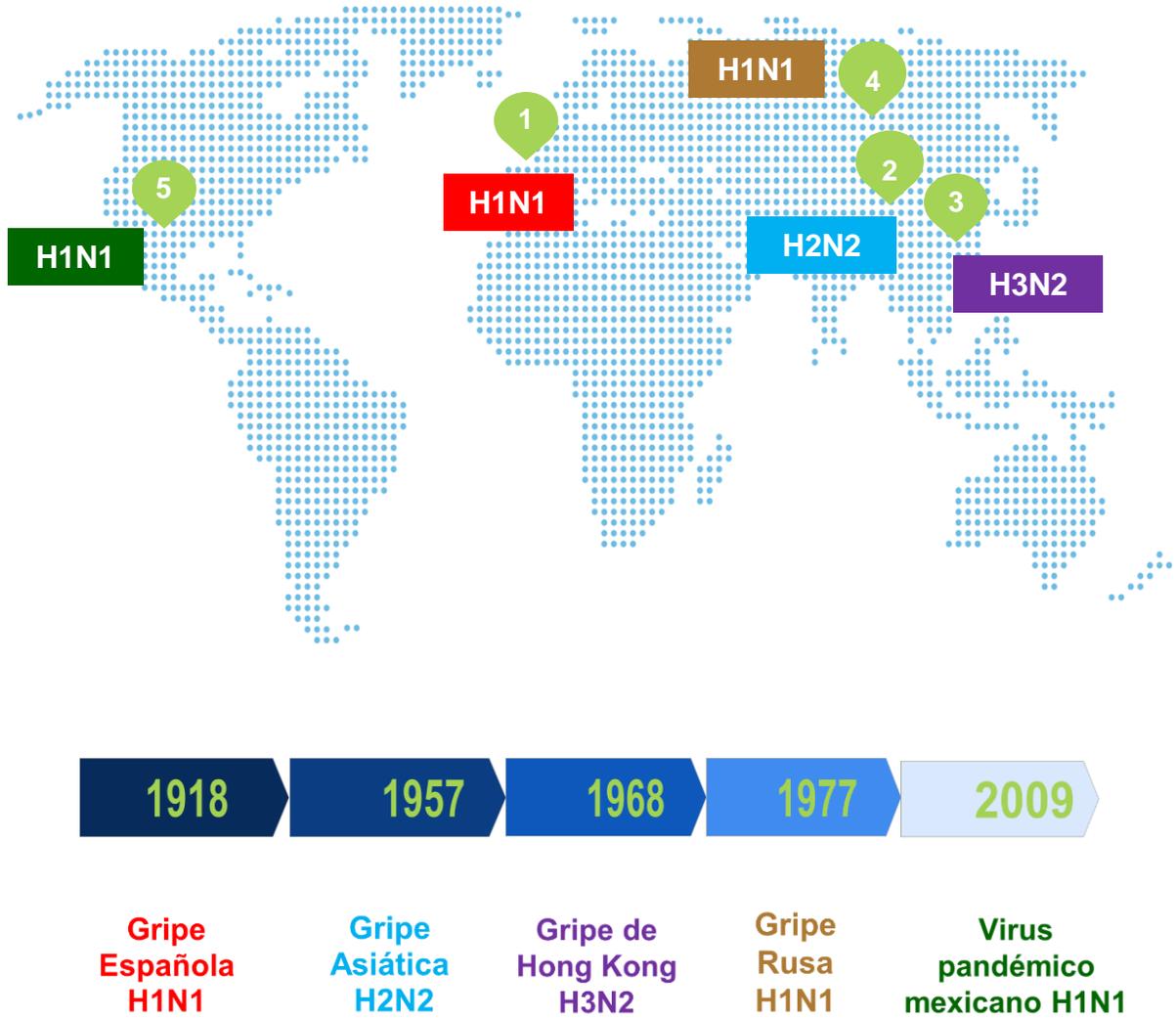
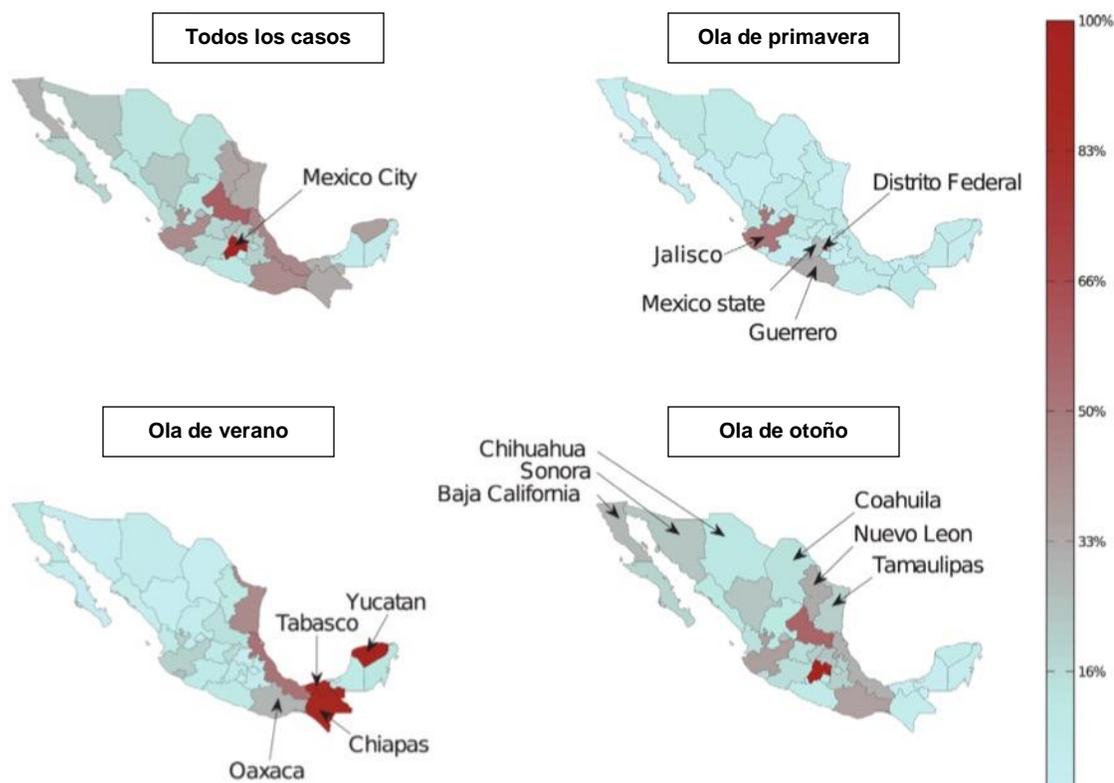


Figura 5. Mapas de casos de pandemia de A / H1N1 confirmado por estudios de laboratorio en México durante el periodo de abril-diciembre de 2009



La ola pandémica de primavera (del 1 de abril al 20 de mayo) se centró en la región central, incluyendo al Estado de México, Distrito Federal, Jalisco, Puebla, San Luis Potosí, Guerrero, Hidalgo y Tlaxcala. La ola pandémica de verano (del 21 de mayo al 1 de agosto) se concentró en los estados de Veracruz, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas, Oaxaca, Tabasco y Campeche. La ola pandémica de caída u otoño afectó a la región central y los estados del norte, Baja California Norte, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas. Para cada onda pandémica, la escala de color se estableció según el mayor número de casos entre los estados.

Tomado de: Simonsen, L., Tamerius, J., & Miller, M. A. (2011). Characterizing the Epidemiology of the 2009 Influenza A / H1N1 Pandemic in Mexico, 8(5).

SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DEL VIRUS DE INFLUENZA

La influenza aviar, la encefalopatía espongiforme bovina, la fiebre aftosa, la rabia y la peste bovina son enfermedades animales que han marcado la agenda zoonosanitaria internacional de los últimos años. Algunas de ellas siguen estando presentes en varias regiones del mundo, razón por la cual es necesario seguir

difundiendo información transparente y brindar un análisis científico de calidad (OIE, 2017).

En México la enfermedad causada por el virus de Influenza A aviar, en las aves, se encuentra dentro del grupo 1, considerada de notificación inmediata obligatoria con la excepción del subtipo H5N2 de baja patogenicidad. En el caso de los cerdos la enfermedad causada por el virus de Influenza A está considerada dentro del grupo 3, clasificada como una enfermedad enzoótica de menor riesgo y es de notificación obligatoria mensual (Rural & Alimentacion, 2007).

Subtipo H5N2

El subtipo H5N2 aviar fue aislado en México en mayo de 1994 en granjas comerciales de 11 entidades del país, principalmente en gallinas ponedoras de Puebla bajo un brote de baja patogenicidad, este virus mutó a influenza aviar de alta patogenicidad en diciembre de 1994, posteriormente en el año de 1995 se aisló en gallinas ponedoras en Querétaro y Tehuacán, Puebla bajo un brote de alta patogenicidad, causando graves daños a la avicultura de estos estados (SAGARPA – SENASICA, 2016).

Debido a la contingencia anterior, se publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, en el Diario Oficial de la Federación el 14 de agosto de 1995, instrumento que reglamentó las acciones técnico-administrativas de la operación de la campaña hasta el 21 de junio de 2011, fecha en la cual se emitió “Aviso de cancelación de la NOM-044-ZOO-1995, debido a que las condiciones de la industria avícola no correspondía a las que prevalecían en la fecha en que dicha norma se publicó (SAGARPA – SENASICA, 2016).

La campaña actualmente se realiza con fundamento en el Acuerdo por el que se da a conocer la campaña y las medidas zoonosanitarias que deben aplicarse para el diagnóstico, prevención, control y erradicación de la Influenza Aviar Notificable, en las zonas del territorio nacional en las que se encuentre presente la enfermedad (SAGARPA – SENASICA, 2016).

Cuadro 4. Situación sanitaria nacional del virus de influenza, subtipo H5N2 en los últimos tres años

SITUACIÓN SANITARIA	2015 H5N2	2016 H5N2	2017 H5N2
ESCASA PREVALENCIA	Aguascalientes Ciudad de México Coahuila Durango Guanajuato	Aguascalientes Ciudad de México Coahuila Durango Guanajuato	Aguascalientes Ciudad de México Coahuila Durango Guanajuato
LIBRE	Baja California Baja California Sur Campeche Colima Chiapas Chihuahua	Baja California Baja California Sur Campeche Colima Chiapas Chihuahua	Baja California Baja California Sur Campeche Colima Chiapas Chihuahua

Tomado de: SENASICA – SIVE, 2017.

Cuadro 5. Situación sanitaria nacional del virus de influenza, subtipo H7N3 en los últimos tres años

SITUACIÓN SANITARIA	2015 H7N3	2016 H7N3	2017 H7N3
BAJO ESQUEMA DE VACUNACIÓN	Aguascalientes Chiapas Coahuila Durango Guanajuato	Aguascalientes Chiapas Coahuila Durango Guanajuato	Aguascalientes Chiapas Coahuila Durango Guanajuato
LIBRE	Baja California Baja California Sur Campeche Ciudad de México Colima Chihuahua	Baja California Baja California Sur Campeche Ciudad de México Colima Chihuahua	Baja California Baja California Sur Campeche Ciudad de México Colima Chihuahua

Tomado de: SENASICA – SIVE, 2017.

Cuadro 6. Informes de la situación zoonosanitaria del Estado de México por ser el virus experimental de dicho lugar

ENFERMEDAD	2015	2016	2017
INFLUENZA AVIAR H5N2	ESCASA PREVALENCIA	ESCASA PREVALENCIA	ESCASA PREVALENCIA
INFLUENZA AVIAR H7N3	BAJO ESQUEMA DE VACUNACIÓN	BAJO ESQUEMA DE VACUNACIÓN	BAJO ESQUEMA DE VACUNACIÓN

Tomado de: SENASICA – SIVE, 2017.

CRUCE DE BARRERA INTERESPECIE O SALTO TAXONÓMICO

Los Influenzavirus A están entre los virus más desafiantes que amenazan la salud humana y animal. Estos virus son únicos en muchos aspectos, en primer lugar, son únicos en la diversidad de especies que infectan, desde aves acuáticas (el reservorio original), aves domésticas terrestres y acuáticas, cerdos, seres humanos, caballos, perros, gatos, ballenas, focas y otras especies de mamíferos. En segundo lugar, son únicos en su capacidad para evolucionar y adaptarse, tras atravesar la barrera de especies, con el fin de replicar y difundir a otros individuos de nuevas especies. Por último, son únicos en la frecuencia de los eventos de transmisión entre las especies que se presentan. Por lo que, las consecuencias de

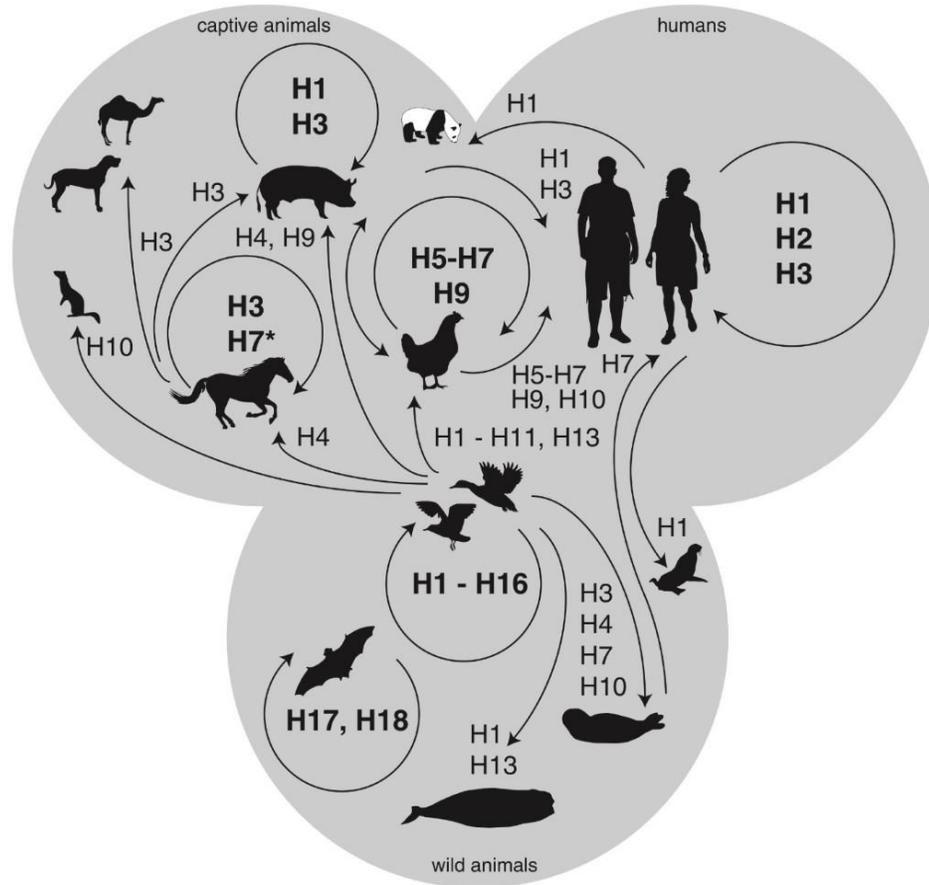
una nueva cepa del virus de influenza A en una población inmunológicamente no preparada puede ser devastadora. Esto representa problemas para la salud humana y animal, generando una carga económica y de enfermedad importante, tanto en la salud pública como en las producciones animales (Short *et al.*, 2015).

Los virus de influenza de las aves acuáticas pueden infectar a numerosas especies; un ejemplo de ello es la transmisión de aves silvestres a focas (*Phoca vitulina*), causando alta mortalidad en esta especie, tras la infección con el virus de baja patogenicidad aviar (LPAI) H10N7 en las aguas costeras de Europa del Norte (Zohari, Neimanis, Härkönen, Moraesus, & Valarcher, 2014), además de la infección prevalente en las costas de Nueva Inglaterra de los Estados Unidos de América con otros subtipos de baja patogenicidad como el H3, H4 y H7 ya mencionado en esta especie (Callan, Early, Kida, & H, 2017).

En cuanto a la transmisión de virus de LPAI de aves silvestres a animales domésticos, se encuentran los ejemplos de infección a aves domésticas, de igual manera a la población porcina, que ha sido infectada con subtipos H4 y H9 esporádicamente, mientras que los subtipos H1 y H3 son endémicos en esta población (Janke, 2014). Las infecciones porcinas son consideradas de especial importancia debido a que las células epiteliales respiratorias de estos individuos poseen los receptores celulares NeuAc-2,3Gal y NeuAc-2,6Gal (Graaf & Fouchier, 2014) por lo tanto los cerdos pueden ser infectados de forma natural o experimental con virus aviares y humanos. En general, los Influenzavirus humanos utilizan ácido siálico unidos al alfa2,6 como receptor, mientras que los virus aviares tienen predisposición por los enlaces alfa 2,3 (Graaf & Fouchier, 2014; Short *et al.*, 2015).

Figura 6. Reservorios y eventos de transmisión entre especies de virus de influenza aviar de baja patogenicidad

K.R. Short et al. / One Health 1 (2015) 1–13



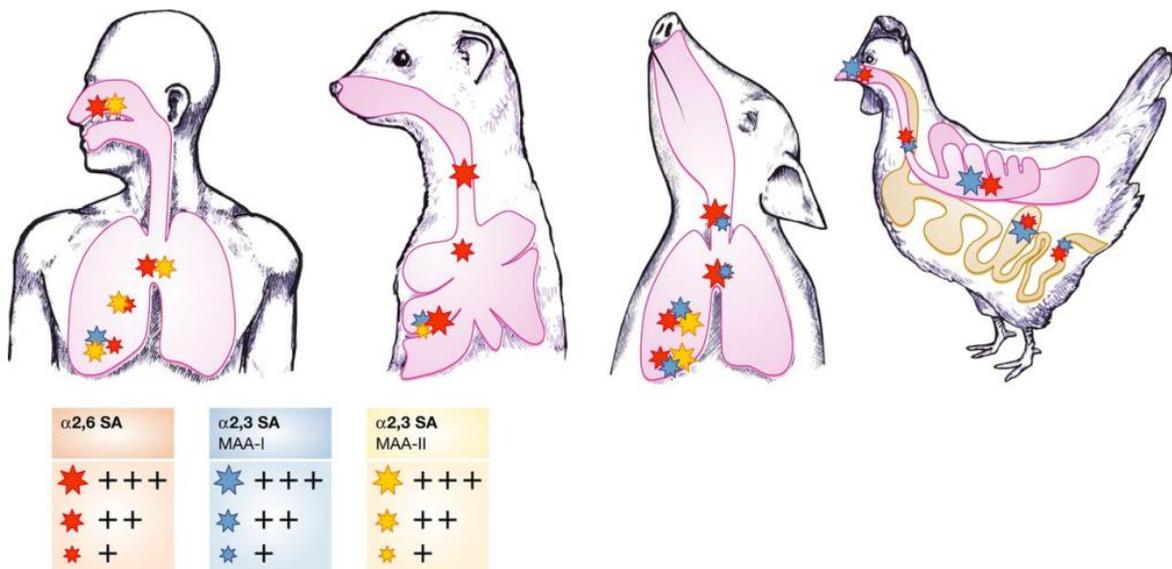
Tomada de: Short, K. R., Richard, M., Verhagen, J. H., Riel, D. Van, Schrauwen, E. J. A., Brand, J. M. A. Van Den, Herfst, S. (2015). One health, multiple challenges : The inter-species transmission of influenza A virus. ONEHLT, 1, 1–13.

RECEPTORES CELULARES

Existen dos tipos de receptores celulares por los cuales el virus de influenza A tiene tropismo, el ácido siálico $\alpha 2,3$ -galactosa (SAa2,3-Gal) y el ácido siálico $\alpha 2,6$ -galactosa (SAa2,6-Gal). Los virus aviarios tienen predilección por los receptores de tipo SAa2,3-Gal, mientras que los virus humanos por el SAa2,6-Gal. Los cerdos poseen ambos receptores lo cual permite que puedan ser infectados de forma

natural o experimental con virus de origen aviar y humano (Graaf & Fouchier, 2014); por esta razón son considerados una especie mezcladora. Sin embargo estudios recientes han demostrado que los cerdos no son la única especie que presenta ambos receptores, un ejemplo de ello los humanos, además la distribución es de forma similar (Trebbien, Larsen, & Viuff, 2011).

Figura 7. Receptores celulares



Tomada de: Graaf, M. De, & Fouchier, R. A. M. (2014). Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis, 33(8), 823–841.

