



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DE UNA VACUNA MULTIVALENTE CONTRA EL VIRUS DE  
INFLUENZA PORCINA**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**PAOLA BELÉN BARRANCO BARBA**

**ASESORES:**

**Dr. JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT**

**Dr. RENÉ ALVARO SEGURA VELÁZQUEZ**



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

Me lo dedico a mí misma por el gran esfuerzo, tiempo y trabajo que dediqué durante este proyecto y por los 5 años que invertí en esta hermosa, extensa y noble carrera.

Se lo dedico a mi mamá, quien siempre está para mí, apoyándome y alentándome, que con gran esfuerzo y amor me dio mi mayor herencia que son mis estudios, gracias mamá.

A mi papá, a mi hermana que han estado y están ahí para mí en todo momento, apoyándome y alentándome, gracias.

A mi pareja Rodrigo que siempre me brinda apoyo, amor y su amistad.

A mi mascota Zoé siempre llenándome de alegría mis días, quien me acompaña en la carrera, de quien aprendí también y siempre me da amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. José Iván Sánchez Betancourt. Por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto para titularme, así como el apoyo, disposición y orientación siempre que lo requería, por la confianza en mí y no dejarme sola.

Al Dr. René Alvaro Segura Velázquez. Por todo su apoyo técnico, así como instruirme, orientado y aconsejado durante este trabajo, por su disposición en cada paso, también el permitirme durante este tiempo la estancia en el laboratorio de unidad de investigación, donde aprendí mucho.

A mi mamá Ma. Pilar Barba. Por su gran apoyo, consejos, esfuerzo, tiempo y paciencia, por levantarme el ánimo, estar siempre ahí, no dejarme sola, ayudarme cada fin de semana para alimentar y limpiar a los lechones, estar al pendiente y creer en mí.

Al Dr. Manuel Saavedra. Por haberme instruido y aconsejado y estar siempre dispuesto a ayudarme.

A la Dra. Jacquelynne Cervantes Torres. Por todo su apoyo técnico en la realización de trabajo y consejos brindados.

Al Dr. Gerardo Ramírez. Por permitirme la estancia de los lechones en los corrales, así como la disposición, el apoyo, consejo y confianza.

A la Dra. Adriana Ayón. Por su apoyo e instruirme durante la realización del proyecto.

A la MVZ. Andrea. Por haberme asesorado y capacitado para el manejo de los cerdos durante la toma de muestras.

Al PMVZ Rodrigo Acevedo García. Por su gran apoyo, confianza brindada, por siempre estar ahí para ayudarme, así como el tiempo, esfuerzo y dedicación durante la estancia de los lechones, por el manejo de los lechones cada vez que era necesario.

A la PMVZ Paula Villa. Por su tiempo y dedicación en el cuidado y mantenimiento de los lechones, así como haberme acompañado y apoyo en el manejo y procesamiento de muestras y su amistad brindada.

A M. en C. Julio César Magaña. Por su apoyo, asesoramiento y consejos, así como amistad brindada durante el proyecto.

A MVZ Jannet Guevara Cruz. Por su continuo apoyo, consejos y amistad brindada durante la realización del proyecto.

A M. Gabriela Vera. Por su apoyo, orientación y consejos, así como su amistad durante la realización del proyecto.

A la Dra. Mireya. Por su apoyo durante la realización de las necropsias de los lechones, el tiempo y dedicación a instruirme y enseñarme a identificar las lesiones microscópicas y dispuesta a ayudarme.

Al Dr. Benjamin Fuente. Por su apoyo, atención y disposición para la interpretación de resultados los estadísticos.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1. Historia del virus de influenza.....	2
2. Agente etiológico.....	5
2.1 Estructura.....	5
2.2 Nomenclatura.....	9
3.Ciclo de replicación celular del virus de influenza.....	10
4. Mecanismo evolutivos del virus influenza .....	14
4.1 Deriva antigénica.....	14
4.2 Cambio antigénico.....	14
5.Patogenia.....	15
6. Signos clínicos.....	16
7. Lesiones.....	17
7.1 Lesiones microscópicas.....	17
7.2 Lesiones macroscópicas.....	17

8. Diagnóstico de influenza.....	18
8.1 Diagnóstico diferencial.....	19
8.2 Pruebas de detección de antígeno.....	20
8.3 Pruebas de detección de anticuerpo.....	22
9. Tratamiento.....	23
10. Respuesta inmunológica del virus de influenza.....	24
10.1 Inmunidad mediada por anticuerpos.....	25
10.2 Inmunidad mediada por células.....	25
10.3 Anticuerpos maternos contra el virus de influenza.....	26
11. Control y prevención.....	28
12. Vacunación.....	28
12.1. Tipos de vacunas.....	31
12.1.1. Vacunas no replicativas.....	32
12.1.2. Vacunas replicativas.....	34
12.1.3. Vacunas experimentales.....	35
12.2. Programas de vacunación.....	36
13. Antecedentes.....	38
14. JUSTIFICACIÓN.....	39

15. HIPOTÉISIS.....	39
16. OBJETIVOS.....	40
16.1 Objetivos específicos.....	40
17. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
17.1 Replicación del virus.....	41
17.1.1. Titulación del virus.....	43
17.2 Formulación de la vacuna.....	45
17.3 Grupos experimentales.....	46
17.4 Vacunación.....	46
17.4.1 Primera dosis de aplicación.....	46
17.4.2 Segunda dosis de aplicación.....	46
17.5 Desafío.....	47
17.6 Toma de muestras.....	47
17.7 Inhibición de la hemaglutinación tipo $\beta$ .....	48
17.8 RT-PCR Tiempo real de muestra de hisopado nasal.....	52
17.8.1 Extracción de RNA.....	52
17.8.2 RT-PCR.....	53
17.9 RT-PCR Tiempo real muestras de pulmón, tráquea y tonsila.....	54

17.9.1 Extracción de RNA.....	54
17.9.2 RT-PCR.....	56
18. RESULTADOS.....	56
18.1 Prueba de Inhibición de hemaglutinación.....	56
18.2 Signos clínicos.....	60
18.3 Temperatura corporal de los cerdos.....	62
18.4 Lesiones microscópicas.....	63
18.5 RT-PCR.....	66
19. DISCUSIÓN.....	68
20. CONCLUSIÓN.....	74
21. RECOMENDACIÓN.....	74
22. REFERENCIAS.....	75

## **Índice de gráficos, tablas y figuras**

### **Figuras**

Figura 1. Estructura del virus de influenza.....	7
Figura 2. Ciclo de infección celular del virus de influenza tipo A.....	13
Figura 3. Esquema de patrones de aglutinación.....	44
Figura 4. Fundamento e interpretación de la prueba de inhibición de la hemaglutinación.....	51

Figura 5. Fundamento e interpretación de la prueba de inhibición de la hemaglutinación.....58

Figura 6. Lesiones histopatológicas observadas en los grupos desafiados.....65

### **Tablas**

Tabla 1. Importancia de las proteínas estructurales que conforman los segmentos del IAV en la vacunas.....8

Tabla 2. Vacunas contra IAV disponibles en México.....36

Tabla 3. Grupos experimentales.....46

### **Gráficas**

Grafica 1. Títulos de anticuerpos inducidos de los tres grupos.....59

Gráfica 2. Títulos de anticuerpos promedio de cada subtipo viral.....59

Grafica 3. Signos clínicos observados después de desafiar los cerdos con los 3 subtipos virales.....61

Gráfica 4. Temperatura corporal promedio registrada en los días posteriores al desafío.....62

Gráfica 5. Representación gráfica de la severidad y de las lesiones microscópicas presentes de cada tejido muestreado entre los tres grupos después del desafío...64

Gráfica 6. Representación gráfica de la excreción de virus detectados en hisopados nasales 8 días después de la infección.....66

Gráfica 7. Representación gráfica de la carga viral detectada en distintos órganos pertenecientes a los cerdos desafiados no vacunados.....67

## RESUMEN

BARRANCO BARBA PAOLA BELÉN. Evaluación de una vacuna multivalente contra el virus de influenza porcina (bajo la dirección de: Dr. José Ivan Sánchez Betancourt y Dr. René Alvaro Segura Velázquez).

La influenza porcina se presenta como una enfermedad respiratoria aguda, que se manifiesta con brotes de rápida propagación, causada por el virus de influenza tipo A, que pertenece a la familia Orthomyxoviridae. Los subtipos con mayor prevalencia son H1N1, H1N2 y H3N2. El crecimiento de las granjas porcinas ha hecho que el manejo de la influenza porcina sea un desafío, por la característica del virus de generar nuevos subtipos reagrupados de Influenza, teniendo en cuenta la capacidad evolutiva de los virus de influenza tipo A (IAV) y por su carácter zoonótico y endémico existe el riesgo de introducir el virus de influenza en otras regiones, lo que representa un riesgo para la salud pública y animal. Actualmente en México se encuentran disponibles comercialmente vacunas de virus inactivados; sin embargo, hay antecedentes donde se comprueba que existen cepas circulantes distintas a los subtipos que contienen estas vacunas comerciales, por lo que podrían no ser del todo eficientes. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad protectora que confiere una vacuna multivalente, homóloga a las cepas circulantes en México; para ello, se formaron tres grupos experimentales, donde el grupo A recibió dos