SUBTIPOS AVIARES AISLADOS EN CERDOS

H9N2

El subtipo H9N2 fue aislado en China en el año de 1992 en aves de producción en la provincia de Guangdong (Chen *et al.*, 1994). Este virus causa una importante morbilidad y mortalidad en cerdos, por lo que lo vuelve un miembro notable de los Influenzavirus A, debido a que no solo puede infectar a pollos, patos y cerdos, sino también al humano (Yu, Hua, Wei, & Zhou, 2008). Fueron descritos cinco

aislamientos virales en el que los genes de la NP de H9N2 están estrechamente relacionados con el virus H5N1, estos resultados indican que los virus H9N2 son resultado de la recombinación entre H9 y H5 (Cong *et al.*, 2017). En un análisis filogenético de los genes internos se mostró que los virus H9N2 están estrechamente relacionados con los subtipos H3, H4, H5, H7, H10 y H14, lo cual indica que los virus han sufrido reordenamientos generando múltiples genotipos circulantes en todo el mundo en diversos huéspedes (Dong *et al.*, 2011). Un estudio realizado en Shandong, China en mayo del 2013 a abril del 2014 reveló la infección en la población porcina y humana en esta región, debido a la cercanía de aves silvestres que se alimentan con los desechos de las producciones porcinas de dicho lugar (Li *et al.*, 2015).

H4N6

En 1999 el subtipo H4N6 aviar cruzó la barrera de especies para infectar a cerdos en Canadá (Olsen, 2015). En octubre de dicho año se aisló el virus H4N6 de cerdos de una granja comercial que presentaban neumonía. Los análisis filogenéticos de las secuencias de los ocho segmentos de RNA viral demostraron que se trataba de un Influenzavirus aviar de linaje norteamericano, siendo el primer informe de transmisión entre especies de un virus H4 a los cerdos domésticos en condiciones naturales (Karasin, Brown, Carman, & Olsen, 2000). El examen serológico de seguimiento demostró que este virus se propagó a otras unidades a partir de la original, lo que sugiere que tiene la capacidad de propagación de cerdo a cerdo, menciona Olsen y colaboradores. Este virus tiene un alto nivel de diseminación, ya que ha sido aislado de agua de los lagos canadienses donde las aves acuáticas (patos principalmente) se congregan en

preparación para la migración hacia el sur cada otoño, encontrándose en estas poblaciones de manera común las glicoproteínas H4 y/o N6 (Olsen, 2015).

H3N3

En un estudio realizado en cerdos canadienses en 2001 y 2002 se reveló el aislamiento del subtipo H3N3, los análisis filogenéticos relacionaron a este virus con los virus de aves acuáticas, siendo antigénicamente diferente a los virus de influenza porcina de referencia en las poblaciones de Norteamérica (Karasin, West, Carman, & Olsen, 2004).

H2N3

En 2006 fue reportado el aislamiento y caracterización de un Influenzavirus A H3N2 en cerdos con enfermedad respiratoria, de dos granjas en los Estados Unidos de América, un subtipo no reportado en cerdos. Este virus recombinante H2N3 contiene genes derivados de los virus de la gripe aviar y porcina. Ma *et al.*, también investigaron la transmisión y patogenicidad de los aislamientos de H2N3 en diferentes huéspedes mamíferos y encontraron que el virus fue capaz de replicar en cerdos, ratones y hurones además de transmitirse entre los cerdos y hurones (Ma *et al.*, 2007).

H5N2

A principios de 2008, Lee *et al.*, reportaron dos virus H5N2 que fueron aislados de cerdos en Corea. La secuenciación y el análisis filogenético de las proteínas de superficie revelaron que los virus Sw/Korea/C12/08 y Sw/Korea/C13/08 se derivaron de Influenzavirus aviares del linaje Eurasiático. Sin embargo, el aislamiento Sw/Korea/C12/08 es un virus totalmente aviar, mientras que el aislamiento Sw/Korea/C13/08 es un virus reordenado con genes aviares y

porcinos PB2, PA, NP y M procedentes de un virus similar al H3N1 de la especie porcina de 2006. La caracterización molecular de los dos virus indicó una ausencia de mutaciones significativas que podrían estar asociadas con virulencia o la afinidad de unión al receptor. Por otra parte, los experimentos con animales mostraron que el virus Sw/Korea/C13/08 estaba más adaptado al cerdo y se transmitió más fácilmente en este modelo experimental, en comparación con el virus Sw/Korea/C12/08 aviar. Además, la seroprevalencia en sueros porcinos de 2006 a 2008 sugirió que los virus H5 aviares han estado infectando a los cerdos desde 2006 (Lee *et al.*, 2009).

INFLUENZA EN CERDOS

La enfermedad tiene un periodo de incubación de 1-3 días. La morbilidad es alta, llegando hasta el 100%, pero de baja mortalidad, menor al 1% sin complicaciones por infecciones secundarias (Reeth *et al.*, 2009). La enfermedad dura aproximadamente una semana sin infecciones secundarias bacterianas, afectando a cerdos de todas las edades (Trigo, 2015). Y la afección clínica está generada por los subtipos endémicos H1N1, H1N2 y el H3N2.

Los virus infectan las células epiteliales que recubren la superficie del tracto respiratorio, induciendo una bronquitis necrotizante prominente, bronquiolitis y neumonía intersticial variable. La muerte celular se debe a la infección del virus y a la respuesta por leucocitos y citocinas del sistema inmune innato. Los virus más virulentos expresan consistentemente las siguientes características de infección: replicación viral más alta o más prolongada, inducción excesiva de citocinas y replicación en la parte caudal del tracto respiratorio (Janke, 2014).

La infección será clínica o subclínica de acuerdo a la producción de citocinas por parte del sistema inmune del cerdo infectado en la fase aguda de la enfermedad (Plonait, Bickhardatt, 2001; Straw *et al.*, 2002).

La respuesta inmune se inicia con la interacción del virus con el sistema inmune mediante la fusión de membranas, el sistema inmune innato es la primer respuesta activada una vez que el virus de influenza entra al huésped, comienza la secreción de citocinas, quimiocinas como parte de la respuesta inmune inflamatoria, atrayendo neutrófilos al sitio de infección, como fase temprana de esta, posteriormente aparecen macrófagos y linfocitos (48 h pos infección) (Janke, 2014).

La citocina que representa el mecanismo más efectivo contra la propagación y replicación del virus del sistema inmune innato es el interferón tipo I, induciendo la activación de las células dendríticas comenzando con la respuesta inmune adaptativa (Janke, 2014).

En cuanto a la inmunidad de tipo humoral, la actividad de los anticuerpos neutralizantes va dirigida a la hemoaglutinina, provocando que no exista unión de anticuerpos deben unirse a los determinantes antigénicos alrededor del sitio de unión de la HA (Tsukamoto, Hiroi, Adachi, & Kato, 2011).

La transmisión del virus puede darse de manera directa, por medio de aerosoles o contacto directo entre animales portadores y susceptibles, la alta densidad poblacional de las producciones favorece este tipo de transmisión. La transmisión indirecta está dada por medio de fómites entre zona y zona, producción y producción y área y área (Plonait, Bickhardatt, 2001; Straw *et al.*, 2002).

La semiología clínica en los brotes por el virus de influenza se caracteriza típicamente por fiebre muy alta (40.5-41.5°C), anorexia, depresión, postración, taquipnea, disnea, respiración abdominal, tos, estornudos, secreción serosa oculonasal y los animales se amontonan, en la infección por el subtipo H3N2 se presenta diarrea (Plonait, Bickhardt; 2001; Straw *et al.*, 2002; Zimmerman *et al.*, 2012).

El desarrollo clínico de la enfermedad se puede ver afectado por varios factores a parte del sistema inmune, como la edad, condiciones ambientales, así como infecciones en curso o infecciones secundarias bacterianas por: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus* tipo 2, pudiendo agudizar o complicar tanto el tiempo como la gravedad de la enfermedad (Sánchez *et al.*, 2010; Straw *et al.*, 2002).

Las lesiones macroscópicas consisten en congestión traqueal y bronquial, así como en una bronquitis catarral, que puede producir colapso pulmonar. Las zonas de colapso se localizan en la porción craneoventral pulmonar. En casos graves se observa además edema y congestión pulmonar difusa, así como pleuritis serofibrinosa (Tigo, 2015).

En las lesiones microscópicas se observa necrosis de las células epiteliales bronquiolares y alveolares, lo cual se complica con la llegada de neutrófilos y edema, que producen bronquitis y bronquiolitis. Con el paso del tiempo el exudado lo constituyen principalmente células mononucleares, con macrófagos en el espacio alveolar y linfocitos en el intersticial. Cuando la infección viral termina, el

epitelio bronquioalveolar se regenera con facilidad (Trigo, 2015; Straw *et al.*, 2002).

A menudo las lesiones virales son enmascaradas por una neumonía exudativa grave, debido a infección bacteriana secundaria. Las cerdas gestantes pueden abortar a causa de la infección viral (Trigo, 2015).

Figura 8. Lesiones macroscópicas y microscópicas en pulmón, producidas por el virus de influenza

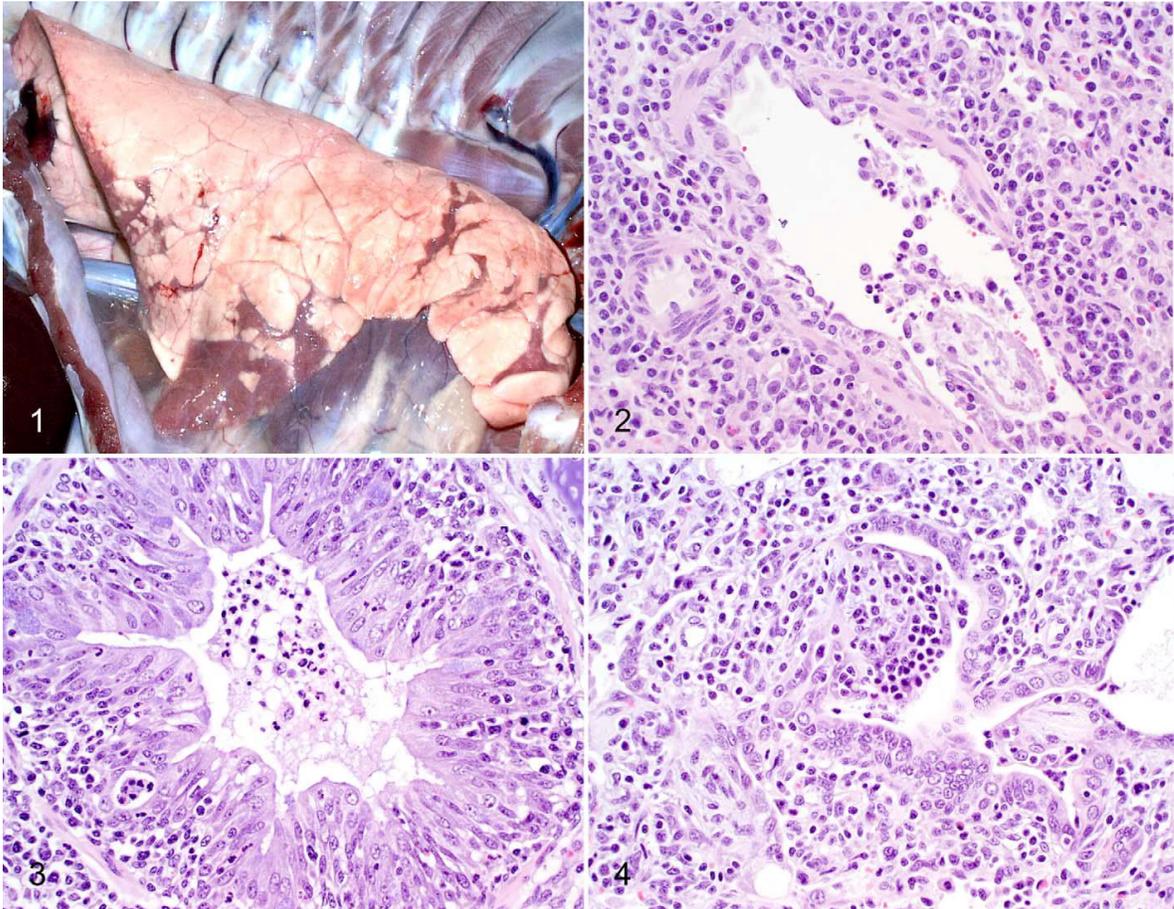


Figura 1. Pulmón insitu, de cerdo de 4 semanas de edad, 5 días después de la inoculación intratraqueal experimental con virus de influenza H3N2 triple reordenante. Es evidente la consolidación lobular multifocal en los lóbulos del pulmón medio y craneal. Figura 2. Pulmón de cerdo de un caso de campo. La fase aguda del virus de influenza se caracteriza por necrosis y desprendimiento de células epiteliales bronquiolares y aplanamiento de las células restantes que recubren las vías respiratorias. El lumen contiene racimos de neutrófilos y células epiteliales desprendidas, la infiltración de linfocitos peribronquial es evidente, teñido con Hematoxilina y Eosina. Figura 3. Pulmón de cerdo de un caso de campo. La fase subaguda de la infección por el virus de influenza se caracteriza por un epitelio hiperplásico irregular. El lumen contiene moco, algunos neutrófilos, macrófagos y trans migración de la capa epitelial por linfocitos. Algunos grupos de neutrófilos pueden ser evidentes. Teñido con Hematoxilina y Eosina. Figura 4. Pulmón de cerdo de un caso de campo. Un bronquiolo pequeño es interrumpido por un pólipo endobronquiolar (bronquitis obliterante), una secuencia observada a veces después de la infección severa con el virus de influenza. Teñido con Hematoxilina y Eosina.

Tomado de: Janke, B. H. (2014). Influenza A Virus Infections in Swine: Pathogenesis and Diagnosis, 51(2), 410–426.

INFLUENZA EN AVES

La influenza aviar es una enfermedad altamente contagiosa que afecta a varias especies de aves de producción (pollos, pavos, codornices, etc.), así como a aves de compañía y aves silvestres (OIE, 2017). Está dividida en influenza aviar de alta patogenicidad (HPAI) y en influenza aviar de baja patogenicidad (LPAI), los subtipos H5 y H7 incluyen la mayoría de las cepas patógenas actuales (Escorcía *et al.*, 2010; Short *et al.*, 2015).

La enfermedad tiene un periodo de incubación que varía generalmente entre 3 a 7 días dependiendo del aislamiento, especie aviar, edad, estado fisiológico, entre otros. La morbilidad es alta, llegando al 100% y la mortalidad es variable, dependiendo de la cepa viral y su grado de patogenicidad, en virus altamente patógenos puede ser devastadora (Short *et al.*, 2015; Fenner's, 2011).

La transmisión está dada de forma horizontal por transferencia de secreciones respiratorias por medio de aerosoles generada al estornudar, o de la materia fecal de aves domésticas o silvestres, donde el virus permanece largo tiempo en depósitos acuáticos, el virus se introduce a las parvadas susceptibles entre especies aviarias, domésticas y silvestres (Short *et al.*, 2015; Fenner's, 2011).

La semiología clínica observada en las aves infectadas por virus de HPAI se caracteriza por causar muerte súbita sin signos clínicos prodrómicos. Si las aves sobreviven durante más de 48 horas (esto se presenta en aves de mayor edad), hay un cese de la puesta de huevo, anorexia, depresión, secreción ocular, sinusitis, disnea, diarrea, cianosis de la punta de la cresta y barbilla, edema de la cabeza, cresta y cuello. Las aves pueden mostrar también, signos nerviosos como

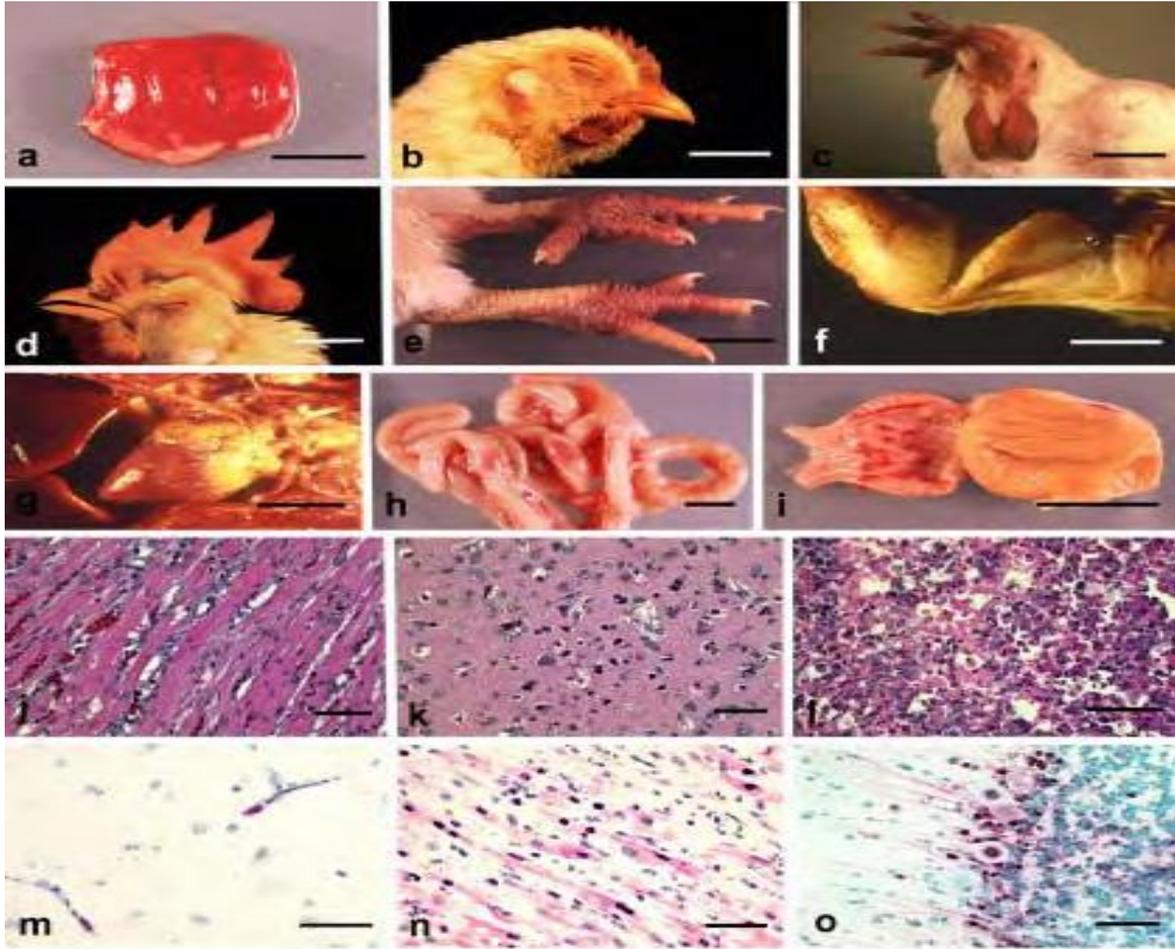
tremores de la cabeza y el cuello, incapacidad de pararse, tortícolis, ataxia y otras posturas inusuales (Fenner's, 2011).

La diarrea al principio es acuosa, de color verde brillante, modificándose a casi totalmente blanca. Las aves mueren de 1 a 2 días, en el 90% de los casos y pueden prolongarse hasta una semana. En ocasiones algunas aves gravemente afectadas logran recuperarse (OIE, 2017).

Los virus de LPAI pueden o no causar signos clínicos, pero también pueden causar pérdidas considerables, particularmente en pavos, debido a anorexia, depresión, disminución de la producción de huevos, enfermedades respiratorias y sinusitis, estos signos clínicos tanto en pollos y pavos pueden ser exacerbados marcadamente por infecciones concurrentes, por ejemplo, otras infecciones virales, bacterianas o por micoplasmas, al igual que por factores ambientales como, ventilación insuficiente y hacinamiento (Fenner's, 2011).

Las lesiones macroscópicas se presentan con edema, congestión y hemorragia en pulmones, hemorragias viscerales, aerosaculitis, traqueítis y rinitis, en las infecciones más severas, además de lo anterior, hay hemorragia en proventrículo, particularmente en la unión con el ventrículo, hemorragia y degeneración de los ovarios, congestión renal severa y focos hemorrágicos en los tejidos linfoides de la mucosa intestinal. Puede haber hemorragias difusas en zonas amplias de los tarsos. Posible muerte súbita en pollos jóvenes y las lesiones pueden estar ausentes. Los huevos puestos después de iniciado un brote, son con frecuencia sin cascarón. De manera microscópica se observa miocarditis no supurativa, focos de necrosis en neuronas y células pancreáticas (Agentino & Revisi, 2004; OIE, 2017).

Figura 9. Lesiones macroscópicas (a-i), cambios histopatológicos (j-l) e inmunohistoquímicos en aves experimentalmente infectadas con HPAI.



a) Severa hemorragia y edema en el pulmón (Barra = 1cm), **b)** Severa hinchazón de cabeza, cresta y barbillones por edema subcutáneo (Barra = 2cm), **c)** Severo edema, necrosis y hemorragia de la cresta y barbillones (Barra = 5cm), **d)** Severa conjuntivitis con edema de cresta, barbillones y área periorbital y necrosis de las puntas de la cresta (Barra = 2cm), **e)** Severas hemorragias subcutáneas y edema de dedos y cañas (Barra = 2cm), **f)** Engrosamiento de dermis por edema de la pata (Barra = 2cm), **g)** Petequias en la grasa del epicardio (Barra = 3cm), **h)** Hemorragias en tejidos linfoides de placas de Peyer y el divertículo de Meckel del yeyuno (Barra = 1cm), **i)** Hemorragia subcutánea rodeando conductos y glándulas en proventrículo (Barra = 2cm), **j)** Miocarditis no supurativa con necrosis de miocitos individuales (Barra = 50um), **k)** Focos de necrosis de neuronas en el cerebro (Barra = 50um), **l)** Severa necrosis aguda de acinos de glándulas del páncreas (Barra = 50um), **m)** Antígeno viral de IA en el citoplasma y núcleo de células endoteliales en el cerebelo (Barra = 30um), **n)** Antígeno viral de IA en el citoplasma y núcleo de miocitos cardíacos (Barra = 25um), **o)** Antígeno viral de IA en el citoplasma y núcleo de células de Purkinje, células gliales de Bergmann y células granulares del cerebelo (Barra = 50um).