aplicaciones de la vacuna experimental y posteriormente fue desafiado, el grupo B fue desafiado, pero no vacunado y el grupo C fue el testigo negativo. De todos los grupos se obtuvieron muestras de hisopado nasal y de suero. Los resultados demostraron que el grupo A generó anticuerpos específicos contra los tres subtipos por lo que la vacuna disminuyó las lesiones pulmonares así como los signos clínicos y donde no se detectó excreción viral, mientras que el grupo únicamente desafiado generó una respuesta inmune posterior al desafío así como la presentación de lesiones microscópicas de mayor severidad y signos clínicos de mayor frecuencia y el grupo C se mantuvo negativo, concluyendo que se confirma la protección de la vacuna trivalente contra influenza porcina ya que induce anticuerpos específicos contra los tres subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 empleadas en la vacuna. Se recomienda complementar los resultados haciendo un análisis estadístico con mayor profundidad usando variables y su relación entre sí.

## **INTRODUCCIÓN**

### **1. Historia del virus de influenza**

Una de las primeras epidemias de influenza descritas fue por Hipócrates en el año 412 a.C; estas epidemias han sido reportadas desde el siglo XVI en Inglaterra y en el siglo XVIII en USA a pesar de no contar con el conocimiento preciso del agente causal son reconocidas como influenza o también llamada gripe (Ayora-Talavera, 1999). Hasta que fue descrito por primera vez en 1918 donde a finales de ese año apareció en cerdos del norte-centro de los Estados Unidos una enfermedad epizootica que tenía similitudes clínicas y anatomopatológicas con la influenza

humana. (Straw B; Easterday BC, Reeth K, 2001). El virus de la gripe española H1N1 de 1918 se transmitió a los cerdos y evolucionó hasta convertirse en el virus porcino cH1N1 (clásico). La introducción de los virus de influenza humana estacional y aviar en los rebaños de cerdos, generaron múltiples genotipos y clados de virus H3 y H1 a través del reordenamiento con el virus endémico cH1N1 y comenzó a circular en las poblaciones porcinas (Wenjun, 2020).

Los diversos aspectos de la enfermedad, como signos y lesiones fueron descritos entre los años 1922-1928. (Straw B; Easterday BC, Reeth K, 2001, ). Después de largas investigaciones acerca de la transmisibilidad de la influenza en cerdos Richard Shope fue capaz de demostrar y de realizar el primer aislamiento del virus durante una epidemia de influenza humana en 1933 (Ayora-Talavera, 1999) identificado como A/swine/Iowa/15/30 (Martín A, Chillada y Real, 2009), se trataba de un subtipo H1N1hucs (humano-clásico) de origen porcino capaz de infectar al humano quien dio origen a la llamada "gripe española"(PN, 2016).

Antes de 1975 había pocos datos de la presencia de influenza porcina en otros países que no fuera en Estados Unidos. Desde finales de la década de los 70's los reportes en distintos países del mundo comenzaron a incrementar (Straw B; Easterday BC, Reeth K, 2001).

Se han documentado importantes pandemias como la gripe asiática causada por el virus AH2N2 entre 1957-1958 y en 1968, la "gripe de Hong Kong" por el virus AH3N2. En 1977-1978 el virus AH1N1 comienza de nuevo a circular y a partir de esta fecha continúan circulando en el mundo, los virus AH1N1, AH3N2 y el tipo B (Oropesa S, 2012).

No fue sino hasta en 1988 que por primera vez en cerdos se aisló el subtipo H3N2 durante una severa enfermedad tipo influenza, que se presentó en las granjas de Carolina del Norte (Carrera, *et al*, 2014). Apareciendo principalmente en el Medio de EUA y se han detectado en Canadá desde 2005, surgiendo a partir de la triple redistribución de segmentos HA, NA y PB1 de H3N2 y PB2 humanos estacionales, y PA de IAV aviar, y NP, M y NS del SIV H1N1 clásico (López-Valiñas, 2022) es por esta razón que contienen las proteínas HA y NA de los virus de la influenza humana y proteínas internas de los virus de influenza tipo A (IAV-S) clásicos (NS, NP, M), virus de la influenza aviar (PB2, PA) y virus de la influenza humana (PB1); La HA de los virus H3N2 en cerdos se puede dividir en 4 grupos genéticos distintos; la mayoría de los que circulan en los últimos años están en el grupo IV. (Sandbulte, *et al*, 2015).

A mediados de los 90's apareció el subtipo H1huN2 que en este caso provino de un arreglo entre genes aviares, humanos y porcinos (PN, 2016). También circularon durante este tiempo cepas provenientes de virus europeos H3N2 y H1N1 que se detectaron por primera vez en China en 1999 y 2001, respectivamente, y los virus TRIG norteamericanos se encontraron en 2002 (Sandbulte, *et al*, 2015).

En la primavera del 2009 se detectó un virus H1N1 en humanos identificado como H1N1pdm09 con una historia evolutiva complicada (OMSA, 2021) pues es el producto de diversos reordenamientos genéticos (PN, 2016) ya que los genes de matriz y neuraminidasa procedían de H1N1 IAV-S europeo de linaje aviar y los genes restantes eran de IAV-S norteamericano de linaje porcino, aviar y humano. Los ocho segmentos de virus son similares a virus porcinos y por tanto ha llevado

asumir que ha emergido del cerdo (PN, 2016). Este virus es sustancialmente menos virulento que el virus de influenza de 1918, pero tiene el potencial de adquirir cambios de aminoácidos en proteínas virales clave que pueden incrementar su patogenicidad. Sin embargo, es importante explorar los factores por los que el huésped se involucra con la resistencia y susceptibilidad a la infección por el virus de influenza (Carrera, *et al*, 2014). Después de su introducción en las poblaciones porcinas, se detectaron virus reordenados entre pH1N1 y virus porcinos circulantes endémicos en cerdos (Wenjun, 2020) y el virus se volvió endémico en muchas poblaciones porcinas a nivel mundial (OMSA, 2021).

Actualmente hay poca información sobre los subtipos de IAV-S en México o América del Sur donde se sabe que los virus H1N1 y H3N2 circulan, pero rara vez se ha informado sobre la caracterización genética (Sandbulte, *et al*, 2015). Se ha demostrado que al menos desde el año 2010 en México existe circulando un nuevo subtipo de influenza porcina H1N2 (Saavedra, 2019).

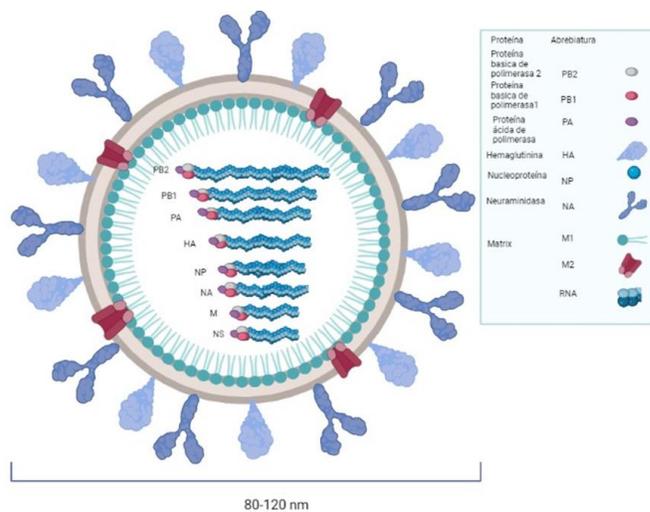
## **2. Agente etiológico**

La familia Orthomyxoviridae incluye virus con genomas de 6 a 8 segmentos de ARN de una sola cadena de sentido negativo (Van Reeth K y Vincent LA, 2019) miden de 80 a 120 nm de diámetro (Oropesa S, 2012) y está conformado por cinco géneros: 1) virus de influenza tipo A que presentan 8 segmentos e infecta humanos, otros mamíferos y gran variedad de aves; 2) virus de influenza tipo B, que contiene igualmente 8 segmentos genómicos e infecta únicamente a humanos; 3) virus de influenza tipo C que contiene 7 segmentos que infecta a humanos, perros y cerdos; 4) Thogo-likevirus que infecta a insectos y está conformado por los subgéneros

Thogoto (6 segmentos) y Dhori (7 segmentos); 5) El género isa virus que está conformado por 8 segmentos genómicos y que infecta a peces (Landeras, 2014).