Tomado de: Argentino, S., & Revisi, C. D. E. (2004). INFLUENZA AVIAR Buscaglia, C., (6).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clínico en cerdos puede ser difícil de diferenciar de otro tipo de enfermedad respiratoria, debido a que los signos clínicos de la enfermedad no se asocian a un subtipo de influenza en particular, por ello la subtipificación del virus debe ser determinada mediante pruebas específicas de laboratorio (García *et al.*, 1999). En el caso de las aves el diagnóstico clínico puede sugerir infección por HPAI en la parvada donde hay muertes súbitas (alcanzando hasta el 100%), seguida de los signos clínicos ya mencionados, sin embargo existen otras enfermedades con las que se debe hacer diagnóstico diferencial, por ello las pruebas de laboratorio se vuelven de gran relevancia (Rural & Alimentación, 2007).

Dentro de las pruebas realizadas en el laboratorio, se encuentran las siguientes:

- Aislamiento viral

El aislamiento viral es considerado la prueba estándar para el diagnóstico del virus de influenza, pero es tardado y costoso. Este puede realizarse en embrión de pollo libres de patógenos específicos (SPF) de 9 a 11 días de edad, inoculados por la vía cavidad alantoidea, incubados a 35 ± 2 °C por 72 horas. Generalmente el virus no mata a los embriones, después del tiempo de incubación se colecta el líquido alantoideo para evaluar su capacidad de aglutinar eritrocitos de ave, siendo evidencia presuntiva de la presencia del virus de influenza. Se confirma el subtipo mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (Del castillo, 2010; Gaitán, 2016). El aislamiento viral también puede realizarse en cultivos celulares, como la línea Madin-Darvy Canine Kidney (MDCK) (Lin, Kappes, Chen, Lin, & Wang, 2017).

- Histopatología

Los órganos lesionados son conservados en formol o incluidos en parafina para su posterior procesamiento e identificación de lesiones macro y microscópicas. El virus también puede ser identificado por medio de Inmunohistoquímica basados en anticuerpos monoclonales y policlonales, teniendo tejidos fijados en formol o incluidos en parafina (Cheung & Poon, 2007).

- Pruebas serológicas

Basadas en la detección de anticuerpos presentes en el suero.

- Inhibición de la hemoaglutinación (IH)

La prueba de IH se basa en la unión de anticuerpos específicos a la hemoaglutinina del virus, basándose en la capacidad del virus para hemoaglutinar eritrocitos de ave, bovino o cuyo (esto dependerá del virus de interés), resultando en inhibición de la hemoaglutinación, es una prueba altamente sensible, específica, simple y rápida (Del Castillo, 2010). Es considerada la prueba estándar para la OIE.

Hay dos métodos para ejecutar la prueba, en uno se realizan diluciones decrecientes de virus y se enfrentan a cantidades constantes de suero (método alfa) y en el otro se realizan diluciones decrecientes del suero y se enfrentan a cantidades constantes de virus (método beta), es comúnmente el más utilizado (Del Castillo, 2010).

- ELISA

Las técnicas inmunoenzimáticas forman parte de aquellas reacciones serológicas de unión primaria que utilizan conjugados. Esta prueba se basa en la detección de anticuerpos específicos. La ELISA de tipo indirecta es la más común, en esta

variante se busca la identificación de anticuerpos contra un antígeno conocido empleando una segunda reacción antígeno-anticuerpo con una antiglobulina contra los anticuerpos de la especie animal en estudio (Cobos, 2005). Esta técnica se realiza de la siguiente manera: fijación del antígeno conocido a una microplaca, se añade suero y si los anticuerpos específicos frente al antígeno están presentes en el suero, reaccionarán con el antígeno y quedarán fijados a la microplaca. Posteriormente se añade un anticuerpo conjugado con una enzima frente a inmunoglobulinas y se incorpora un sustrato para la enzima. Si el suero contiene anticuerpos específicos se observa una reacción de color; si no, los pocillos permanecen sin color, estos resultados son leídos mediante un espectrofotómetro, dichas lecturas pueden ser utilizadas para calcular un coeficiente que va a indicar una positividad, estableciendo un rango de muestras positivas y negativas (Gaitán, 2016).

Existen otras variantes de ELISA como la ELISA directa, ELISA SANDWICH o puente de anticuerpos, ELISA competitiva, sin embargo, la más utilizada es la ELISA de tipo indirecta (Cobos, 2005).

- Inmunofluorescencia indirecta (ID)

Esta prueba está basada en una reacción antígeno- anticuerpo, utilizando un anticuerpo antiglobulina marcado con fluorocromo se evidencia la reacción y por ende el resultado. La técnica permite la titulación de los anticuerpos. Existe también la Inmunofluorescencia directa, la cual detecta la presencia directa del antígeno, los anticuerpos marcados con isotiocinato de fluoresceína identifican al antígeno específico presente; ambas resultan ser rápidas y específicas, pero

comparadas con las técnicas moleculares como lo es PCR en tiempo real resultan no ser las de primer elección por su baja sensibilidad (Pianciola *et al.*, 2010).

- Pruebas moleculares

Basadas en la detección de un segmento específico de DNA o RNA viral.

- RT-PCR

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR O qPCR) es una técnica sensible, rápida y específica, está basada en la PCR convencional, pero con la ventaja de poder monitorear la cuantificación del DNA usando técnicas de fluorescencia; esto permite la cuantificación de ácidos nucleicos con gran exactitud y confiabilidad. El gráfico que muestra el equipo mientras se realiza la PCR permite identificar una línea horizontal llamada umbral, que al ser cruzado por la muestra indica la positividad de la misma (Cross threshold o Ct point). Entre más bajo sea el valor Ct de una muestra, mayor es la cantidad de copias genómicas presentes en la muestra (Alcántar *et al.*, 2010).

Para entender el fundamento de la técnica PCR en tiempo real se debe tener muy claro el fundamento de la técnica convencional cuyo propósito es copiar millones de veces una secuencia específica de un DNA blanco por una catálisis llevada a cabo por una enzima llamada DNA polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de DNA pueden ser sintetizadas y copiadas de forma fiel. Si en lugar de utilizar como sustrato DNA de tipo genómico se utiliza DNAc (DNA complementario), el cual proviene de un RNA se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription PCR). La transcriptasa reversa se lee como DNAc, una vez obtenido este, se realiza PCR punto final de forma convencional o PCR en tiempo real (Gaitán, 2016).

En la técnica de PCR ocurren tres etapas importantes:

- ° Desnaturalización
- ° Hibridación
- ° Extensión

PREVENCIÓN Y CONTROL

La vacunación representa el pilar de la prevención contra el virus de influenza. Los anticuerpos van dirigidos contra las glicoproteínas hemoaglutinina y neuraminidasa generando protección contra la infección y mejora de la enfermedad (Stephenson & Nicholson, 2001). Sin embargo la creación de vacunas se complica por la constante generación de nuevos virus debido a los mecanismos genéticos de este.

En todo el mundo, se han adoptado medidas de vigilancia para detectar la presencia de la infección en las aves conforme a las normas de la OIE para la vigilancia de la influenza, principalmente la aviar (Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE). Existen también programas de seguimiento y control de la ocurrencia, prevalencia y caracterización de los virus de influenza aviar hallados en aves silvestres, donde se toman en cuenta las diferentes rutas migratorias y, en particular, en los puntos donde se reúnen las aves migratorias de diferentes continentes (OIE, 2017).

Es esencial que tanto los productores avícolas como los porcicultores mantengan prácticas de bioseguridad a fin de prevenir la introducción del virus de influenza en sus producciones (OIE, 2017). Dentro de las medidas que se recomiendan implementar en granja están las siguientes: mantener a los animales de

producción fuera de áreas frecuentadas por aves silvestres, controlar el acceso del personal y de los equipos, tener buenas prácticas de manejo con los animales y las instalaciones (principalmente sanitarias), evitar la introducción de animales de estatus sanitario desconocido a la población de animales en producción, declarar los casos de enfermedad y muerte de los animales así como eliminar de manera adecuada los residuos y cadáveres.

En el caso de las aves si se detecta la enfermedad, por lo general se aplicará una política de “sacrificio sanitario” para erradicarla, incluyendo las siguientes medidas: destrucción sin crueldad de todos los animales infectados y expuestos, eliminación adecuada de los cadáveres y de todos los productos animales, vigilancia y rastreo de aves potencialmente infectadas o expuestas, estricta cuarentena y controles de desplazamiento de las aves y de los vehículos con riesgo, descontaminación completa de los establecimientos contaminados, observación de un periodo de al menos 21 días antes de la repoblación (Código Sanitario para los Animales Terrestres) (OIE, 2017).

El sacrificio sanitario puede complementarse con un plan de vacunación, sobre todo en zonas de alto riesgo. Las estrategias de vacunación pueden ser eficaces como medidas de emergencia ante un foco o como medida de rutina en una zona endémica (OIE, 2017).

ANTIVIRALES

Los fármacos antivirales contra el virus de influenza son un complemento de la vacunación, más no un sustituto. Existen dos clases de antivirales aprobados para su uso en muchos países contra la gripe: los adamantanos o inhibidores de la

proteína M2 o del canal iónico como la amantadina y la rimantadina. El otro grupo lo forman los inhibidores de la neuraminidasa como el oseltamivir, zanamivir y peramivir (Guidelines, Management, Influenza, Viruses, & February, 2010). El aumento repentino en el consumo de los fármacos antivirales después de su aprobación ha generado resistencias por todo el mundo disminuyendo su eficacia, siendo cuestionada en pacientes con neumonías gripales graves, debido a que su capacidad para reducir la carga viral en las primeras 48 horas, después de su administración es insuficiente, por lo que actualmente hay un gran interés en nuevas estrategias antivirales (Reina, 2017).

Amantadina

El mecanismo de acción del fármaco amantadina es inhibir la proteína M2, es eficaz para la prevención de la influenza A, pero no para el tipo B y C. Su uso por periodos prolongados ha generado resistencias (Britain, 2017; Saito, Oshitani, Masuda, & Suzuki, 2002). Se ha demostrado que la resistencia a la amantadina se transfiere genéticamente, debido a las mutaciones en los genes que codifican para los aminoácidos constituyentes del dominio transmembrana de la proteína M2. Las mutaciones ocurren en las posiciones 26, 27, 30 y 31, siendo esta última la más frecuente (Bai, Chittaganpitch, Kanai, Li, & Auwanit, 2009; Britain, 2017; Saito *et al.*, 2002).

Oseltamivir

El Oseltamivir al igual que el Zanamivir y el Peramivir son fármacos inhibidores de la NA, activos en infecciones de influenza A y B (Jia *et al.*, 2010). El Oseltamivir fue introducido en la práctica clínica entre los años 1999 y 2002, posterior a esto se confirió resistencia hacia el fármaco debido a la sustitución de la histidina por

tirosina en la posición 274 en el gen de la NA, llamada mutación H274Y (Monto *et al.*, 2006).

En la actualidad existen muchos antivirales para la influenza que están bajo investigación y en ensayos clínicos, difieren en su mecanismo de acción en comparación con los fármacos actualmente autorizados para el tratamiento de influenza. El Nitazoxanide (NTZ, compuesto de la clase de tiazolida de espectro amplio antivirulento) y DAS181 (también conocido como “fludase”, sialidasa recombinante, que elimina receptores de ácido siálico) alteran la capacidad del virus de replicarse eficientemente, mientras que los fármacos de moléculas pequeñas como lo son el T705 (conocido como “favipiravir”, derivado de pirazina inhibe la replicación de un nuevo virus RNA), JNJ63623872 (antes conocido como VX-787, inhibe la subunidad PB2) y S-033188 (conocido como S-033447, es un profármaco que se metaboliza en una forma activa, inhibiendo a CAP-dependiente de endonucleasa) se unen al complejo de polimerasa viral y restringen la replicación viral. Por otro lado también se cuenta con los anticuerpos monoclonales que se dirigen a cierta región de la hemoaglutinina (Koszalka, Tilmanis, & Hurt, 2017).

JUSTIFICACIÓN

Los virus aviares que infectan al cerdo han sido reportados con presencia de cuadros subclínicos, sin embargo, este subtipo H5N2 no se había reportado en esta especie, por tal motivo es muy importante conocer su comportamiento clínico y su virulencia en una nueva especie afectada.

HIPÓTESIS

Al ser la influenza una enfermedad viral que afecta a una gran variedad de especies, así como a la alta capacidad de recombinación de los virus de influenza tipo A, el virus de influenza H5N2 tiene la capacidad de infectar, causar un cuadro clínico a los cerdos y excretarse por vía oronasal como los subtipos H1N1 y H3N2 endémicos en la población porcina nivel mundial.

OBJETIVO GENERAL

- Identificar si el subtipo H5N2 aviar es capaz de replicarse y generar un cuadro clínico en cerdos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir el cuadro clínico generado por el subtipo H5N2.
- Identificar las lesiones por histopatología en diferentes órganos.
- Identificar si el virus genera una infección y una respuesta inmune de tipo humoral ante el desafío experimental de cerdos.
- Identificar la carga viral excretada a lo largo del experimento.
- Aislar el virus de diferentes órganos.

MATERIAL Y MÉTODOS

VIRUS

Se cuenta con el aislamiento viral del subtipo H5N2 procedente de dos pulmones de cerdos del Estado de México y reportado a las autoridades sanitarias en el formato SIVE 01 de acuerdo a la reglamentación sanitaria, con la identificación A/Swine/México/EdoMex/DMZC03/2015/H5N2.

ORIGEN DE LOS ANIMALES

Se utilizaron diez cerdos de 21 días de edad, procedentes del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), Jilotepec, los cuales fueron divididos en 5 cerdos del grupo experimental infectado, dos cerdos control negativo, no infectados y 3 cerdos del grupo desafiado o centinelas. Se vacuna a las madres de los cerdos en estudio contra: Influenza, Rinitis atrófica y Triple (*Leptospira*, *Erisipela* y parvovirus) entre los días 140 y 200 de edad, con intervalos mínimos de 21 días y posteriormente al estar en producción cada 6 meses se les aplica la vacuna contra influenza y cada 4 meses la vacuna triple.

MUESTREO

Toma de muestras sanguíneas, hisopado nasal y temperatura así como observación de signos clínicos de los 10 cerdos tomándolo como el muestreo del día cero para corroborar que se encontraban libres de enfermedad. Se les dio un periodo de adaptación y descanso de 3 días.

Una vez desafiados se tomaron muestras sanguíneas el día cero, el día 6 y el día 12 del experimento para serología, para detectar seroconversión.

Se tomó una muestra de hisopo nasal diario durante todo el experimento a la misma hora para posteriormente realizarles la técnica de RT- PCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real).

Desafío

Inoculación del virus H5N2 con un título de 1/256 UHA (1307056.88 copias/ μ l) a 5 de los cerdos por vía intranasal, pertenecientes al grupo experimental infectado, 1ml en cada fosa nasal, haciendo uso de un aspersor de uso humano de 20 ml, lavado y esterilizado antes de su uso.

Registros clínicos

Observar el comportamiento, toma de temperatura rectal diaria, así como presencia de signos clínicos de los cerdos desde el día de su llegada hasta el día final del experimento (15 días en total).

Eutanasia y técnica de necropsia

La insensibilización de los animales se realizó con electroinsensibilización, posteriormente se realizó el degüelle y desangrado de cada animal, se evaluaron los signos vitales, como respiración, latido cardiaco y reflejos corporales para determinar la muerte y posteriormente realizar la técnica de necropsia.

La técnica de necropsia se realizó de la manera tradicional, evaluando el cuerpo para localizar posibles lesiones externas, posteriormente se inició con un corte medio desde craneal hacia caudal, observando estructuras internas y localizando alteraciones patológicas, los órganos que fueron exteriorizados son: linfonodos submandibulares, linfonodos inguinales, glándula salival, tonsilas, tráquea,

pulmón, duodeno, hígado y bazo, mismos que fueron evaluados, fraccionados para la toma de muestras y conservados una parte en congelación para la realización de qRT-PCR y la otra parte en formol al 10%, con proporción 1:10 para Histopatología, realizada en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Realización la necropsia de los cerdos, observando y registrando posibles lesiones y hacer la toma de muestra de órganos posiblemente afectados: tonsilas, linfonodos submandibulares, linfonodos inguinales, glándulas salivales, tráquea, pulmón, hígado, bazo y duodeno. A las muestras de órganos tomadas se les realizó un estudio histopatológico y la técnica de RT-PCR. El uso de los animales, así como su manejo con fines científicos para la realización de esta tesis fue aprobada por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA) bajo el número de protocolo: 537.

Las medidas de bioseguridad de las personas encargadas del cuidado de los animales fueron uso de ropa especial (overol y botas específicas para la actividad) así como guantes, cubre bocas y cofia diarios.

MANEJO DE LAS MUESTRAS

- Las muestras para serología se atemperaron después de ser tomadas, posteriormente se centrifugaron para la separación del suero que se separó en alícuotas de 2 ml ya que se obtuvo y fue congelado (-70°C). A estas muestras se les realizó la prueba de “Inhibición de la Hemoaglutinación” por el método beta (suero diluido, virus constante) (Del Castillo, 2010).

- Los hisopados nasales fueron guardados en tubos Eppendor de 2 ml con 1 ml de PBS, se congelaron (-70°C) inmediatamente después de ser tomados. A estas muestras se les realizó la extracción del material genético para posteriormente hacer la prueba de qRT- PCR.
- Los órganos se guardaron en recipientes de plástico por duplicado cada órgano, una parte fue fijada con formol al 10%, en proporción 1 en 10 para posteriormente enviarlas al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia para la realización de Histopatología. La otra parte se congeló (-70°C). A estas muestras se les realizó la técnica de qRT- PCR. A los órganos que salieron positivos a esta prueba se realizó el aislamiento viral en embrión de pollo.

INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN "IH" (MÉTODO BETA, SUERO DILUIDO- VIRUS CONSTANTE).

1. Tratamiento de las muestras de suero. Todas las muestras fueron previamente identificadas, absorbidas con caolín en tubos Eppendorf de 2ml estériles, las cantidades depositadas en cada tubo fueron las siguientes:
 - Suero = 200 µL
 - Caolín = 400 µL
 - Eritrocitos de ave al 5% = 400 MI

Quedando a una dilución de 1:5. Las muestras fueron dejadas en refrigeración a 4°C durante 24 horas para que el caolín, así como los eritrocitos de ave

sedimentara. Transcurridas las 24 horas los sueros fueron centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos para la realización de la prueba IH con los sobrenadantes.

2. Realización de la IH

1. Fueron utilizadas microplacas en fondo "U" de 96 pozos.
2. Se colocaron 50 μ L de Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) en todos los pozos de las microplacas.
3. Posteriormente se depositaron 50 μ L de cada uno de los sueros de la fila "1A" a la fila "1H" de la microplaca.
4. Se realizaron diluciones dobles seriadas de la fila 1 a la 12 (desde 1:10 hasta 1:20480).
5. De manera siguiente fueron colocados 50 μ L de antígeno viral de los siguientes subtipos de influenza (H5N2, H1N1, H3N2) con 8 UHA de la fila 2 a la 12. A la fila 1 no se le agregó antígeno por ser el control de suero. Se dejó un control de virus (50 μ L de PBS + 50 μ L de antígeno H5N2, H1N1 y H3N2 en sus respectivas microplacas).
6. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
7. Posteriormente se adicionaron 50 μ L de eritrocitos de ave al 0.5% a toda la placa. Fue considerado un control de eritrocitos (50 μ L de PBS + 50 μ L de eritrocitos de aves al 0.5%).
8. Finalmente se dejó a temperatura ambiente hasta que el control de eritrocitos sedimentó para posteriormente realizar la lectura.

3. Realización de lectura

Son consideradas positivas las muestras con títulos mayores o iguales a 1:80 UHA (Zimmerman *et al.*, Sánchez *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2017), el título de cada suero se dio en último pozo donde se observó sedimentación de eritrocitos. La prueba fue realizada para los subtipos de influenza H5N2, H1N1 y H3N2.

Los títulos se transformaron a logaritmo base 10 para su análisis estadístico.

EXTRACCIÓN DE RNA VIRAL

Las muestras de hisopados nasales guardadas en tubos Eppendorf de 2 ml, con 1 ml de PBS fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 min, posteriormente se tomó el sobrenadante para la extracción de RNA utilizando el kit de extracción “QIAamp Viral RNA kit Qiagen”.

Las muestras de órganos fueron maceradas, homogeneizándolas con nitrógeno líquido, posteriormente se preparó una suspensión 1:10 con medio de cultivo, la suspensión triturada se mezcló con vórtex durante 3 minutos y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. Se utilizaron los sobrenadantes para la extracción de RNA utilizando el kit de extracción “QIAamp Viral RNA kit Qiagen”.

Se realizó la preparación de lisis (ver Anexos).

Se colocaron 560 µl de buffer AVL más 140 µl de la muestra de sobrenadante (de los hisopados nasales y de los macerados de órganos a la necropsia) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, el cual se mezcló en un vórtex durante 15 segundos, posteriormente se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos, se

centrifugó ligeramente para eliminar las gotas del interior de la tapa y se agregó 560 μ l de etanol (96 – 100%) a la muestra, se mezcló en un vórtex durante 15 segundos, a continuación se pasaron 630 μ l de la mezcla anterior en la columna QIAamp dentro de un tubo de colecta de 2 ml, sin mojar el borde; se centrifugaron a 8000 rpm (6000 x g) durante un minuto, después de esto se colocó la columna en un nuevo tubo de colecta de 2 ml (desechando el tubo que contenía el filtrado), se abrió con cuidado la columna y se volvió agregar 630 μ l de la solución, se centrifugó a 8000 rpm (6000 x g) y se cambió de columna. Posteriormente se abrió la columna y se añadieron 500 μ l de Buffer AW1, se centrifugó a 8000 rpm (6000 x g) durante un minuto, se colocó la columna en un nuevo tubo de colecta, desechando el filtrado, para luego añadir 500 μ l de Buffer AW2, centrifugando a máxima velocidad, 14000 rpm (20000 x g) durante 3 minutos. Después de esto se colocó la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, desechando el tubo de colecta con el filtrado, se agregó 30 μ l de Buffer AVE al centro de la membrana y se dejó incubar a temperatura ambiente durante un minuto, se centrifugó a máxima velocidad, 14000 rpm (20000 x g) durante un minuto, luego de esto se volvió agregar 30 μ l de Buffer AVE al centro de la membrana y se dejó incubar a temperatura ambiente por un minuto, centrifugando a máxima velocidad 14000 rpm (20000 x g) durante un minuto y finalmente se obtuvo aproximadamente 60 μ l de extracción de RNA de cada muestra.

PCR EN TIEMPO REAL

Se realizó la técnica de qRT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) con el kit de Life technologies “Swine Influenza Virus RNA Test Kit”,

para identificar el virus de influenza A y cuantificar las muestras positivas, empleando como blanco de amplificación el gen M del virus de influenza.

El procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante Life Technologies y fue de la siguiente manera:

Para cuantificar el número de copias presentes del genoma del virus de Influenza A, se preparó la curva para la cuantificación de la RT-PCR con 4 cantidades conocidas de DNA control estándar. Para esto se realizaron diluciones decuples seriadas iniciando con una dilución en logaritmo $1 \times 10^{8.4}$ moléculas/ μl (log 8.4) del Kit FIND-IT INFLUENZA de Biotecmol.

Luego de esto se preparó la super mix RT-PCR con las siguientes proporciones:

Componente	Volumen por reacción
Buffer 2X Multiplex RT-PCR	12.5 μL
Enzima mix Multiplex RT-PCR	2.5 μL
Primer cebador mix del virus de Influenza	1.0 μL
Agua libre de nucleasas	1.0 μL
Volumen total del super mix RT-PCR	17.0 μL

Posteriormente se colocaron 17 μL de la super mix RT-PCR en cada microtubotubo y se le agregó 8 μL de las muestras de extracción de RNA a procesar, así como las diluciones realizadas para la construcción de la curva de cuantificación. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Momento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	1	48 °C	10 minutos
Desnaturalización inicial/ inactivación RT	1	95 °C	10 minutos
Amplificación	40	95 °C	15 segundos
		60 °C	15 segundos

Se utilizó el Termociclador Rotor-Gene™ 6000 de la marca Corbett Research (Copyright 2006).

Para analizar los datos se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

- Una muestra será considerada positiva siempre que la fluorescencia emitida sea mayor a la de los controles negativos.
- Una muestra será considerada negativa siempre que la fluorescencia emitida sea menor o igual a la de los controles negativos.
- Una muestra puede ser cuantificable siempre que la fluorescencia emitida se encuentre en el rango de fluorescencia de la curva estándar.
- Entre más bajo sea el valor de Ct de la muestra, mayor es la cantidad de copias genómicas presentes en la muestra.

AISLAMIENTO VIRAL

Las muestras de órganos positivas a la RT-PCR se intentaron replicar en embrión de pollo para lograr aislar el virus.

La replicación viral se hizo con sobrenadante de pulmón del grupo experimental centinela, con sobrenadante de tráquea del grupo experimental infectado y con el virus A/Swine/México/EdoMex/DMZC03/2015/H5N2 en embriones de pollo (EP) libres de patógenos específicos (SPF) de entre 9 y 11 días de edad, cada embrión fue inoculado vía cavidad alantoidea con 200 μ L (Del Castillo, 2010).

El procedimiento para la replicación viral en EP fue el siguiente:

1. A la llegada de los EP se revisó la viabilidad de los mismos y se descartaron los muertos y débiles.
2. Los EP se dejaron descansar por 24 horas, posteriormente se realizó la inoculación.
3. Con un lápiz se trazó una línea por encima de la cámara de aire.
4. Se desinfectó con alcohol al 70% y se perforaron.
5. Los embriones fueron inoculados a través del orificio con una jeringa de insulina con 200 μ L, en un ángulo de 90°. Fueron inoculados cuatro embriones por muestra positiva.
6. Se cubrió el orificio con pegamento blanco y se dejaron incubar a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 horas.
7. Diariamente se revisaron los EP. Los muertos a las 24 horas fueron descartados por traumatismo.

8. Se colectó el líquido alantoideo de los embriones muertos a las 48 horas así como los que sobrevivieron a las 72 horas, de la siguiente manera:
 - a. Se desinfectó con alcohol al 70% la cámara de aire y se cortó por la línea marcada previamente.
 - b. Se colectó con puntas estériles el líquido alantoideo procurando obtener líquido cristalino y sin yema.
 - c. Se depositó en tubos de vidrio estériles de manera individual.
 - d. El fluido recolectado se centrifugó a 3500 rpm a 4°C durante 10 minutos.

Titulación viral

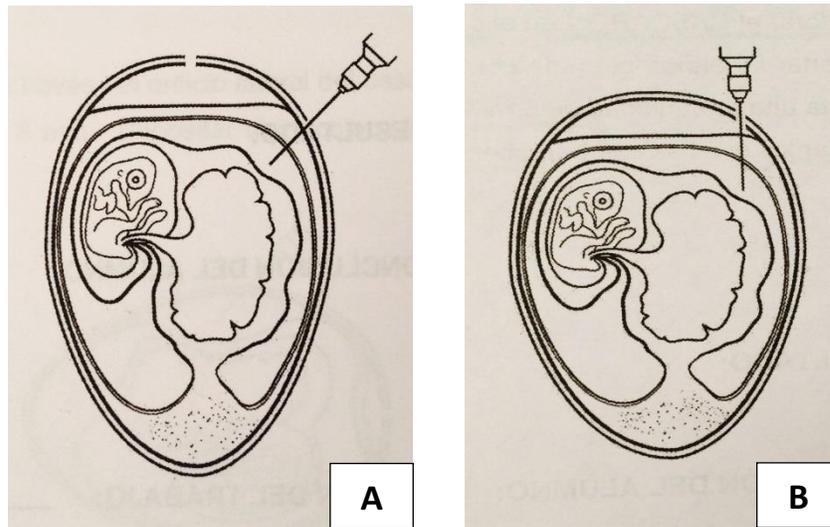
Los fluidos que se obtuvieron fueron titulados por medio de la técnica de “Hemoaglutinación en microplaca”, la metodología fue la siguiente:

Se colocaron 50 µL de Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) a todos los pozos de una microplaca en fondo en “U”, posteriormente se colocaron 50 µL del líquido alantoideo recolectado de cada embrión en el pozo uno y se realizaron diluciones dobles seriadas desde 1:2 hasta 1:4096. Después de ello se colocaron 50 µL de eritrocitos de ave al 0.5% a toda la placa.

La lectura se realizó hasta que el control de eritrocitos sedimentó. Se consideró positivo al aislamiento viral a las muestras que presentaron hemoaglutinación y obtuvieron un título de 1:8 UHA, observándose turbidez del líquido en los pozos (unión antígeno – eritrocitos).

Se realizó un segundo pase del líquido alantoideo recolectado a un nuevo embrión de pollo.

Figura 10. Inoculación viral en cavidad alantoidea de embrión de pollo



A) Inoculación en cavidad alantoidea a 45°. B) Inoculación en cavidad alantoidea a 90°.

Tomado de: Del Catillo CE, Gómez AF. 2010. Texto y Cuaderno de trabajo Laboratorio de Virología. Distrito Federal, México: FMVZ UNAM.

Una de las muestras positivas de tráquea que se replicó en embrión de pollo y que alcanzó el título 1:64 se mandó a secuenciar a la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM para confirmar la presencia del subtipo H5N2 inoculado en los cerdos experimentalmente.

RESULTADOS

- SIGNOS CLÍNICOS OBSERVADOS

En el cuadro 7 se observan los resultados de los signos clínicos evaluados y observados a lo largo del experimento, esperando observar: edema palpebral, estornudos, fiebre, depresión, descarga nasal y diarrea, se dividió a los grupos experimentales al igual que en la metodología, para el análisis de los signos clínicos, así como del resto de los resultados, teniendo así al grupo experimental control, centinela e infectado.

Los resultados demuestran que en el día 6 pos infección el grupo experimental infectado presentó de manera más evidente y aguda los signos clínicos, mientras que para el grupo experimental centinela dicha presentación evidente y aguda se observó hasta el día 12 pos infección (ver figuras 11-15). El grupo control permaneció sin signos clínicos evidentes.

El total de individuos presentaba diarrea pastosa al día cero que tuvo resolución sin problema alguno al día siguiente de su llegada.

Cuadro 7. Semiología Clínica de los individuos experimentales

Grupo experimental	Semiología	Días post-infección													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
GRUPO CONTROL	Edema palpebral	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	Estornudos	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	Fiebre	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	Depresión	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	Descarga nasal	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	Diarrea	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
GRUPO CENTINELA	Edema palpebral	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3
	Estornudos	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Fiebre	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Depresión	0/3	0/3	0/3	1/3	2/3	1/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Descarga nasal	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	2/3
	Diarrea	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
GRUPO INFECTADO	Edema palpebral	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	1/5	0/5	1/5	0/5
	Estornudos	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Fiebre	0/5	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Depresión	0/5	1/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	2/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Descarga nasal	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	1/5	0/5	0/5	3/5	1/5	3/5	1/5
	Diarrea	5/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

n/n = número de individuos afectados/número de individuos totales por grupo

■ Presentación clínica más evidente y aguda.

En el cuadro X se muestran enlistados los signos clínicos evaluados en los tres grupos experimentales durante todo el experimento, utilizando n/n para su mejor interpretación, teniendo así que el grupo experimental control estaba conformado por dos individuos, el grupo experimental centinela por tres individuos y el grupo experimental infectado por cinco individuos.

Se resaltan los días en los que se observaron de manera más evidente los signos clínicos, tanto en el grupo experimental infectado como en el grupo experimental centinela

Figura 11. Observación de secreción nasal en los grupos experimentales, infectado y centinela.

<p>Grupo INFECTADO</p>	 <p><i>Individuo 2C: Secreción nasal abundante en el día 6 post-infección.</i></p>
<p>Grupo CENTINELA</p>	 <p><i>Individuo 3D: Secreción nasal moderada en el día 12 post-infección</i></p>

Figura 12. Observación de edema palpebral en los grupos experimentales infectados y centinelas.

<p>Grupo INFECTADO</p>	 <p><i>Individuo 2C: Edema palpebral moderado en el día 6 post-infección.</i></p>
<p>Grupo CENTINELA</p>	 <p><i>Individuo 3C: Edema palpebral ligero en el día 12 post-infección</i></p>

Figura 13. Observación de depresión en los grupos experimentales infectados y centinelas.

<p>Grupo INFECTADO</p>	 <p><i>Individuo 2C: Depresión ligera y disminución de la actividad en el día 1 post-infección.</i></p>
<p>Grupo CENTINELA</p>	 <p><i>Individuos 3C y 3D: Depresión ligera con disminución de la actividad en el día 7 post-infección</i></p>

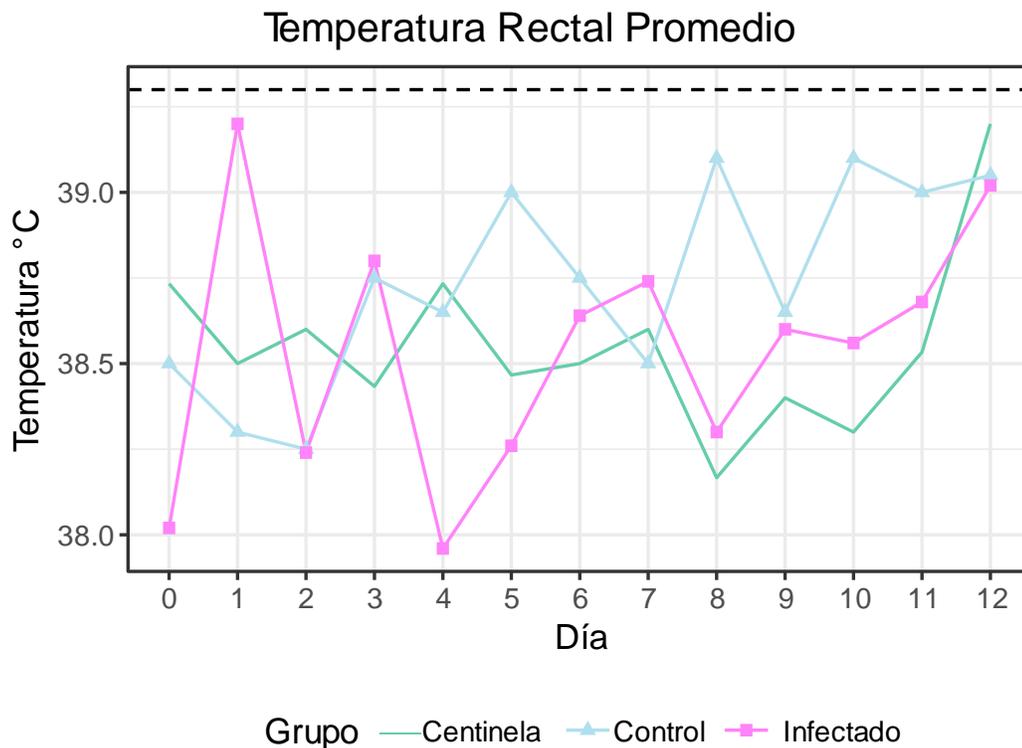
Figura 14. Observación de diarrea en el grupo experimental infectado.

<p>Individuo 2B</p>	 <p><i>Diarrea pastosa en el día 2 post-infección.</i></p>
<p>Individuo 2A</p>	 <p><i>Diarrea pastosa en el día 5 post-infección</i></p>

En la figura 15 se muestra que los cerdos del grupo experimental infectado presentaron fluctuaciones de temperatura mayores que el grupo centinela y el grupo control, entre 38°C a 39.2°C. El grupo experimental centinela tuvo una fluctuación de la temperatura entre 38.3°C a 39.2°C. No se observó de manera aguda y grupal la presentación de fiebre, sin embargo, de manera individual si se observó este signo clínico (ver figura 15).

El grupo experimental control presentó menos fluctuación de la temperatura manteniéndose en el rango de 38.2 °C a 38.8°C, sin presentación de fiebre.

Figura 15. Gráfica de temperaturas rectales de los grupos experimentales a lo largo del experimento



En la gráfica 15 se muestran las temperaturas rectales de los grupos experimentales a lo largo del experimento, sobre el eje de las “x” se encuentran los días del experimento, el día cero y los doce días pos infección, sobre el eje de las “y” se encuentra la temperatura expresada en grados Celsius (°C). Cada grupo experimental está representado por un color.

- RESULTADOS A LA NECROPSIA

Los resultados a la necropsia mostraron una infección viral evidente del grupo experimental infectado y de manera más severa del grupo experimental centinela, las lesiones más notorias fueron en pulmones, específicamente en lóbulos apicales (ver figura 16). La neumonía intersticial o bronconeumonía se presentó en el 100% de los individuos pertenecientes a estos dos grupos experimentales. Otro hallazgo presente en el total de los individuos de ambos grupos fue la presencia de linfonodos mediastínicos hemorrágicos (ver figura 17). El grupo experimental control no presentó lesiones aparentes en pulmón ni en linfonodos mediastínicos.

En la figura 18 se muestra otro hallazgo observado en la necropsia, el edema proveniente de tráquea solo se apreció en los grupos experimentales infectado y centinela, mientras que en el grupo experimental control no logró apreciarse dicha lesión. La linfadenomegalia tanto submandibular como inguinal fue observada en los grupos experimentales infectado y centinela (ver figuras 19 y 20), en el grupo infectado se presentaron focos hemorrágicos en los linfonodos submandibulares. El grupo experimental control, permaneció sin cambios patológicos aparentes en linfonodos.

Las lesiones macroscópicas observadas a la necropsia en todos los casos fueron muy evidentes en los grupos experimentales infectado y centinela, mientras que el grupo experimental control en todos los casos permaneció sin lesiones macroscópicas aparentes.

Figura 16. Comparación de bloques cardiopulmonares entre los tres grupos experimentales

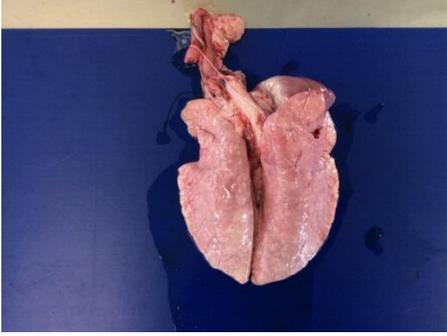
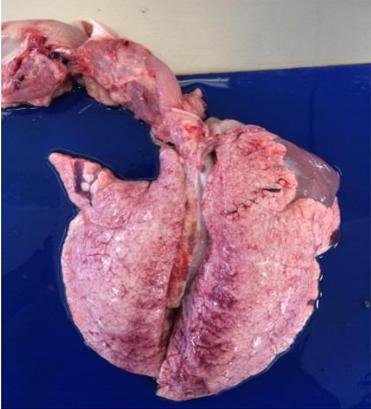
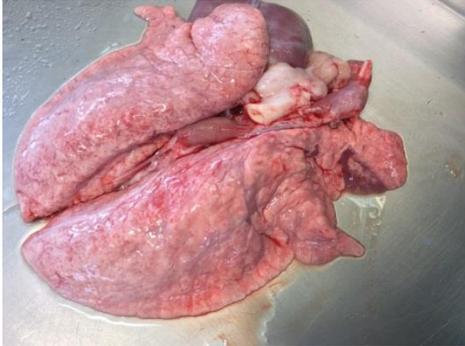
<p>Grupo CONTROL</p>	 <p><i>Pulmones sin cambios patológicos aparentes.</i></p>
<p>Grupo CENTINELA</p>	 <p><i>Superficie pulmonar dorsal con múltiples hemorragias petequiales. Los lóbulos apicales y medios presentan áreas de congestión. Linfonódo mediastínico con congestión generalizada.</i></p>
<p>Grupo INFECTADO</p>	 <p><i>Lobo pulmonar derecho: áreas de congestión en lóbulo apical así como áreas irregulares en el lóbulo medio (bronconeumonía). Sobre la superficie de ambos lobos pulmonares se observan múltiples petequias.</i></p>

Figura 17. Comparación de linfonodos mediastínicos entre los grupos experimentales centinelas e infectados

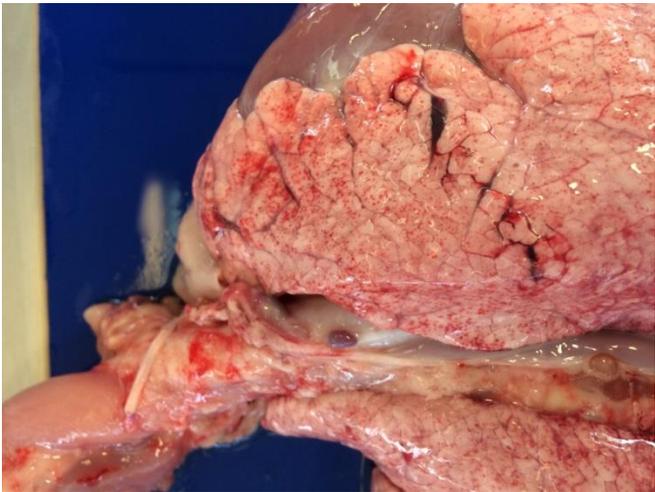
<p>Grupo CENTINELA</p>	 <p><i>Lóbulo apical con áreas de congestión. Lobos pulmonares con petequias multifocales. Linfonódo mediastínico congestionado.</i></p>
<p>Grupo INFECTADO</p>	 <p><i>Lobos pulmonares con petequias y linfonódo mediastínico congestionado.</i></p>