## **2.1 Estructura**

Son viriones pleomórficos, envueltos con glicoproteínas llamadas "espículas" que se proyectan a partir de la superficie; estas glicoproteínas son los principales antígenos de superficie y son de dos tipos distintos: la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N). Las características antigénicas de los tipos de glicoproteínas sirven para la clasificación en subtipos del virus. (Straw B; Easterday BC, Reeth K, 2001). Hasta ahora se han identificado 17 variantes de HA y 9 de NA (Carrera, *et al*, 2014). La hemaglutinina es la responsable de la unión del virus a la células y a la aglutinación de eritrocitos, es el principal antígeno del virus contra el cual va dirigida la respuesta inmune neutralizante (anticuerpos protectores). Además, su variabilidad antigénica que se traduce en la aparición de nuevas cepas, la convierte en el principal factor desencadenante de las epidemias y pandemias de gripe (Oropesa S, 2012), mientras que la neuraminidasa es la responsable de la elución enzimática del virus de los eritrocitos y puede jugar un papel importante en la liberación del virus de las células infectadas (Straw B; Easterday BC, Reeth K, 2001). Esta proteína es necesaria para que los virus de influenza A se propaguen de manera eficiente, y es probable que los anticuerpos contra ella impidan la propagación del virus a las células no infectadas. La actividad enzimática de la NA también podría facilitar la infección de las células, al ayudar al virión a penetrar la capa de moco en el tracto respiratorio o el glucocálix que rodea la célula (Sandbulte, *et al*, 2015) estas características estructurales se muestran en la figura 1.



**Figura 1. Estructura del virus de influenza.** Modificado: Mancera, *et al*, 2020. Las proteínas internas de los virus de influenza A tienen funciones estructurales y están involucradas en la replicación de ácidos nucleicos, además de que alteran las respuestas antivirales en la célula huésped e influyen en la virulencia. (Sandbulte, *et al*, 2015).

Segmento genómico	Abreviatura	Proteína	Ubicación	Importancia en las vacunas IAV'S
1	PB2	Proteína básica de polimerasa 2	Interno	Las mutaciones en PB1 y PB2 confieren atenuación en una vacuna candidata
2	PB1	Proteína básica de polimerasa 1	Interno	Las mutaciones en PB1 y PB2 confieren atenuación en una vacuna candidata
	PB1-F2		Interno	-
	N40			-
3	-	Proteína ácida polimerasa	Interno	-
4	HA	Hemaglutinina	Sobre	El subtipo de HA en la vacuna de virus inactivado debe coincidir con el virus de desafío. Las vacunas con HA más estrechamente relacionado tienen más probabilidades de ser protectoras
5	NP	Nucleoproteína	Interno	-
6	N	Neuraminidasa	Sobre	Un papel de protección
7	M1	Matriz 1	Interno	-
	M2		Sobre	Las vacunas experimentales están dirigidas contra M2 altamente conservado
8	NS1	Proteína no estructural 1	No estructural	La eliminación de genes en NS1 confiere atenuación en una vacuna candidata
	NS2/NEP	Proteína no estructural 2/proteína de exportación nuclear	No estructural o interno	-

**Tabla 1. Importancia de las proteínas estructurales que conforman los segmentos del IAV en la vacuna.** Sandbulte, *et al*, 2015; Gaitán, 2016.

El genoma del virus de influenza A se caracteriza por poseer una sola cadena de ARN segmentado en ocho. Estos segmentos codifican 12 proteínas, cuya importancia y relevancia se observa en la tabla 1; la polimerasa básica 2 (PB2), codificada por el segmento 1: polimerasa básica 1 (PB1), PB1-F2, y N40,

codificadas por el segmento 2; la polimerasa ácida (PA), codificada por el segmento 3; la hemaglutinina (HA), codificada por el segmento 4; la núcleo-proteína (NP), codificada por el segmento 5; la neuraminidasa (NA), codificada por el segmento 6; la proteína de matriz M1 y el canal de iones M2, ambas codificadas por el segmento 7, mientras que además la proteína de la matriz transmembrana 2 (M2) funge un canal de iones selectivo de protones y se requiere para un decaído eficiente de los virus de influenza A. M2 acidifica el núcleo viral después de que el virus ingresa a la célula huésped, lo que permite que los complejos de ribonucleoproteína viral (vRNP) que contienen los segmentos de genes se liberen en el citoplasma y finalmente dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2) que codifica el segmento 8 (Carrera, *et al*, 2014.) Debido a la segmentación del genoma, existe la intercambiabilidad o recombinación genética entre diferentes virus de influenza A en el curso de las infecciones mixtas (Straw B; Easterday BC, Reeth K, 2001).

## **2.2 Nomenclatura**

El sistema actual de nomenclatura del virus de influenza, introducido en 1980, designa el tipo de huésped, lugar, número de cepa (sí existe), año de aislamiento y subtipo antigénico, por ejemplo, A/Cerdo/Wis/1/84(H1N1). El primer carácter (A) identifica el tipo que es seguido por el huésped de origen (excepto cuando es humano), después el origen geográfico, número de cepa, el año de aislamiento y el subtipo antigénico de la H y N (Straw B; Easterday BC, Reeth K, 2001).