Figura 18. Cavity oral, comparación de la tráquea entre los tres grupos experimentales

<p>Grupo CONTROL</p>	 <p><i>Aparentemente sin alteraciones patológicas</i></p>
<p>Grupo CENTINELA</p>	 <p><i>Sobre la superficie caudal de la lengua se observan burbujas y líquido escaso compatible con espuma (edema) proveniente de tráquea.</i></p>
<p>Grupo INFECTADO</p>	 <p><i>Sobre la superficie caudal de la lengua se observan burbujas y líquido escaso compatible con espuma (edema) proveniente de tráquea.</i></p>

Figura 19. Comparación de linfonodos submandibulares entre los tres grupos experimentales

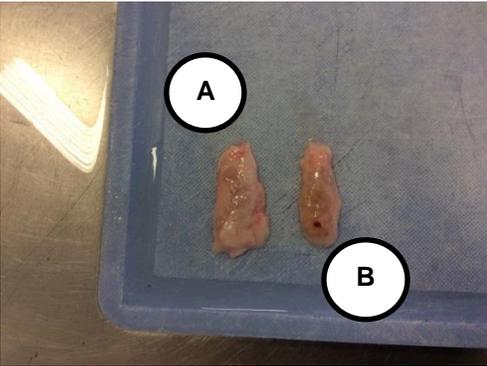
<p>Grupo CONTROL</p>	 <p><i>Linfonodos submandibulares: linfadenomegalia ligera.</i></p>
<p>Grupo CENTINELA</p>	 <p><i>Linfonodos submandibulares: linfadenomegalia.</i></p>
<p>Grupo INFECTADO</p>	 <p><i>Linfonodos inguinales:</i> A) <i>Linfadenomegalia ligera, se observan escasas petequias en la superficie.</i> B) <i>Sobre la superficie se observa hemorragia focal</i></p>

Figura 20. Comparación de linfonodos inguinales entre los tres grupos experimentales

<p>Grupo CONTROL</p>	 <p><i>Linfonodos inguinales: en la necropsia se observó linfadenomegalia ligera.</i></p>
<p>Grupo CENTINELA</p>	 <p><i>Linfonodos inguinales: en la necropsia se observó linfadenomegalia.</i></p>
<p>Grupo INFECTADO</p>	 <p><i>Linfonodos inguinales: en la necropsia se observó linfadenomegalia.</i></p>

- HISTOPATOLOGÍA

Se asignó una escala numérica a cada lesión, donde:

0 = Sin lesión

1 = Lesión ligera

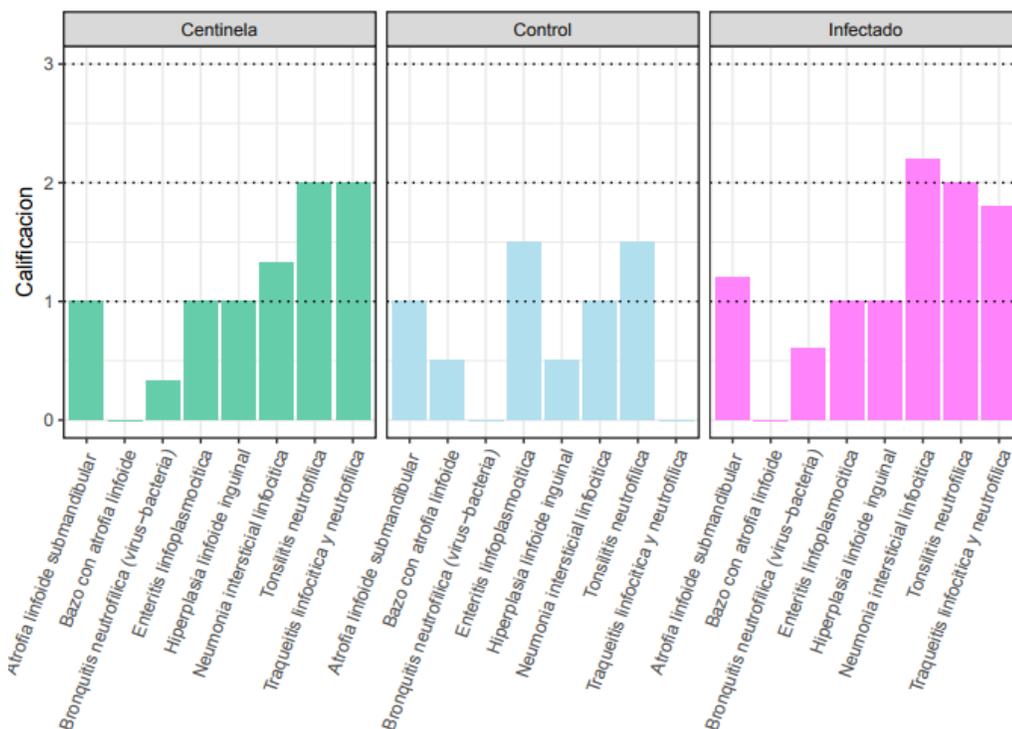
2 = Lesión moderada

3 = Lesión grave

De tal forma que se calificó cada lesión por individuo y se realizaron promedios por grupo para su mejor interpretación.

LESIÓN	GRUPO CONTROL	GRUPO CENTINELA	GRUPO INFECTADO
Neumonía intersticial linfocítica	1	1.33	2.2
Bronquitis neutrofílica (virus-bacteria)	0	0.33	0.6
Traqueítis linfocítica y neutrofílica	0	2	1.8
Tonsilitis neutrofílica	1.5	2	2
Enteritis linfoplasmocítica	1.5	1	1
Bazo con atrofia linfoide	0.5	0	0
Linfonodo submandibular con atrofia linfoide	1	1	1.2
Linfonodo inguinal con hiperplasia linfoide	0.5	1	1

Figura 21. Gráfica de promedio de lesiones a la histopatología por grupo experimental.



En la grafica 21 se muestran las lesiones observadas en la Histopatología, en el eje de las “x” se encuentran enlistadas las lesiones, mientras que en el eje de las “y” se observa la escala numérica para asignar un valor a cada lesión, donde 0 = sin lesión, 1 = lesión ligera, 2 = lesión moderada y 3 = lesión grave. Cada grupo experimental tiene asignado un color; el grupo experimental infectado y centinela mostraron mayor afección en la mayoría de las lesiones, siendo estas de ligeras a moderadas, por otro lado, el grupo experimental control presentó lesiones ligeras o ausencia de lesiones.

- SEROLOGÍA: INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN

Se realizó la prueba serológica de inhibición de la hemoaglutinación por el método beta (suero diluido, virus constante con un título de 1: 256 UHA, utilizando 8 UHA).

Los resultados demuestran que no hubo seroconversión contra el subtipo aviar H5N2 pos infección, ya que todos los sueros presentaron títulos menores al punto de corte (1:80) (Ver cuadro 8).

Cuadro 8. Resultados de Inhibición de la hemoaglutinación para el subtipo H5N2

Individuo	Día 0 16/12/16		Día 6 24/12/16		Día 12 30/12/16	
	Dilución	Título UHA	Dilución	Título UHA	Dilución	Título UHA
1A	1:10	10	1:10	10	1:10	10
1B	1:10	10	1:10	10	1:10	10
3C	1:10	10	1:10	10	1:10	10
3D	1:10	10	1:10	10	1:10	10
3E	1:10	10	1:10	10	1:10	10
2A	1:10	10	1:10	10	1:10	10
2B	1:10	10	1:10	10	1:10	10
2C	1:10	10	1:10	10	1:10	10
2D	1:10	10	1:10	10	1:10	10
2E	1:10	10	1:10	10	1:10	10

	Grupo CONTROL
	Grupo CENTINELA
	Grupo INFECTADO

En cuanto a los resultados para el subtipo H1N1 porcino se demuestra seroconversión contra dicho subtipo, desde el día cero hasta el día 12, manteniéndose en títulos de 1:40 UHA a 1:80 UHA (ver cuadro 9).

Cuadro 9. Resultados de Inhibición de la hemoaglutinación para el subtipo H1N1.

Individuo	Día 0 16/12/16		Día 6 24/12/16		Día 12 30/12/16	
	Dilución	Título UHA	Dilución	Título UHA	Dilución	Título UHA
1A	1:40	40	1:80	80	1:80	80
1B	1:40	40	1:80	80	1:40	40
3C	1:40	40	1:40	40	1:80	80
3D	1:40	40	1:40	40	1:40	40
3E	1:40	40	1:40	40	1:10	10
2A	1:40	40	1:80	80	1:40	40
2B	1:40	40	1:80	80	1:40	40
2C	1:40	40	1:80	80	1:80	80
2D	1:40	40	1:80	80	1:80	80
2E	1:40	40	1:40	40	1:80	80

	Grupo CONTROL
	Grupo CENTINELA
	Grupo INFECTADO

Mientras que para el subtipo H3N2 los resultados demuestran que no hubo seroconversión contra dicho subtipo porcino, ya que todos los sueros presentaron títulos menores al punto de corte (1:80) (ver cuadro 10).

Cuadro 10. Resultados de Inhibición de la hemoaglutinación para el subtipo H3N2

Individuo	Día 0 16/12/16		Día 6 24/12/16		Día 12 30/12/16	
	Dilución	Título UHA	Dilución	Título UHA	Dilución	Título UHA
1A	1:10	10	1:10	10	1:10	10
1B	1:10	10	1:10	10	1:10	10
3C	1:20	20	1:10	10	1:10	10
3D	1:10	10	1:10	10	1:10	10
3E	1:20	20	1:10	10	1:10	10
2A	1:10	10	1:10	10	1:10	10
2B	1:20	20	1:10	10	1:10	10
2C	1:20	20	1:10	10	1:10	10
2D	1:10	10	1:10	10	1:10	10
2E	1:10	10	1:10	10	1:10	10

	Grupo CONTROL
	Grupo CENTINELA
	Grupo INFECTADO

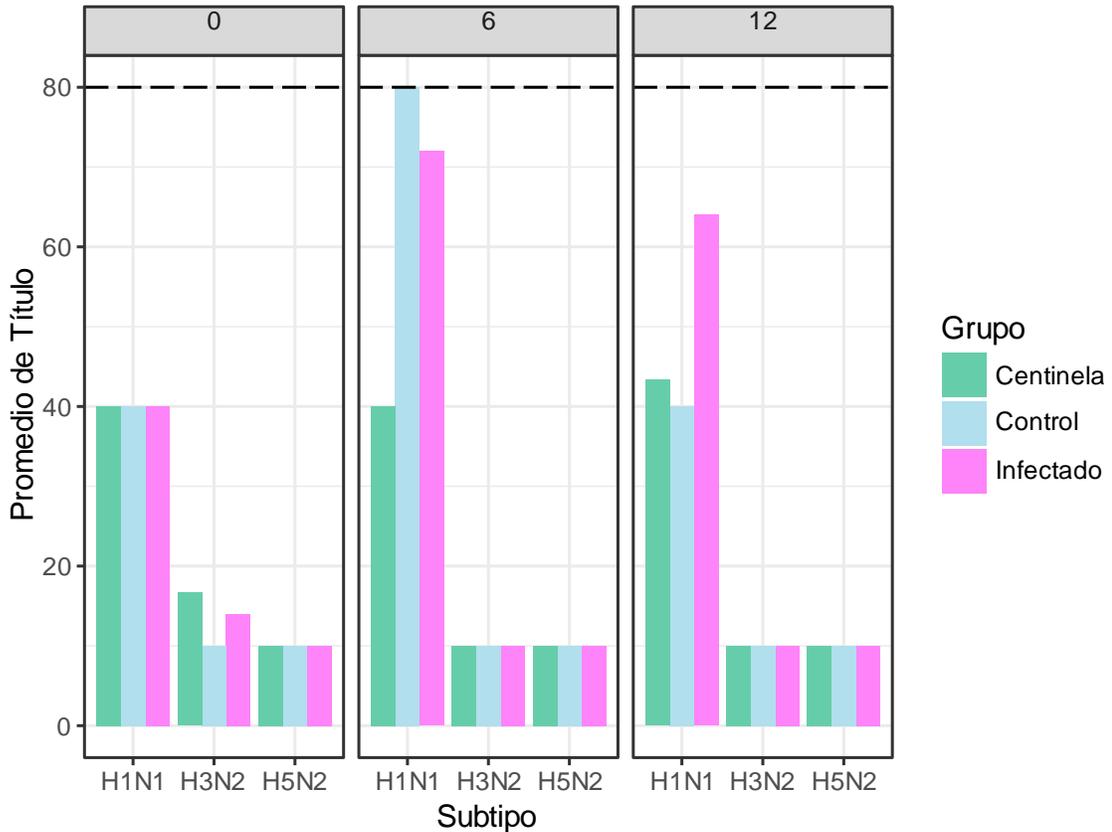
Los resultados se analizaron a través del tiempo, es decir, por días de muestreo serológico, teniendo así que en el día cero los tres grupos experimentales presentaron un título de 1:40 UHA para el subtipo porcino H1N1, mientras que para el subtipo H3N2 porcino y el subtipo H5N2 aviar, los títulos fueron menores a 1:20 UHA (ver figura 22).

Para el día 6 post infección con el virus H5N2 aviar, los títulos se mantuvieron en 1:10 UHA, tanto para el subtipo en estudio como para el subtipo H3N2 porcino, mientras que para el subtipo H1N1 los títulos se mantuvieron entre 1:40 a 1:80 UHA (Ver figura 22).

Para el día 12 posterior a la infección con el virus H5N2 aviar, los títulos se mantuvieron en 1:10 UHA, tanto para el subtipo en estudio como para el subtipo H3N2 porcino, mientras que para el subtipo H1N1 los títulos se mantuvieron entre 1:40 a 1:80 UHA lo cual se puede apreciar en la figura 22.

Figura 22. Gráfica de resultados de la inhibición de la hemoaglutinación para los subtipos H5N2, H1N1 y H3N2 del día cero, 6 y 12 posterior a la infección en los diferentes grupos experimentales.

Resultados Inhibición de la Hemoaglutinación



En la gráfica 22 se muestran los títulos de anticuerpos del día cero, del día 6 y del día 12 de los tres grupos experimentales, grupo control, grupo centinela y grupo infectado, contra los tres subtipos de influenza, dos de ellos porcinos, el H1N1 y el H3N2 así como el subtipo en estudio, el H5N2 aviar. En el eje de las “x” se encuentran los promedios de los individuos por grupo experimental, mientras que en el eje de las “y” se encuentran las unidades hemoaglutinantes (UHA) que representan el título de anticuerpos.

- RT-PCR

Los resultados de la RT-PCR demuestran que hubo presencia del virus en pulmones del grupo experimental centinela, en tráquea y duodeno del grupo experimental centinela e infectado. Mientras que en el grupo experimental control los resultados fueron negativos para los 9 órganos evaluados (Linfonodos submandibulares, linfonodos inguinales, glándula salival, tonsilas, tráquea, pulmón, duodeno, hígado y bazo) como se muestra en el cuadro 11.

Cuadro 11. Resultados positivos y negativos de la RT-PCR de los órganos de los cerdos experimentales

Órganos muestreados	Grupo CONTROL	Grupo CENTINELA	Grupo INFECTADO
LN submandibulares	-	-	-
LN inguinales	-	-	-
Glándula salival	-	-	-
Tonsilas	-	-	-
Tráquea	-	+	+
Pulmón	-	+	-
Duodeno	-	+	-
Hígado	-	-	-
Bazo	-	-	-

(-) Negativo a la RT-PCR

(+) Positivo a la RT-PCR

En el cuadro 11 se observa en que órgano de cada grupo experimental hubo presencia viral. En la primera columna se encuentran enlistados los órganos tomados a la necropsia de los individuos experimentales, mientras que en la primera fila se encuentran divididos los grupos experimentales. Se observa que el grupo experimental centinela dio positivo a la RT-PCR en pulmón, tráquea y duodeno, el grupo experimental infectado dio positivo a la RT-PCR en tráquea, en cambio el grupo experimental control dio negativo a la presencia del virus para todos los órganos.

En cuanto a los hisopos nasales los resultados de la RT-PCR demuestran que hubo excreción nasal del virus tanto en el grupo experimental infectado como en el grupo experimental centinela en los días 6 y 7 pos infección tal y como se muestra en el cuadro 12.

Cuadro 12. Resultados positivos y negativos de la RT-PCR de las muestras de hisopos nasales de los cerdos experimentales

Grupo Experimental	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
Grupo CONTROL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo CENTINELA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Grupo INFECTADO	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-

(-) Negativo a la RT-PCR

(+) Positivo a la RT-PCR

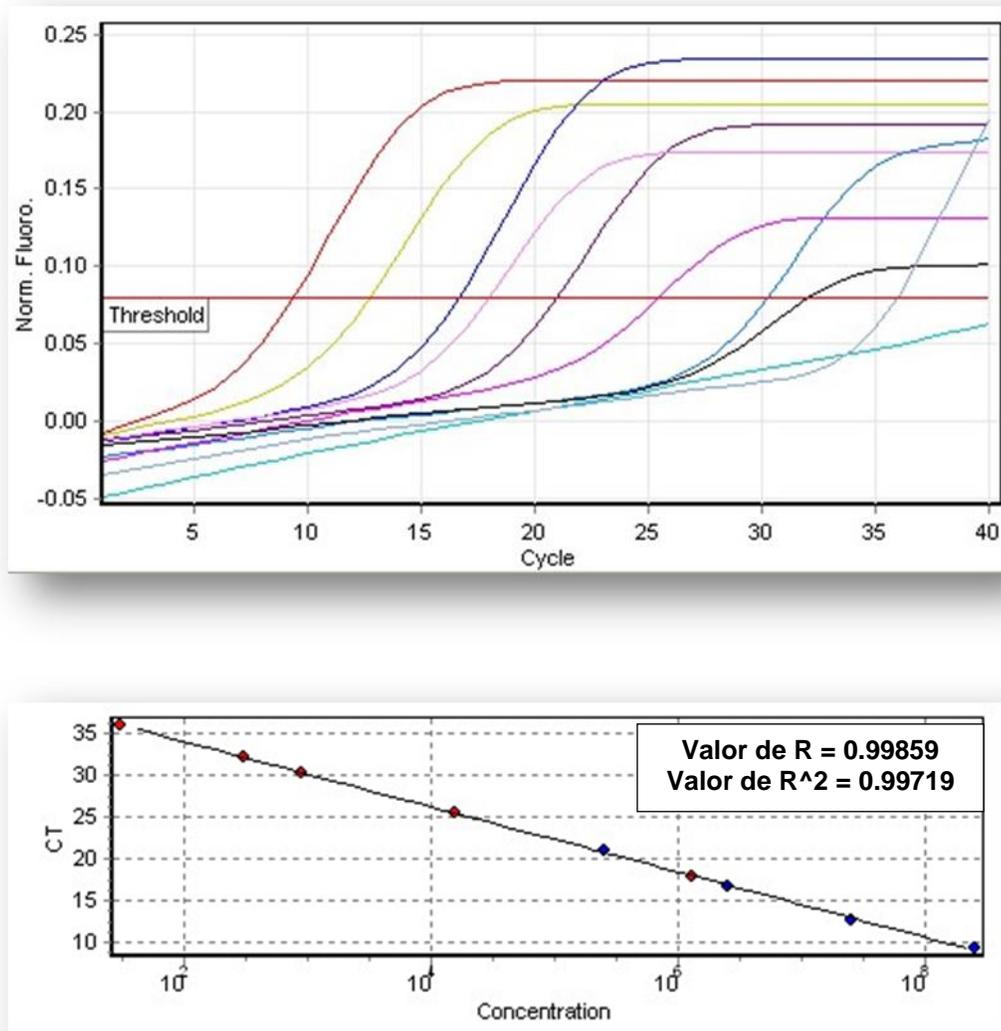
En el cuadro 12 se observa en que día existió excreción nasal del virus en estudio, en la primer columna se encuentran divididos los grupos experimentales mientras que en la primer fila se encuentran los días de duración del estudio. Se observa que tanto para el grupo experimental infectado como el centinela hubo excreción viral el día 6 y el día 7 pos inoculación.

Cuadro 13. Valores de Ct y de la concentración de la RT-PCR de tráquea de los tres grupos experimentales

No.	Color	Nombre	Tipo	Ct	Concentración estimada (copies/μl)	Concentración calculada (copies/μl)
1		STD 1	Curva estándar	9.40	251188643.150958	218141820.280661
2		STD 2	Curva estándar	12.78	25118864.3150958	29198533.2433683
3		STD 3	Curva estándar	16.70	2511886.43150958	2838318.51555467
4		STD 4	Curva estándar	20.99	251188.643150958	220210.945311112
5		Virus H5N2	Control positivo	18.00		1307056.88779455
6		Control positivo KIT	Control positivo	30.24		893.486651356108
7		Tráquea grupo INFECTADO	Desconocida	25.46		15444.3934055209
8		Tráquea grupo CENTINELA	Desconocida	32.09		298.072908435131
9		Tráquea grupo CONTROL	Desconocida	-		-
10		H2O FREE	Control negativo	35.93		30.3512296620999

En el cuadro 13 se observan los valores de Ct y la concentración calculada de la tráquea de los 3 grupos experimentales, expresada en copias/μl. Del número 1 al 4 muestran los valores de la curva estándar, utilizada para la cuantificación de la RT-PCR. Con el número 5 y 6 se muestran los valores de los controles positivos, mientras que con el número 10 se muestran los valores del control negativo, con un Ct de 35.93, por lo que el grupo experimental infectado y el grupo experimental centinela fueron positivos a la RT-PCR para este órgano, ya que su Ct es de 25.46 y 32.09 respectivamente.