### 3. Ciclo de replicación celular del virus influenza

#### Adhesión y endocitosis de las partículas virales

Como se muestra en la figura 2 el ciclo inicia en el momento que el virus se adhiere al ácido siálico de la superficie celular a través del receptor ubicado en la parte superior del glóbulo grande de la HA (Carroll, *et al*, 2016). El rango de huéspedes está determinado por su especificidad para los receptores de ácido siálico y esta preferencia de unión de cada virus de la influenza tiende a coincidir con los receptores predominantes en los tejidos del huésped donde normalmente se replica (Sandbulte, *et al*, 2015). Los cerdos tienen receptores para aves (ácido siálico-alfa-2,3-terminal sacáridos) (SA-alfa-2,3) y cerdos/ virus de influenza humana (SA-alfa-2,6) en el tracto respiratorio superior (Trebien, Larsen y Viuff, *et al*, 2011). Una vez unido al ácido siálico la partícula vírica es introducida por un proceso de endocitosis mediada por receptores. La HA induce la fusión de la cubierta viral con la membrana del endosoma y liberación de la nucleocápside dentro del citoplasma (Monjarrez y Arenas, 1999) El pH bajo en el endosoma es necesario para la fusión de la membrana mediada por el virus que libera RNA virales hacia el citosol por tanto el pH ácido produce un cambio de configuración en la estructura de HA que hace que el “péptido de fusión” de HA2 quede en contacto correcto con la membrana y la proteína del canal iónico de M2 presente en el virión permite la entrada de iones del endosoma hacia la partícula viral (Sandbulte, *et al*, 2015). En la liberación del virus, la NA es la encargada de eliminar residuos de ácido siálico y permitir la salida libre de los viriones sin que se agreguen (Monjarrez y Arenas, 1999). Ya libres las RNP

virales se exportan al núcleo mediante el complejo del poro donde tendrán los procesos de transcripción y replicación (Martínez, 2017).

#### Transcripción y traducción primaria

Existe una transcripción primaria donde los RNA una vez dentro del núcleo es transcrito en mRNA (RNA mensajero) mediante un proceso llamado "robo de cap" o cap snatching (Landeras, 2014), posteriormente los mRNAs son exportados al citoplasma para su traducción en los ribosomas (Saavedra- Montañez, 2019). La proteína NS1 tiene un papel clave en este efecto actuando a varios niveles: regula la actividad de la polimerasa viral y el procesamiento de los mRNAs virales y celulares, inhibe el corte y poliadenilación de mRNAs celulares, promueve la retención nuclear y la degradación de mRNAs celulares poliadenilados y estimula la traducción de mRNAs virales (Landeras, 2014).

#### Replicación viral

La replicación del genoma viral se logra por las mismas proteínas de polimerasa codificadas por el virus que intervienen en la transcripción, al igual que con todos los demás virus de sentido negativo. Los únicos RNA completamente libres son los mRNA. El primer paso en la replicación del genoma es la producción de copias de cada segmento de tira positiva. Estas copias antigenoma difieren de las mRNA en las dos terminales: los extremos 5' no están rematados y los extremos 3' no están truncados ni poliadenilados. Estas copias hacen las veces de plantillas para la síntesis de copias facsímiles de RNA genómicos (Sandbulte, *et al*, 2015).

El proceso de replicación viral dispara los factores de transducción de señales que inducen a la expresión de los genes de citoquinas proinflamatorias (Factor de Necrosis Tumoral – alfa o TNF-alfa), iniciando la comúnmente llamada "tormenta de citoquinas", y que se piensa juegan un rol prominente en la morbilidad y mortalidad de este virus. La síntesis de proteínas no estructurales del virus activa a la producción de Interferón alfa y beta (IFNa/b) activando la regulación de la respuesta inmune (Talledo y Zumaeta, 2009).

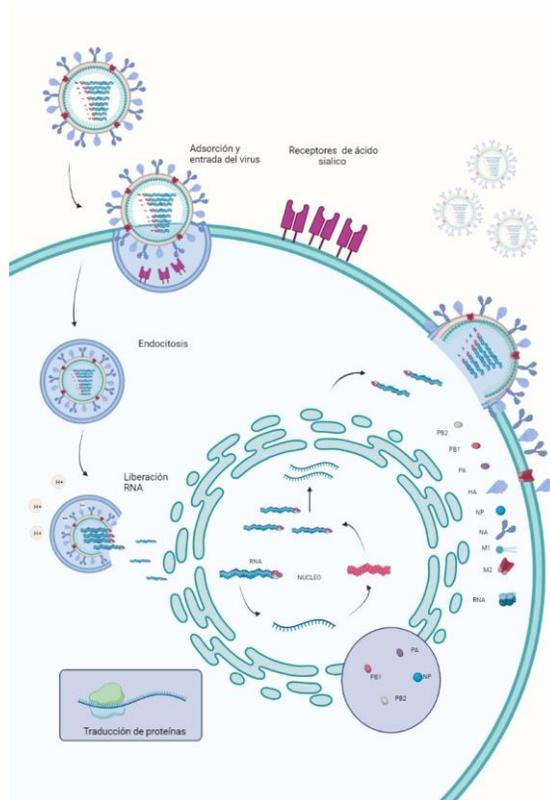
La replicación del virus Influenza es máxima a las 48 hrs después de la infección y desciende lentamente hasta aproximadamente el sexto día. Aun cuando no se encuentren partículas virales infectivas, se puede detectar antígeno viral en las células y en las secreciones de personas infectadas por varios días (González, Orraca y Sanabria, 2010).