Figura 23. Gráfica de RT-PCR de la tráquea de los tres grupos experimentales



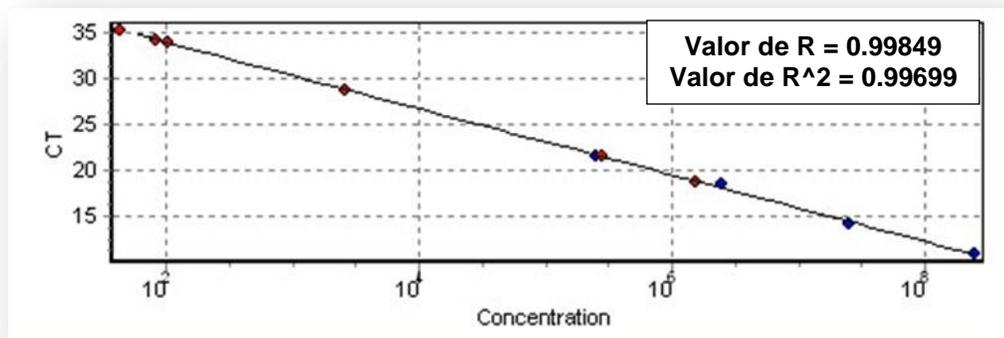
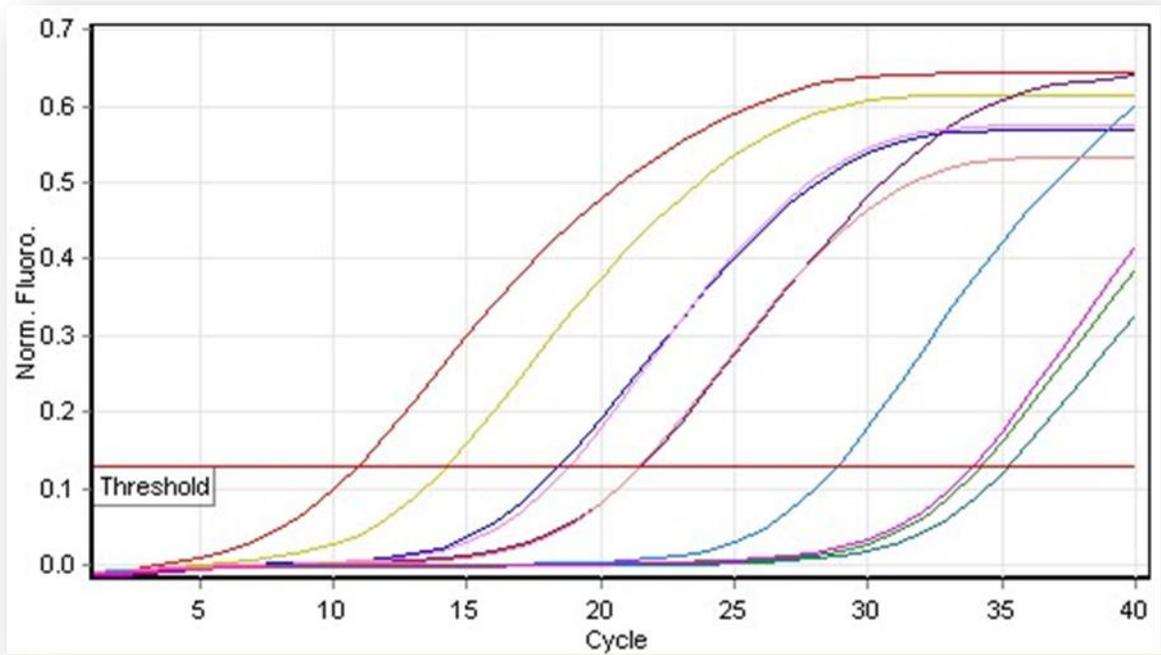
En la gráfica 23 se observan representados los valores de Ct del cuadro X, en el eje de las “x” se observan los ciclos de amplificación, mientras que en el eje de las “y” se observa la fluorescencia presentada por cada muestra. En la gráfica de escala absoluta se observan los valores de Ct y la concentración logarítmica, observando también el valor de R y R² muy cercanos al 1. Los canales Marrón , verde, azul y morado es la curva estándar del kit. El resto son las muestras procesadas de los animales infectados.

Cuadro 14. Valores de Ct y concentración de la RT-PCR de pulmón de los tres grupos experimentales

No.	Color	Nombre	Tipo	Ct	Concentración estimada (copies/ul)	Concentración calculada (copies/ul)
1		STD 1	Curva estándar	10.87	251188643.150958	246748830.367449
2		STD 2	Curva estándar	14.23	25118864.3150958	28849791.4357982
3		STD 3	Curva estándar	18.40	2511886.43150958	2008858.44988747
4		STD 4	Curva estándar	21.50	251188.643150958	278389.520700287
5		Virus H5N2	Control positivo	18.78		1574334.09888338
6		Control positivo KIT	Control positivo	28.80		2616.78882777981
7		Pulmón grupo INFECTADO	Desconocida	35.22		43.2132190736102
8		Pulmón grupo CENTINELA	Desconocida	21.44		287862.36340793
9		Pulmón grupo CONTROL	Desconocida	34.18		84.2310646618614
10		H2O FREE	Control negativo	33.87		102.305333625131

En el cuadro 14 se observan los valores de Ct y la concentración calculada de los pulmones de los grupos experimentales, expresada en copias/μl. Del número 1 al 4 muestran los valores de la curva estándar, utilizada para la cuantificación de la RT-PCR. Con el número 5 y 6 se muestran los valores de los controles positivos, mientras que con el número 10 se muestran los valores del control negativo, con un Ct de 33.87, por lo que el grupo experimental centinela fue el único positivo a la RT-PCR para este órgano, ya que su Ct es de 21.44.

Figura 24. Gráfica de RT-PCR de pulmón de los tres grupos experimentales



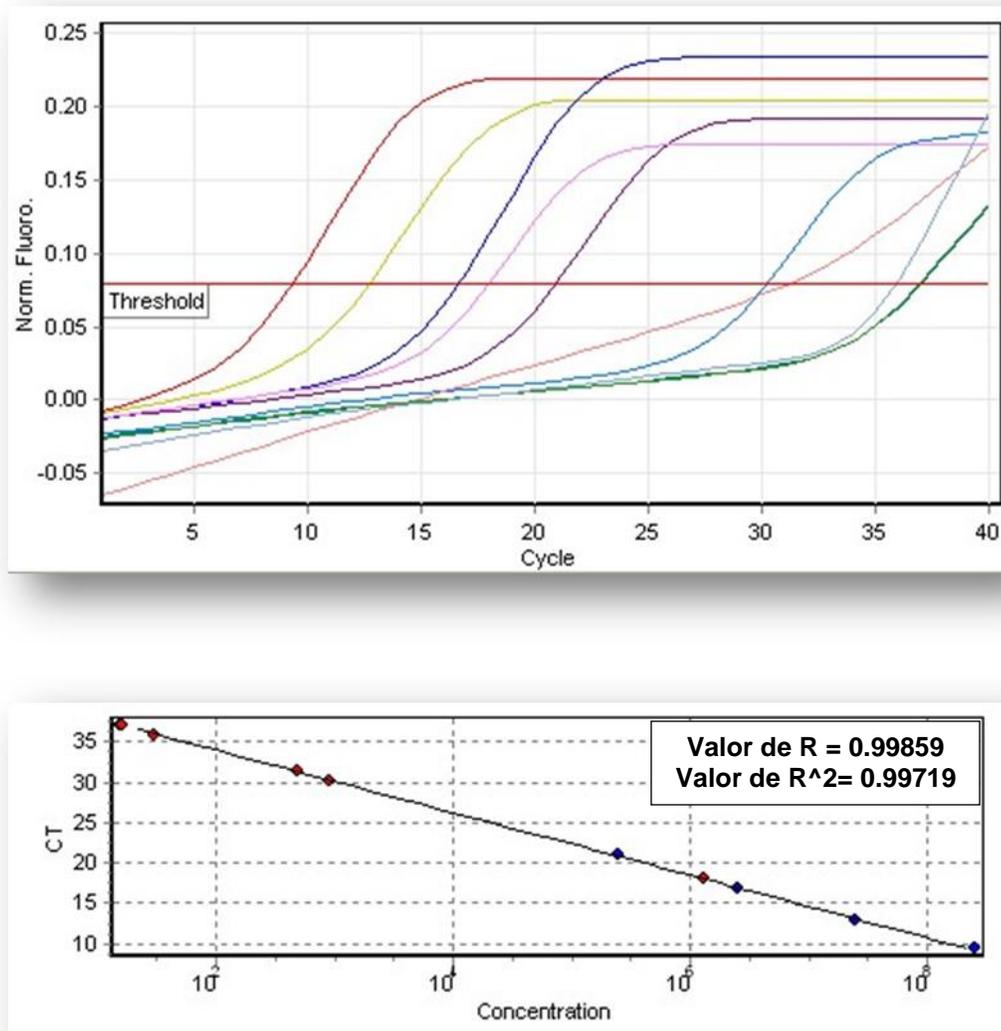
En la gráfica 24 se observan representados los valores de Ct del cuadro X, en el eje de las "x" se observan los ciclos de amplificación, mientras que en el eje de las "y" se observa la fluorescencia presentada por cada muestra. En la gráfica de escala absoluta se observan los valores de Ct y la concentración logarítmica, observando también el valor de R y R² muy cercanos al 1.

Cuadro 15. Valores de Ct y de la concentración de la RT-PCR de duodeno de los tres grupos experimentales

No.	Color	Nombre	Tipo	Ct	Concentración estimada (copies/μl)	Concentración calculada (copies/μl)
1		STD 1	Curva estándar	9.40	251188643.150958	218141820.280661
2		STD 2	Curva estándar	12.78	25118864.3150958	29198533.2433683
3		STD 3	Curva estándar	16.70	2511886.43150958	2838318.51555467
4		STD 4	Curva estándar	20.99	251188.643150958	220210.945311112
5		Virus H5N2	Control positivo	18.00		1307056.88779455
6		Control positivo KIT	Control positivo	30.24		893.486651356108
7		Duodeno del grupo INFECTADO	Desconocida	37.04		15.6711755678402
8		Duodeno del grupo CENTINELA	Desconocida	31.24		492.577616889147
9		Duodeno del grupo CONTROL	Desconocida	36.99		16.1273502792906
10		H2O FREE	Control negativo	35.93		30.3512296620999

En el cuadro 15 se observan los valores de Ct y la concentración calculada del duodeno de los grupos experimentales, expresada en copias/μl. Del número 1 al 4 muestran los valores de la curva estándar, utilizada para la cuantificación de la RT-PCR. Con el número 5 y 6 se muestran los valores de los controles positivos, mientras que con el número 10 se muestran los valores del control negativo, con un Ct de 35.93, por lo que el grupo experimental centinela fue el único positivo a la RT-PCR para este órgano, ya que su Ct es de 31.24.

Figura 25. Gráfica de RT-PCR de duodeno de los tres grupos experimentales



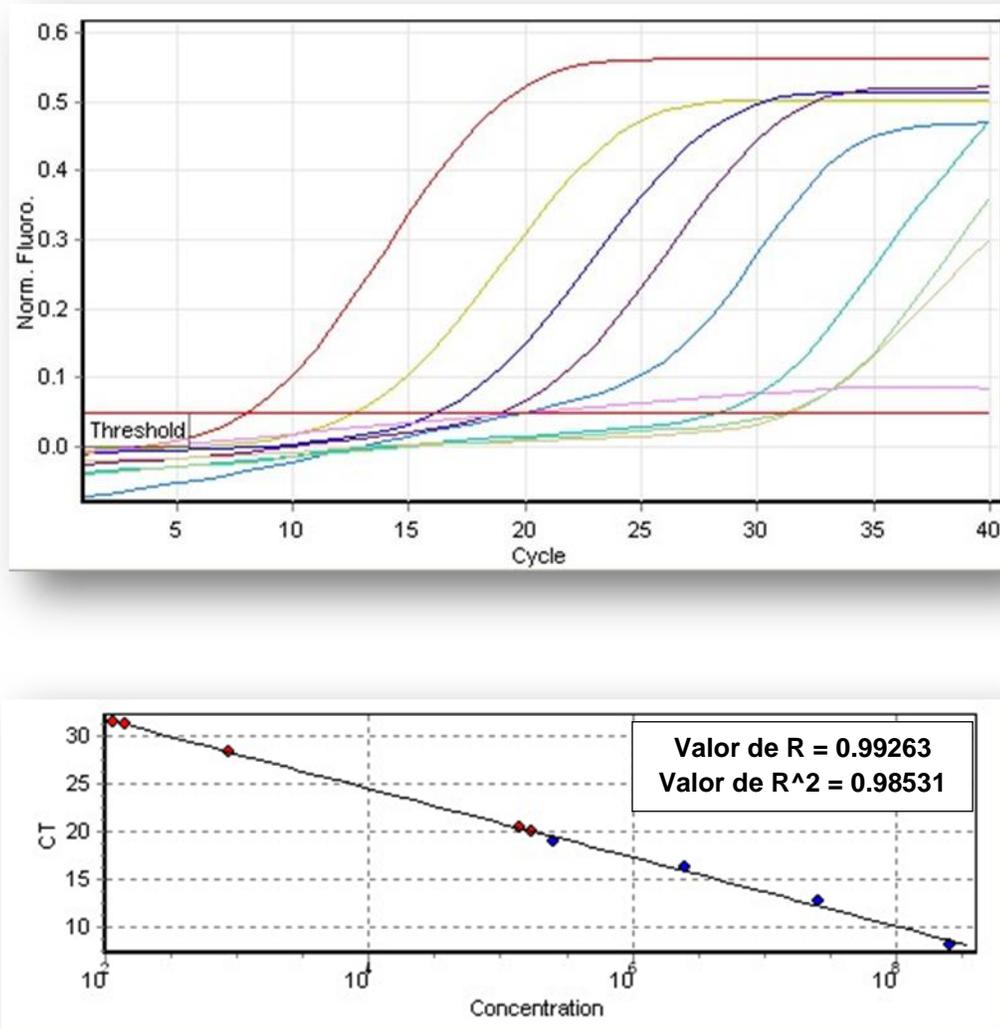
En la gráfica 25 se observan representados los valores de Ct del cuadro X, en el eje de las “x” se observan los ciclos de amplificación, mientras que en el eje de las “y” se observa la fluorescencia presentada por cada muestra. En la gráfica de escala absoluta se observan los valores de Ct y la concentración logarítmica, observando también el valor de R y R² muy cercanos al 1.

Cuadro 16. Valores de Ct y de la concentración de la RT-PCR de los hisopos nasales al día 6 pos inoculación de los tres grupos experimentales

No.	Color	Nombre	Tipo	Ct	Concentración estimada (copias/μl)	Concentración calculada (copias/μl)
1		STD 1	Curva estándar	8.10	251188643.150958	346148748.058515
2		STD 2	Curva estándar	12.75	25118864.3150958	17986057.9805337
3		STD 3	Curva estándar	16.31	2511886.43150958	1872146.05116244
4		STD 4	Curva estándar	18.98	251188.643150958	341555.685930848
5		Virus H5N2	Control positivo	20.43		136489.221991567
6		Control positivo KIT	Control positivo	20.09		169089.055798505
7		Hisopos nasales grupo INFECTADOS día 6	Desconocido	28.38		869.96026439944
8		Hisopos nasales grupo CENTINELA día 6	Desconocido	31.56		114.714001047819
9		Hisopos nasales grupo CONTROL día 6	Desconocido	31.57		140.714001047820
10		H2O FREE	Control negativo	31.25		140.084021632508

En el cuadro 16 se observan los valores de Ct y la concentración calculada de los hisopos nasales tomados al día 6 pos inoculación de los 3 grupos experimentales, expresada en copias/μl. Del número 1 al 4 muestran los valores de la curva estándar, utilizada para la cuantificación de la RT-PCR. Con el número 5 y 6 se muestran los valores de los controles positivos, mientras que con el número 10 se muestran los valores del control negativo, con un Ct de 31.25, por lo que el grupo experimental infectado fue positivo a la RT-PCR para este día pos inoculación, ya que su Ct es de 28.38.

Figura 26. Gráfica de RT-PCR de los hisopos nasales tomados al día 6 pos inoculación de los tres grupos experimentales



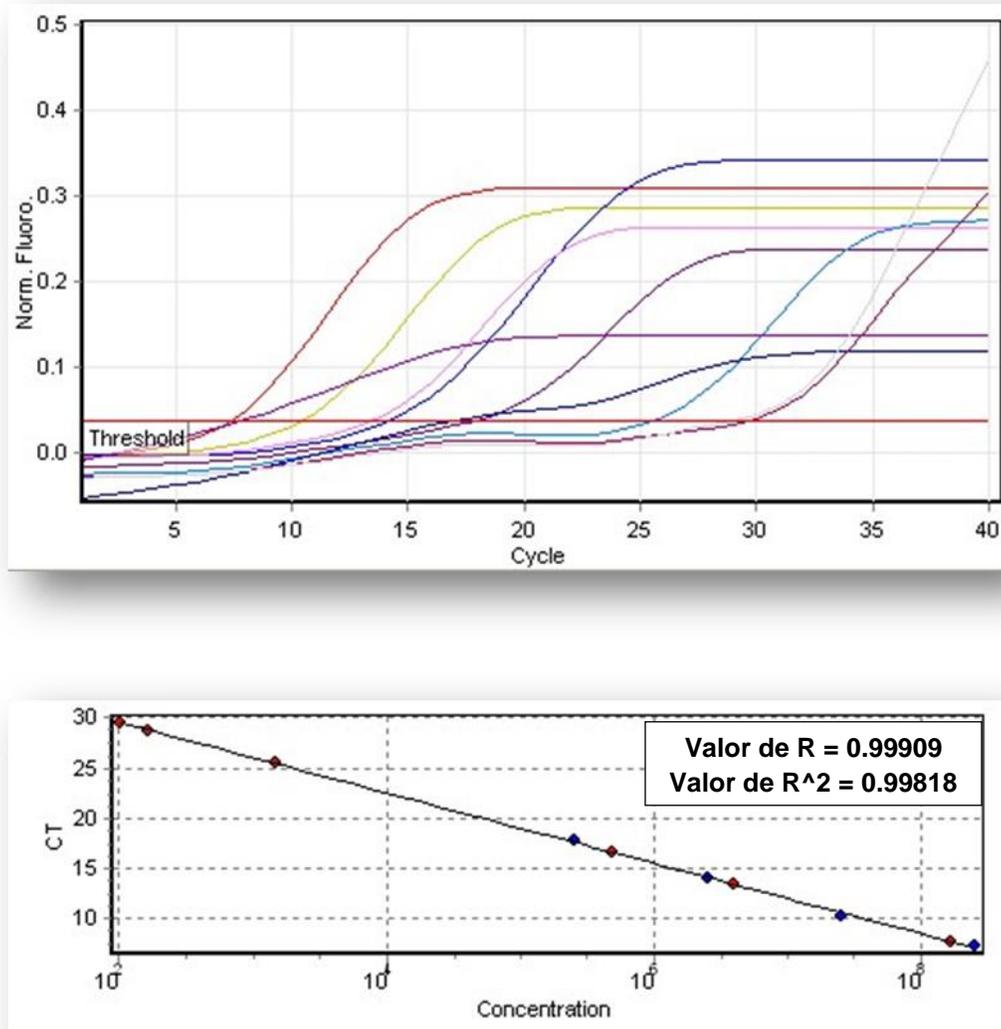
En la gráfica 26 se observan representados los valores de Ct del cuadro X, en el eje de las "x" se observan los ciclos de amplificación, mientras que en el eje de las "y" se observa la fluorescencia presentada por cada muestra. En la gráfica de escala absoluta se observan los valores de Ct y la concentración logarítmica, observando también el valor de R y R² muy cercanos al 1.

Cuadro 17. Valores de Ct y de la concentración de la RT-PCR de los hisopos nasales al día 7 pos inoculación de los tres grupos experimentales

No.	Color	Nombre	Tipo	Ct	Concentración estimada (copias/μl)	Concentración calculada (copias/μl)
1		STD 1	Curva estándar	7.30	251188643.150958	223312448.057915
2		STD 2	Curva estándar	10.35	25118864.3150958	29959670.6735109
3		STD 3	Curva estándar	14.11	2511886.43150958	2512969.00549047
4		STD 4	Curva estándar	17.70	251188.643150958	236789.750657313
5		Virus H5N2	Control positivo	13.41		3992722.21347668
6		Control positivo KIT	Control positivo	25.42		1477.18953397345
7		Hisopos nasales grupo INFECTADO día 7	Desconocida	16.61		486837.353658523
8		Hisopos nasales grupo CENTINELA día 7	Desconocida	7.73		167839963.396309
9		Hisopos nasales grupo CONTROL día 7	Desconocida	29.47		102.505740712571
10		H2O FREE	Control negativo	28.76		164.01830291589

En el cuadro 17 se observan los valores de Ct y la concentración calculada de los hisopos nasales tomados al día 7 pos inoculación de los 3 grupos experimentales, expresada en copias/μl. Del número 1 al 4 muestran los valores de la curva estándar, utilizada para la cuantificación de la RT-PCR. Con el número 5 y 6 se muestran los valores de los controles positivos, mientras que con el número 10 se muestran los valores del control negativo, con un Ct de 28.76, por lo que el grupo experimental infectado y centinela fueron positivos a la RT-PCR para este día pos inoculación, ya que su Ct es de 16.61 y 7.73 respectivamente.

Figura 27. Gráfica de RT-PCR de los hisopos nasales tomados al día 7 pos inoculación de los tres grupos experimentales



En la gráfica 27 se observan representados los valores de Ct del cuadro X, en el eje de las “x” se observan los ciclos de amplificación, mientras que en el eje de las “y” se observa la fluorescencia presentada por cada muestra. En la gráfica de escala absoluta se observan los valores de Ct y la concentración logarítmica, observando también el valor de R y R² muy cercanos al 1.

- AISLAMIENTO VIRAL

De los resultados positivos de la RT-PCR fueron seleccionados dos órganos clave en la patogenia del virus de influenza en la infección porcina, la tráquea del grupo experimental infectado y el pulmón del grupo experimental centinela, para el aislamiento viral en embrión de pollo. En el cuadro 18 se muestran los resultados obtenidos en el primer y segundo pase de la inoculación, colectando el líquido alantoideo a las 48 h pos inoculación, donde la mayoría de los individuos murió, como se muestra en el cuadro 19. El inóculo de sobrenadante de tráquea del grupo experimental infectado fue positivo al aislamiento viral desde el primer pase, con un título de 1:32 UHA, aumentando el título viral al segundo pase con 1:64 UHA, mientras que el sobrenadante de pulmón del grupo experimental centinela no mostró aglutinación al primer pase sino hasta el segundo pase, con un título de 1:8 UHA.

Los controles permanecieron como se esperaba; por un lado el control negativo no mostró aglutinación en ninguno de los casos, mientras que el control positivo del virus *A/Swine/México/EdoMex/DMZC03/2015/H5N2* mantuvo un título de 1:256 UHA para ambos pases.

Cuadro 18. Titulación por hemoaglutinación en microplaca del líquido alantoideo de los embriones colectado a las 48 h pos inoculación en el primer y segundo pase.

Inoculaciones	Titulación al primer pase		Titulación al segundo pase	
	Dilución	Título UHA	Dilución	Título UHA
Sin inoculación (control negativo)	-	-	-	-
Virus H5N2 A/Swine/México/EdoMex/DMZC03/2015/H5N2 (control positivo)	1:256	256	1:256	256
Tráquea grupo INFECTADO	1:32	32	1:64	64
Pulmón grupo CENTINELA	-	-	1:8	8

En el cuadro 18 se observan los resultados de la titulación por hemoaglutinación en microplaca del líquido alantoideo colectado a las 48 h pos inoculación tanto del primer pase como del segundo pase. El control negativo permaneció sin hemoaglutinar, mientras que el control positivo del virus H5N2 mantuvo un título constante de 1:256 UHA en ambos pases. El sobrenadante de la tráquea del grupo experimental infectado aumentó su título al segundo pase quedando en 1:64 UHA. El sobrenadante de pulmón del grupo experimental centinela no presentó título al primer pase, sino hasta el segundo con 1:8 UHA.

Cuadro 19. Relación de muertes de los embriones de pollo inoculados a las 24, 48 y 72 h post inoculación

Inoculaciones	24 h		48 h		72 h	
	1er pase	2do pase	1er pase	2do pase	1er pase	2do pase
Sin inoculación (control negativo)						
Virus H5N2 A/Swine/México/EdoMex/DMZC03/2015/H5N2 (control positivo)	1/4		3/4	4/4		
Tráquea grupo INFECTADO		1/4	4/4	3/4		
Pulmón grupo CENTINELA	1/4	1/4	3/4	3/4		

n/n = Embrión de pollo muerto / número total de embriones

Cuatro embriones por grupo inoculado = **n/4**

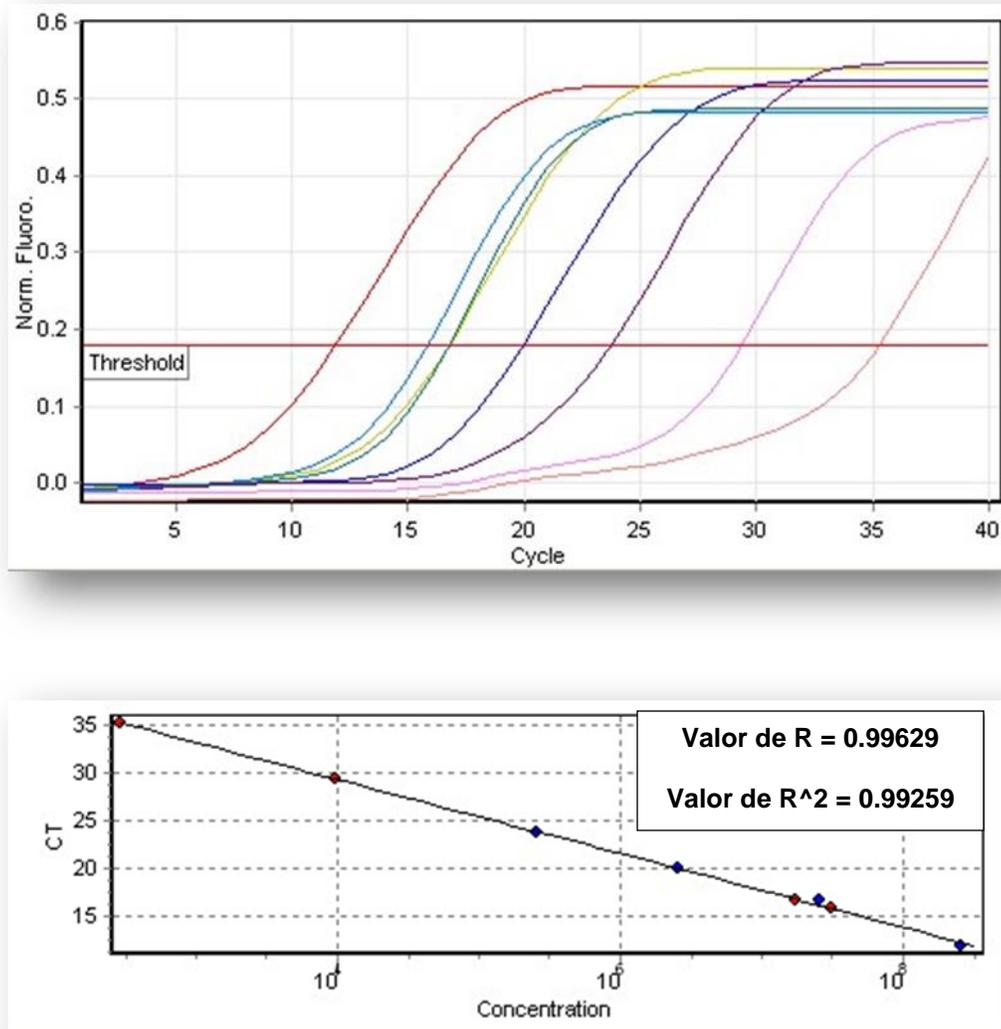
En el cuadro 19 se muestran los resultados de las muertes a las 24, 48 y 72 h post inoculación, de los embriones de pollo inoculados en el primer y segundo pase. La mayoría de los individuos murió a las 48 h post inoculación para los tres grupos inoculados.

Cuadro 20. Valores de Ct y de la concentración de la RT-PCR del líquido alantoideo colectado a las 48 h al segundo pase post inoculación de los resultados positivos a la RT-PCR

No.	Color	Nombre	Tipo	Ct	Concentración estimada (copies/μl)	Concentración calculada (copies/μl)
1		STD 1	Curva estándar	11.91	251188643.150958	316471048.140571
2		STD 2	Curva estándar	16.79	25118864.3150958	17422287.980847
3		STD 3	Curva estándar	19.98	2511886.43150958	2610884.54533634
4		STD 4	Curva estándar	23.75	251188.643150958	276549.679154437
5		Control positivo KIT	Control positivo	29.38		9736.83340244021
6		Líquido alantoideo de TRÁQUEA grupo INFECTADO, al segundo pase	Desconocido	15.86		30261508.7265157
7		Líquido alantoideo de PULMÓN grupo CENTINELA, al segundo pase	Desconocido	16.79		17337694.9064702
8		H2O FREE control negativo	Control negativo	35.29		289.068881026919

En el cuadro 20 se observan los valores de Ct y la concentración calculada de los hisopos nasales tomados al día 7 pos inoculación de los 3 grupos experimentales, expresada en copias/μl. Del número 1 al 4 muestran los valores de la curva estándar, utilizada para la cuantificación de la RT-PCR. Con el número 5 y 6 se muestran los valores de los controles positivos, mientras que con el número 10 se muestran los valores del control negativo, con un Ct de 28.76, por lo que el grupo experimental infectado y centinela fueron positivos a la RT-PCR para este día pos inoculación, ya que su Ct es de 16.61 y 7.73 respectivamente.

Figura 28. Gráfica de RT-PCR del líquido alantoideo colectado a las 48 h post inoculación en el segundo pase de los órganos positivos a la RT-PCR



En la gráfica 31 se observan representados los valores de Ct del cuadro X, en el eje de las “x” se observan los ciclos de amplificación, mientras que en el eje de las “y” se observa la fluorescencia presentada por cada muestra. En la gráfica de escala absoluta se observan los valores de Ct y la concentración logarítmica, observando también el valor de R y R² muy cercanos al 1.

DISCUSIÓN

El concepto “Una sola salud” fue introducido a comienzos de la década del año 2000, resumiendo en pocas palabras una noción conocida desde hace más de un siglo, a saber que la salud humana y la sanidad animal son interdependientes y están vinculadas a los ecosistemas en los cuales coexisten. La OIE apoya y aplica este enfoque como un planteamiento colaborativo global para comprender los riesgos que deben afrontar la salud humana y la sanidad animal, respecto a los animales domésticos o silvestres, y los ecosistemas (OIE, 2017).

En las últimas décadas las enfermedades zoonóticas emergentes y reemergentes tales como tuberculosis, brucelosis, rabia, chicungunya, dengue, ZIKA, Nipah e influenza aviar han sido de gran preocupación y de vital importancia a nivel mundial, es por ello que las principales organizaciones OMS, FAO y OIE participan activamente en la organización y aplicación del control de estas enfermedades, englobando y aplicando siempre el concepto “Una sola salud” (Who, 2006).

Las presentaciones epidémicas o pandémicas de la influenza humana, aviar y porcina a menudo han causado grandes daños a la sociedad humana y la economía global (Huang, King, & Yang, 2009).

El virus de influenza aviar H5N2 aislado en cerdos por nuestro grupo de investigación en 2014 y reportado ante las autoridades bajo el formato SIVE en 2015, debe ser considerado como una enfermedad emergente ya que el salto taxonómico de ave a cerdo ha sido el origen de varias pandemias (Short *et al.*, 2015). Así mismo el grupo de investigación ha realizado la filogenia de los aislados

y se encontraron en el clado de 1994 y 1995, lo cual coincide con los brotes de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad en 1994 que mutó a H5N2 aviar de alta patogenicidad en 1995 en México (SAGARPA – SENASICA, 2016). Dicha mutación pudo conferirle al virus H5N2 aviar la habilidad de cruzar la barrera de especies, dando un salto taxonómico de aves a cerdos, tal y como se ha demostrado con otros subtipos aviares (Karasin *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2009; Short *et al.*, 2015).

En un estudio realizado por Escorcía *et al.*, se demostró que los virus H5N2 de baja patogenicidad en México, están constantemente sometidos a deriva antigénica (Escorcía *et al.*, 2010).

El virus H5N2 aviar ya ha sido reportado en Corea por Lee *et al.*, quienes realizaron experimentos con cerdos para demostrar el comportamiento de sus aislados Sw/Korea/C13/08 y Sw/Korea/C12/08, donde el primero se encontraba mayormente adaptado al cerdo, transmitiéndose más fácilmente en comparación con el segundo (Lee *et al.*, 2009). La importancia de demostrar el comportamiento de un nuevo virus en una especie en México es de gran relevancia en todo sentido, por ello esta investigación se basa en demostrar el comportamiento del virus aislado A/Swine/México/EdoMex/DMZC/2015/H5N2 en cerdos.

El cerdo puede ser visto desde diversos enfoques como un amplificador, un mezclador, un hospedero accidental o un huésped intermediario en la enfermedad por el virus de influenza, entre otros enfoques, esto dependerá del sentido

ecológico, virológico o epidemiológico con que se analice (Caron *et al.*, 2009; Graaf & Fouchier, 2014; Janke, 2014; Short *et al.*, 2015).

La infección en cerdos por el virus de influenza con cepas que provienen de aves, humanos u otras especies; coloca al cerdo como un hospedero propicio para generar nuevas variantes virales patogénicas, debido a la baja semiología que se genera en esta especie, de tal manera que la influenza en cerdos adquiere alto impacto desde un aspecto epidemiológico, pudiendo generar nuevas cepas virales de alta patogenicidad para el ser humano (Cheung & Poon, 2007).

El comportamiento clínico de los cerdos en nuestro estudio demostró tener una semiología baja, tanto en el grupo experimental infectado como en el grupo experimental centinela, generando signos clínicos leves tal y como se ha observado en otros estudios realizados, donde la infección en cerdos por virus aviares tiene un curso subclínico o con baja semiología (De Vleeschauwer *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009).

Experimentalmente, el título y la vía de inoculación pueden afectar el desarrollo de la infección, la enfermedad clínica y la aparición de lesiones. En la inoculación intranasal, los cerdos pueden comer gran parte del inóculo, reduciendo el volumen del mismo que pueda llegar a los pulmones, en contraste con la inoculación intratraqueal (Janke, 2014). En nuestro estudio la inoculación se realizó de manera intranasal, pudiendo reducirse el volumen del inóculo al existir la posibilidad de ingestión por parte de los lechones, sin embargo, al observar las lesiones macroscópicas en la necropsia fue muy evidente la infección viral en los cerdos

del grupo experimental infectado y de manera más severa en el grupo experimental centinela, mientras que el grupo experimental control no presentaba lesiones macroscópicas aparentes.

En cuanto a la histopatología las lesiones microscópicas observadas demuestran una infección viral y en algunos individuos tanto del grupo experimental infectado como del grupo experimental centinela hubo asociación virus – bacteria, los órganos mayormente afectados fueron los pulmones, específicamente en el lóbulo apical, en donde fueron observadas las lesiones particulares que se aprecian en diversos estudios por el virus de influenza. Janke en su estudio hace referencia a la importancia de la histopatología como una valiosa herramienta de diagnóstico debido a que las lesiones producidas por el virus de influenza son muy particulares, sobre todo a nivel pulmonar (Janke, 2014). De Vleeschauwer *et al.*, realizaron un estudio comparativo en cerdos entre la infección por el virus H1N1 endémico en la población porcina y el virus H5N2 aviar de baja patogenicidad, en ambas infecciones se observaron lesiones en la histopatología, pero la severidad de las lesiones observadas era notablemente mayor en la infección por el subtipo H1N1 con respecto a las producidas por el subtipo H5N2, siendo estas, moderadas o leves (De Vleeschauwer *et al.*, 2009). Con la realización de los promedios, en nuestro estudio se observa tanto en el grupo experimental infectado y el grupo experimental centinela, lesiones de leves a moderadas, sin llegar a lesiones severas. Mientras que el grupo control permaneció libre de algunas lesiones o con lesiones leves.

Los lechones han demostrado desempeñar un papel clave en la transmisión de los virus de influenza dentro de las producciones porcinas, ya que representan un depósito continuo del virus, tal y como lo demostraron Corzo *et al.*, al comprobar que lechones recién destetados con protección materna desafiados con virus de influenza, son capaces de infectarse y secretar por medio de aerosoles, virus infectante (Corzo, Allerson, Gramer, Morrison, & Torremorell, 2014). Sin embargo, en nuestro estudio realizado en lechones de 21 días de edad no hubo seroconversión comprobada por IH para el virus H5N2, todos los sueros permanecieron por debajo del punto de corte de 1:80 UHA. Jung *et al.*, refiere en su estudio que a pesar que la prueba de inhibición de la hemoaglutinación es la más comúnmente usada para detectar anticuerpos contra la HA en sueros animales y humanos, el ensayo no resulta ser confiable para detectar anticuerpos contra virus aviares en sueros de mamíferos porque los inhibidores de la hemoaglutinación, incluso inactivados, pueden causar falsos negativos (Jung, Song, & Kang, 2007).

En otro estudio realizado por De Vleeschauwer & Van Reeth determinaron que la inmunidad dada por virus de influenza porcina H1N1 o H3N2 resulta ser una barrera para la infección por virus aviares. En el estudio se inocularon a los cerdos (un grupo inmunizados con virus porcinos y otro sin inmunización) vía intranasal con alguno de los subtipos H4N6, H5N2 o H7N1 aviares, los cerdos no inmunizados presentaron seroconversión, mientras que en el grupo de los cerdos inmunizados, 12 cerdos de 29 mostraron seroconversión demostrada por IH. Sin embargo los títulos de anticuerpos para los virus aviares fueron bajos tanto en los

cerdos no inmunizados así como los inmunizados (Vleeschauwer & Reeth, 2010). En nuestro estudio los tres grupos experimentales mostraron anticuerpos maternos desde el día cero para el subtipo H1N1, por lo que es posible que la protección materna haya podido interferir con la producción de anticuerpos contra el subtipo H5N2 aviar. Ambas posibilidades, tanto la inmunidad materna como la detección por IH pudieron afectar la producción y detección de anticuerpos contra el virus en estudio.

La semiología clínica y las lesiones observadas a la necropsia y a la histopatología mostraban una infección viral, sugerente a influenza, sin embargo, la serología no evidenciaba la presencia de anticuerpos contra el virus en estudio, el siguiente paso fue detectar la presencia del virus de influenza en los órganos seleccionados y la posible excreción nasal del virus, por medio de PCR tiempo real.

En nuestro estudio se utilizó el Kit "Swine Influenza Virus RNA Test Kit" de Life Technologies, que va dirigido a detectar la proteína de matriz (Proteína M) del virus de influenza. En estudios realizados por Pippig *et al.*, realizaron la detección de los principales virus de influenza con mayor prevalencia en Alemania. Examinaron hisopos nasales y muestras de órganos de cerdos con enfermedad respiratoria para la detección del genoma viral, basándose en el gen de la proteína de matriz (Pippig & Ritzmann, 2016), al igual que el presente estudio.

Los resultados positivos de tráquea del grupo experimental infectado, pulmón y duodeno del grupo experimental centinela que obtuvimos en la PCR en tiempo real demostraron la presencia del virus de influenza en los individuos

experimentales, de igual manera se comprobó la excreción del virus en los individuos infectados al día 6 post inoculación y al día 7 post inoculación se detectó en el grupo experimental infectado y centinela, con esto se demuestra la transmisión intraespecie, donde es posible que el virus ya se haya adaptado a su nuevo hospedero, el cerdo, facilitando la diseminación de virus H5N2 aviar en la población porcina y adquiriendo cambios en su genoma por medio de deriva antigénica, generando nuevas variantes virales patogénicas (Cheung & Poon, 2007). En el caso de los individuos del grupo experimental control todas sus muestras fueron negativas a la RT-PCR.

Para corroborar los resultados obtenidos en la RT-PCR, se realizó el aislamiento viral en embrión de pollo titulando al virus por Hemoaglutinación en microplaca y posteriormente realizando la RT-PCR para confirmar la presencia del virus en el líquido alantoideo colectado, el virus obtenido fue enviado a secuenciar para comprobar la presencia del subtipo H5N2.

El aislamiento de virus en embrión de pollo es un método virológico clásico e internacional, con la inoculación en la cavidad alantoidea y el uso de líquido alantoideo para replicar los virus de influenza (Tang *et al.*, 2014), lo cual permitió demostrar la presencia del virus activo en muestras de cerdos infectados experimentalmente.

CONCLUSIONES

La observación del cuadro subclínico, así como la presentación de lesiones a la necropsia y reportadas en la histopatología, características de la infección viral, demuestran la infección de los grupos experimentales infectado y centinela.