#### Transcripción secundaria

Las vRNPs generadas tras el proceso de replicación sirven de molde para dar lugar a mRNAs virales durante la transcripción secundaria. Este mecanismo no se puede distinguir de la transcripción primaria, pero a nivel de síntesis de mRNA es superior debido a la concentración elevadas de vRNPs, a partir de este momento la replicación y la transcripción se encuentran fuertemente acopladas para que más tarde se desacoplen para que las vRNPs se dirijan a la formación de nuevos viriones. (Landeras, 2014).

#### Ensamblaje y liberación de los viriones

Las RNP progenie se exportan al citoplasma con la asistencia de M1 y proteínas de exporte nuclear (NEP) (Saavedra- Montañez, 2019); y la proteína NP (Landeras, 2014), estas 8 vRNPs se transportan a través de vesículas RAB11 y son incorporadas a los viriones progenie que ya contienen HA, NA, M2 (Saavedra- Montañez, 2019). La encapsulación de las RNPs parece estar dirigida por M1 que es el principal organizador del ensamblaje de nuevos viriones, aunque también se ha implicado la participación de M2. La liberación de las partículas se produce mediante un fenómeno de gemación o budding en la membrana plasmática. Gracias a la acción catalítica de NA, que procesa los receptores de ácido siálico, se liberan los nuevos viriones al espacio extracelular (Landeras, 2014).



**Figura 2. Ciclo de infección celular del virus de influenza tipo A.** Modificado Sandbulte, *et al*, 2015;

## **4. Mecanismos evolutivos del virus de influenza**

### **4.1 Deriva Antigénica**

La deriva antigénica es causada por mutaciones puntuales y se define como cambios antigénicos graduales menores en la proteína HA o NA (Cordero, 2014). La sustitución de aminoácidos en las glicoproteínas es de importancia primordial; si una sustitución permite que el virus escape del control inmunitario y proporciona una ventaja de aptitud física, entonces ese virus tiene la oportunidad de emerger como una nueva cepa epidémica, reemplazando a la cepa circulante (Webster y Govorkova, 2014). La deriva antigénica ocurre en todos los tipos IV. Ocurre principalmente en IAV, pero tiene un ritmo más lento en IBV. La deriva antigénica rara vez ocurre en ICV e IDV (Shaghayegh y Rezaei 2022).

### **4.2 Cambio antigénico**

El cambio antigénico provoca cambios drásticos en el genoma de los IV y es más frecuente en las aves (Shaghayegh y Rezaei, 2022). Estos cambios ocurren por reordenamiento e introducción de un nuevo HA, NA, o ambos segmentos de genes del reservorio de aves acuáticas en los virus de influenza humana que circulan actualmente. Los subtipos de virus de preocupación en aves acuáticas se pueden dividir en tres niveles: aquellos que han causado pandemias en humanos (H1, H2, H3) constituyen el nivel 1; los que han infectado humanos esporádicamente (H5, H7, H9) constituyen el nivel 2; y los subtipos restantes conforman el nivel 3 (Webster y Govorkova, 2014).

## 5. Patogenia

La transmisión ocurre por aerosol a través de fómites o contacto directo con secreciones infectadas (Jubb, Kennedy y Palmer, 2015). Una vez que el IAV accede por vía nasofaríngea inicia su replicación limitándose a células epiteliales de la mucosa nasal, etmoides, tráquea, bronquios y bronquiolos pulmonares, causando la degeneración y muerte de las células que se desprenden hacia el lumen, generando así una respuesta inflamatoria con abundante infiltrado de células, neutrófilos en su mayoría, además de la producción de citoquinas (Zachary; López, 2017) que aparentemente determinan la diferencia entre infección sub – clínica o enfermedad clínica (Carvajal, 2013.). La infección subclínica frente a la enfermedad está determinada por la carga viral y las citoquinas liberadas. La enfermedad y la inflamación son precipitadas por el aumento de IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  e IL-1, IL-6 e IL-12 (Helke, Ezell y Swindle, 2015). La obstrucción causada por las células necróticas y el exudado inflamatorio propicia el colapso de las vías respiratorias bajas, bloqueando el flujo de aire y generando consolidación pulmonar difusa, presentándose entre 24-48 horas las lesiones macroscópicas que se caracteriza por lesiones pulmonares delimitadas en los lóbulos apicales y cardíacos, con hiperemia desarrollando neumonía bronco intersticial características de AIV (Casanovas C, *et al*, 2020).