La identificación viral por RT-PCR demuestra la presencia del virus al menos en dos órganos claves en la infección por influenza, como lo son la tráquea y el pulmón, la primera del grupo infectado y el segundo del grupo centinela, de igual manera se demostró la excreción viral en los días 6 y 7 post infección.

Con base a los resultados positivos de los órganos en la RT-PCR se realizó el aislamiento viral, que confirmó la presencia del virus infectante en los órganos de los cerdos experimentales.

REFERENCIAS

- Alexander, D. J. (2000). A review of avian influenza in different bird species, 74.
- Alcántar P, Robles F, Chevez JC. Experiencias en el análisis del valor del ct point (PCR tiempo real) para la Caracterización del virus de PRRS por medio de RFLP's. XLV Congreso Nacional AMVEC del 05 al 08 de Agosto de 2010, Acapulco, Guerrero.
- Alfonso, P. (2006). EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LA INFLUENZA AVIAR, 28(3), 137–146.
- Arbeláez, G., Calderón, D., Rincón, M., Lora, Á., & Mercado, M. (2008). Improvement of two diagnostics methods for detection of influenza swine virus. *Universitas Scientiarum*, 13(1), 65–74.
- Argentino, S., & Revisi, C. D. E. (2004). INFLUENZA AVIAR Buscaglia, C., (6).
- Bai, G., Chittaganpitch, M., Kanai, Y., Li, Y., & Auwanit, W. (2009). Biochemical and Biophysical Research Communications Amantadine- and oseltamivir-resistant variants of influenza A viruses in Thailand. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(3), 897–901.
<http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.071>
- Baumann, J., Kouassi, M., Foni, E., & Klenk, H. (2016). H1N1 Swine Influenza Viruses Differ from Avian Precursors by a, 90(3), 1569–1577.
<http://doi.org/10.1128/JVI.02332-15.Editor>

- Berhane, Y., Ojkic, D., Neufeld, J., Leith, M., Hisanaga, T., Kehler, H., ...
Wojcinski, H. (2010). Molecular Characterization of Pandemic H1N1 Influenza
Viruses Isolated from Turkeys and Pathogenicity of a Human pH1N1 Isolate in
Turkeys Caracterizacio ´ n Molecular de los Virus de Influenza Pande ´ mica
H1N1 Aislados de Pavos y la Patogenicidad de un A, 54(4).
- Britain, G. (2017). The Matrix Protein Gene Determines Amantadine-Sensitivity of
Influenza Viruses, 22–24.
- Brown, I. H. (2000). The epidemiology and evolution of in ´ uenza viruses in pigs,
74.
- Callan, R. J., Early, G., Kida, H., & H, V. S. (2017). The appearance of H3
influenza viruses in seals, (1995), 199–203.
- Caron, A., Gaidet, N., Garine-wichatitsky, M. De, Morand, S., & Cameron, E. Z.
(2009). Infection , Genetics and Evolution Evolutionary biology , community
ecology and avian influenza research, 9, 298–303.
<http://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.12.001>
- Causey, D., & Edwards, S. V. (2008). Ecology of Avian Influenza Virus in Birds,
99508, 29–33. <http://doi.org/10.1086/524991>
- Chao, D., Cheng, K., Li, T., Wu, T., Chen, C., Chen, J., ... Hsieh, Y. (2011).
Serological Evidence of Subclinical Transmission of the 2009 Pandemic H1N1
Influenza Virus Outside of Mexico, 6(1).
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0014555>

- Cheung, T. K. W., & Poon, L. E. O. L. M. (2007). *Biology of Influenza A Virus*, 25, 1–25. <http://doi.org/10.1196/annals.1408.001>
- Cobos ML, Castañeda RA. 2005. *Manual de Prácticas de Laboratorio de Inmunología*, Distrito Federal, México: FMVZ UNAM.
- Cong, Y. L., Pu, J., Liu, Q. F., Wang, S., Zhang, G. Z., Zhang, X. L., ... Liu, J. H. (2017). Antigenic and genetic characterization of H9N2 swine influenza viruses in China, (2007), 2035–2041. <http://doi.org/10.1099/vir.0.82783-0>
- Córdoba VJL, Valdespin GJL, Ponce de León RS. 2010. *La Epidemia de influenza A/H1N1 en México*. México: Editorial Médica Panamericana.
- Corzo, C. A., Allerson, M., Gramer, M., Morrison, R. B., & Torremorell, M. (2014). Detection of Airborne Influenza A Virus in Experimentally Infected Pigs With Maternally Derived Antibodies, 61, 28–36. <http://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01367.x>
- De Vleeschauwer, A., Atanasova, K., Van Borm, S., van den Berg, T., Rasmussen, T. B., Uttenthal, ??se, & Van Reeth, K. (2009). Comparative pathogenesis of an avian H5N2 and a swine H1N1 influenza virus in pigs. *PLoS ONE*, 4(8), 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0006662>
- Del Catillo CE, Gómez AF. 2010. *Texto y Cuaderno de trabajo Laboratorio de Virología*. Distrito Federal, México: FMVZ UNAM.
- Dong, G., Luo, J., Zhang, H., Wang, C., Duan, M., Deliberto, T. J., ... He, H.

(2011). Phylogenetic Diversity and Genotypical Complexity of H9N2 Influenza A Viruses Revealed by Genomic Sequence Analysis, 6(2).
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0017212>

Edition, F. (n.d.). *FENNER ' S VETERINARY*.

Escorcía, M., Carrillo-sánchez, K., March-mifsut, S., Chapa, J., Lucio, E., & Nava, G. M. (2010). Impact of antigenic and genetic drift on the serologic surveillance of H5N2 avian influenza viruses, 1994, 0–7.

Gaidet, N., Cattoli, G., Hammoumi, S., Newman, S. H., Hagemeyer, W., John, Y., ... Mshelbwala, J. H. (2008). Evidence of Infection by H5N2 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Healthy Wild Waterfowl, 4(8), 1–9.
<http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000127>

González CT, Ramírez MH, Stephano HA, Espino RG. 1990. Evaluación serológica del virus de influenza porcina en cerdos de 10 granjas de 5 estados de la república mexicana. Memorias XXV Congreso Nacional de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos AC, Puerto Vallarta Jalisco, México.

Graaf, M. De, & Fouchier, R. A. M. (2014). Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis, 33(8), 823–841.

Gramer, M. R. (1999). Non refereed Defining swine influenza virus, 157–160.

Guidelines, W. H. O., Management, P., Influenza, P., Viruses, I., & February, R. (2010). WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic

Influenza A (H1N1) 2009 and other Influenza Viruses Revised February 2010
Part I, (February), 1–32.

Hinshaw, V. S., Air, G. M., Gibbs, A. J., Graves, L., & Prescott, B. (1982). Antigenic and Genetic Characterization of a Novel Hemagglutinin Subtype of Influenza A Viruses from Gulls, *42*(3), 865–872.

Heather L, Van Epps. 2006. Influenza: exposing the true killer. *J Exp Med* 203(4):803.

Huang, J.-W., King, C.-C., & Yang, J.-M. (2009). Co-evolution positions and rules for antigenic variants of human influenza A/H3N2 viruses. *BMC Bioinformatics*, 10(Suppl 1), S41. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-10-S1-S41>

Janke, B. H. (2014). Influenza A Virus Infections in Swine: Pathogenesis and Diagnosis, *51*(2), 410–426. <http://doi.org/10.1177/0300985813513043>

Jia, D., Rahbar, R., Chan, R. W. Y., Lee, S. M. Y., Chan, M. C. W., Xuhao, B., ... Fish, E. N. (2010). Influenza Virus Non-Structural Protein 1 (NS1) Disrupts Interferon Signaling, *5*(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0013927>

Jung, K., Song, D., & Kang, B. (2007). Serologic surveillance of swine H1 and H3 and avian H5 and H9 influenza A virus infections in swine population in Korea, *79*, 294–303. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.12.005>

Karasin, A. I., Brown, I. A. N. H., Carman, S., & Olsen, C. W. (2000). Isolation and Characterization of H4N6 Avian Influenza Viruses from Pigs with Pneumonia in Canada, *74*(19), 9322–9327.

- Karasin, A. I., Landgraf, J., Swenson, S., Erickson, G., Goyal, S., Woodruff, M., ... Olsen, C. W. (2002). Genetic Characterization of H1N2 Influenza A Viruses Isolated from Pigs throughout the United States, *40*(3), 1073–1079. <http://doi.org/10.1128/JCM.40.3.1073>
- Karasin, A. I., West, K., Carman, S., & Olsen, C. W. (2004). Characterization of Avian H3N3 and H1N1 Influenza A Viruses Isolated from Pigs in Canada, *42*(9), 4349–4354. <http://doi.org/10.1128/JCM.42.9.4349>
- Koszalka, P., Tilmanis, D., & Hurt, A. C. (2017). Influenza antivirals currently in late- - phase clinical trial, (January), 240–246. <http://doi.org/10.1111/irv.12446>
- Krauss, S., Obert, C. A., Franks, J., Walker, D., Jones, K., Seiler, P., ... Webster, R. G. (2007). Influenza in Migratory Birds and Evidence of Limited Intercontinental Virus Exchange, *3*(11). <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030167>
- Lebarbenchon, C., Feare, C. J., Renaud, F., Thomas, F., & Gauthier-clerc, M. (2010). Persistence of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Natural Ecosystems, *16*(7), 1057–1062. <http://doi.org/10.3201/eid1607.090389>
- Lee, J. H., Pascua, P. N. Q., Song, M., Baek, Y. H., Kim, C., Choi, H., ... Choi, Y. K. (2009). Isolation and Genetic Characterization of H5N2 Influenza Viruses from Pigs in Korea □, *83*(9), 4205–4215. <http://doi.org/10.1128/JVI.02403-08>
- Li, S., Zhou, Y., Zhao, Y., Li, W., Song, W., & Miao, Z. (2015). Avian influenza H9N2 seroprevalence among pig population and pig farm staff in Shandong ,

China, 2–8. <http://doi.org/10.1186/s12985-015-0265-9>

Lin, S., Kappes, M. A., Chen, M., Lin, C., & Wang, T. (2017). Distinct susceptibility and applicability of MDCK derivatives for influenza virus research, 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0172299>

Ma, W., Kahn, R. E., & Richt, J. A. (2009). The pig as a mixing vessel for influenza viruses : Human and veterinary implications, 3(1), 158–166.

Ma, W., Vincent, A. L., Gramer, M. R., Brockwell, C. B., Lager, K. M., Janke, B. H., ... Webby, R. J. (2007). Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States, 104(52).

Mc Cauley J.W, Hongo S, et al. Family Orthomyxoviridae. In Andrew M. Q. King, Michael J. Adams, eds. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA: Academic Press, 2012.

Makarova, N. V, Kaverin, N. V, Krauss, S., Senne, D., & Webster, R. G. (2017). Transmission of Eurasian avian H2 influenza virus to shorebirds in North America, (1999), 3167–3171.

Monto, A. S., Mckimm-breschkin, J. L., Macken, C., Hampson, A. W., Hay, A., Klimov, A., ... Zambon, M. (2006). Detection of Influenza Viruses Resistant to Neuraminidase Inhibitors in Global Surveillance during the First 3 Years of Their Use, 50(7), 2395–2402. <http://doi.org/10.1128/AAC.01339-05>

Morens, D. M., Taubenberger, J. K., & Fauci, A. S. (2010). The 2009 H1N1

Pandemic Influenza Virus: What Next?, 1(4), 1–5.
<http://doi.org/10.1128/mBio.00211-10>. Copyright

Muñoz-medina, J. E., Sánchez-vallejo, C. J., Méndez-tenorio, A., Monroy-muñoz, I. E., Angeles-martínez, J., Coy-arechavaleta, A. S., ... Díaz-quiñonez, J. A. (2015). In Silico Identification of Highly Conserved Epitopes of Influenza A H1N1 , H2N2 , H3N2 , and H5N1 with Diagnostic and Vaccination Potential, 2015.

Nicholson, K. G., Wood, J. M., & Zambon, M. (2003). *Influenza*, 362, 1733–1745.

OFFLU [Febrero 2015]. Estados Unidos de Norteamérica: OIE FAO
<http://www.offlu.net/> [última consulta 01 junio 2017].

OIE [Mayo 2017]. <http://www.oie.int/es/para-los-periodistas/enfermedades-animales/>

OIE [Mayo 2017]. <http://www.oie.int/es/para-los-periodistas/onehealth-es/>

OIE [Mayo 2017]. <http://www.oie.int/doc/ged/D13948.PDF>

Olsen, C. W. (2015). The emergence of novel swine influenza viruses in North America, 85(2002), 199–210.

OPS Organización Panamericana de la Salud [Mayo, 2017].
<http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones%20virtuales/GripeApubW/introduccion.html>

Pianciola, L., González, G., Mazzeo, M., Navello, M., Quidel, N., & Bulgheroni, F.

(2010). Desempeño de la prueba de inmunofluorescencia directa en el diagnóstico del virus Influenza A (H1N1), 27(6), 452–455.

Plonait H, Bickhardt K.2001. Manual de las Enfermedades del Cerdo. España: Acriba S.A.

Pippig, J., & Ritzmann, M. (2016). Influenza A Viruses Detected in Swine in Southern Germany after the H1N1 Pandemic in 2009, 555–568. <http://doi.org/10.1111/zph.12264>

Rajao, D. S., & Vincent, A. L. (2015). Swine as a Model for Influenza A Virus Infection and Immunity, 56(1), 44–52. <http://doi.org/10.1093/ilar/ilv002>

Reeth, K. Van, Braeckmans, D., Cox, E., Borm, S. Van, Berg, T. Van Den, Goddeeris, B., & Vleeschauwer, A. De. (2009). Prior infection with an H1N1 swine influenza virus partially protects pigs against a low pathogenic H5N1 avian influenza virus, 27, 6330–6339. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.021>

Reina, J. (2017). Revisión Favipiravir , un nuevo concepto de fármaco antiviral frente a los virus gripales, 30(2), 79–83.

Rejmanek, D., Hosseini, P. R., Mazet, J. A. K., & Daszak, P. (2015). Evolutionary Dynamics and Global Diversity of Influenza A Virus, 89(21), 10993–11001. <http://doi.org/10.1128/JVI.01573-15.Editor>

Rural, D., & Alimentacion, P. Y. (2007). SECRETARIA DE AGRICULTURA , GANADERIA ,

SAGARPA – SENASICA [Junio, 2016]. <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/campana-nacional-para-la-prevencion-control-y-erradicacion-de-la-influenza-aviar-notificable>.

Saito, R., Oshitani, H., Masuda, H., & Suzuki, H. (2002). Detection of Amantadine-Resistant Influenza A Virus Strains in Nursing Homes by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis with Nasopharyngeal Swabs, *40*(1), 84–88. <http://doi.org/10.1128/JCM.40.1.84>

Sánchez MDM, Carreón NR, Palacios AJM. 2010. Comparación de dos métodos diagnósticos para la detección del virus de influenza porcina. *Revista Veterinaria México* 41(1): 45-58.

Schumulke, García-Sastre. *Virus, A.* (2010). *NIH Public Access*, 12(7), 873–880. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01475.x.Evasion>

Short, K. R., Richard, M., Verhagen, J. H., Riel, D. Van, Schrauwen, E. J. A., Brand, J. M. A. Van Den, ... Herfst, S. (2015). One health , multiple challenges : The inter-species transmission of in fl uenza A virus. *ONEHLT*, 1, 1–13. <http://doi.org/10.1016/j.onehlt.2015.03.001>

Simonsen, L., Tamerius, J., & Miller, M. A. (2011). Characterizing the Epidemiology of the 2009 Influenza A / H1N1 Pandemic in Mexico, *8*(5). <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000436>

Stephenson, I., & Nicholson, K. G. (2001). *Influenza : vaccination and treatment*, (3), 1282–1293.

Straw EB, D'Allaire S, Mengeling LW, Taylor JD. 2002. Enfermedades del Cerdo. 8° Edición. Buenos Aires, Argentina: Intermedica.

Tang, S., Li, Y., Xia, H., Huang, J., Zhang, Z., & Zhu, N. (2014). Improved methods for isolation of avian influenza virus. *Journal of Virological Methods*, 210(44), 22–25. <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.09.015>

Tern, V. A., & Africa, S. (1966). The isolation and classification of Tern virus : *Influenza*, 309–320.

Tognotti, E. (2009). Emerging Problems in Infectious Diseases Influenza pandemics : a historical retrospect, 1–4.

Trebbien, R., Larsen, L. E., & Viuff, B. M. (2011). Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. *Virology Journal*, 8(1), 434. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-8-434>

Trigo TF.2015. Capítulo 2 Aparato respiratorio. En: Trigo Tavera Francisco J. Patología Sistémica Veterinaria. Sexta Edición. México: Mc Graw Hill Interamericana.

Tsukamoto, M., Hiroi, S., Adachi, K., & Kato, H. (2011). Antibodies against swine influenza virus neutralize the pandemic influenza virus A / H1N1, 209–214. <http://doi.org/10.3892/mmr.2011.410>

Vleeschauwer, A. De, & Reeth, K. Van. (2010). Prior infection of pigs with swine influenza viruses is a barrier to infection with avian influenza viruses.

Veterinary Microbiology, 146(3-4), 340–345.
<http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.013>

Vries, R. P. De, Vries, E. De, Bosch, B. J., Groot, R. J. De, Rottier, P. J. M., & Haan, C. A. M. De. (2010). The influenza A virus hemagglutinin glycosylation state affects receptor-binding specificity, 403, 17–25.
<http://doi.org/10.1016/j.virol.2010.03.047>

Wahlgren, J., Waldenström, J., Sahlin, S., Haemig, P. D., Fouchier, R. A. M., Osterhaus, A. D. M. E., ... Olsen, B. (2008). Gene Segment Reassortment Between American and Asian Lineages of Avian Influenza Virus from Waterfowl in the Beringia Area, 8(6). <http://doi.org/10.1089/vbz.2007.0274>

Webster, R., Bean, W., Gorman, O., Chambers, T., & Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*, 56(1), 152–179. Retrieved from <http://mibr.asm.org/content/56/1/152.short>

Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., & Chambers, T. M. (1992). Evolution and Ecology of Influenza A Viruses, 56(1), 152–179.

Who. (2006). The Control of Neglected Zoonotic Diseases A route to poverty alleviation. *World Health*, (September 2005), 1–65. Retrieved from www.who.int/zoonoses/Report_Sept06.pdf

World organisation for animal health (homepage on the internet) Paris: Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (actualizado en mayo 2005) OIE lista “A”, gripe aviar (Citado el 14 de mayo de

2017). Disponible en: <http://www.oie.int/doc/ged/d6508.pdf>

Xu, X., Lindstrom, S., Ph, D., Gubareva, L. V, Ph, D., Deyde, V., ... Finelli, L. (2009). Triple-Reassortant Swine Influenza A (H1) in Humans in the United States, 2005–2009.

Yu, H., Hua, R., Wei, T., & Zhou, Y. (2008). Isolation and genetic characterization of avian origin H9N2 influenza viruses from pigs in China, 131, 82–92. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.02.024>

Zambon, M. C. (1999). Epidemiology and pathogenesis of influenza, 3–9.

Zimmerman JJ, Karriker AL, Ramirez A, Schwartz JK, Stevenson G. 2012. Diseases of Swine. 10th Edition. Iowa, EUA: Jon Wiley & Sons Inc.

Zohari, S., Neimanis, A., Härkönen, T., Moraeus, C., & Valarcher, J. F. (2014). Avian influenza A (H10N7) virus involvement in mass mortality of harbour seals (*Phoca vitulina*) in Sweden , March through October 2014, (October), 1–6.

ANEXO I. PREPARACIÓN DE SUSPENSIÓN DE ERITROCITOS AL 0.75 %

1. Colección de sangre con anticoagulante.
2. Vaciar a tubos de vidrio y agregar PBS.
3. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos.
4. Decantar el sobrenadante y adicionar PBS.
5. Lavar 2 veces o hasta que el líquido sobrenadante sea transparente.
6. Realizar una regla de tres:

Dónde:

n mL ----- 100%

X ----- 0.5%

Ejemplo:

Para la preparación de 10 mL de eritrocitos al 0.5 %, entonces:

10 mL ----- 100%

X ----- 0.5% = 0.05 mL

Entonces, se colocan 50 μ L (0.05 mL) de eritrocitos en 10 mL de PBS.

ANEXO II. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE LISIS PARA LA EXTRACCIÓN VIRAL

Para la preparación de lisis se utilizó el Buffer, Carrier y el RNA (como control interno del kit de Life technologies "Swine Influenza Virus RNA Test Kit," de RT-PCR) al igual que la siguiente fórmula para calcular la preparación de la misma:

$$N \times 0.56 \text{ ml} = Y \text{ ml}$$

$$Y \text{ ml} \times 10 \mu\text{l} / \text{ml} = Z \mu\text{l}$$

- n= número de muestras
- Y= Volumen calculado de Buffer AVL
- Z= Volumen de Carrier RNA Buffer AVE a agregar Buffer AVL

RNA para agregar, calculado de la siguiente manera:

$$2 \mu\text{l} \times \text{número de muestras}$$