A los 5-7 días, el virus cesa su replicación, desaparecen las células necróticas y la inflamación y los tejidos empiezan a regenerarse, por lo que, en ausencia de

complicaciones secundarias, se recupera la normalidad alrededor de los 14-21 días tras la infección. (Casanovas C, *et al*, 2020).

## 6. Signos Clínicos

En los cerdos, la enfermedad puede presentarse de forma subclínica o clínica aparece de forma aguda y se propaga rápidamente para afectar a cerdos de todas las edades (Jubb, Kennedy y Palmer 2015), principalmente cerdos jóvenes, después del periodo de incubación de 24 a 48 hrs se presenta fiebre, tos, rinitis y disminución en el consumo de alimento. Los signos desaparecen regularmente después de 3 a 5 días posteriores, pero en algunos casos la fiebre puede reaparecer de forma transitoria 3 semanas después, se puede observar disnea asociada por la afectación pulmonar grave y la muerte se produce tras una neumonía grave (Carlyle, Duncan y William, 1997), como resultado de una complicación por coinfecciones secundarias por bacterias como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis* y *Streptococcus* tipo 2m (Gaitán, 2016); sin embargo, la tasa de mortalidad no suele ser alta aproximadamente 1% pero en algunos brotes puede alcanzar proporciones graves, en cambio la tasa de morbilidad suele ser de hasta 100% (Carlyle, Duncan y William, 1997). El efecto más importante de la mayoría de los brotes de influenza es la pérdida de peso severa, pero las cerdas preñadas pueden abortar o dar a luz lechones débiles (Zachary; López, 2017).

## **7. Lesiones**

Las lesiones características de la influenza porcina se restringen a la tráquea, bronquios y bronquiolos, así como alveolos. La severidad de las lesiones, así como del desarrollo de la enfermedad, dependen directamente de la cepa viral, de la cantidad de virus que alcanza las vías respiratorias profundas y de la consecuente liberación de mediadores de la inflamación, principalmente IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL1 e IL6 (Carlyle, Duncan y William, 1997).

### **7.1 Lesiones macroscópicas**

Incluye la distribución lobular craneoventral de la atelectasia (Jubb, Kennedy y Palmer 2015) en porciones del lóbulo cardiaco apical e intermedio, resultado de la obstrucción de bronquios y bronquiolos (Carlyle, Duncan y William, 1997) presentándose de color rojo, firmes al tacto y colapsados. Puede producirse edema pulmonar generalizado; La mucosa de la tráquea a menudo se encuentra hiperémica y edematosa (Jubb, Kennedy y Palmer 2015).

### **7. 2 Lesiones microscópicas**

Las lesiones mayormente descritas por una infección por influenza son: necrosis del epitelio de las vías respiratorias y en menor medida del epitelio alveolar (Jubb, Kennedy y Palmer 2015) debido a la pérdida de núcleos y la hialización del citoplasma de las células epiteliales. Este tejido necrótico a menudo aparece como una membrana hialina e incluye la atenuación de las células bronquiolares. Los residuos necróticos y los neutrófilos se presentan en los lúmenes bronquiolares

además de la atelectasia y los infiltrados peribronquiales, pérdida de cilios que se produce 8 hr después de la infección experimental y a las 24hr hay necrosis de las células epiteliales y acumulación de células necróticas desprendidas de la luz, engrosamiento de los septos alveolares que puede progresar en un grado tan notable que llena los alveolos (Carlyle, Duncan y William, 1997) resultando de hiperplasia del epitelio e infiltración perivascular de linfocitos y células plasmáticas (Jubb, Kennedy y Palmer 2015).

La neumonía que se genera se caracteriza por necrosis de las paredes alveolares con formación de membranas hialinas que recubren los sacos alveolares, acompañadas de congestión, hemorragias focales edema perivascular e intralobular severo e infiltración con leucocitos inflamatorios principalmente células mononucleares. Las áreas de parénquima pulmonar colapsado aparecen aproximadamente al segundo día, como resultado de la obstrucción de los bronquios causada por exudado mucopurulento y células descamadas (Carlyle, Duncan y William, 1997).

## **8. Diagnóstico de influenza**

El diagnóstico clínico de una infección por virus Influenza se sugiere por los signos clínicos, sin embargo, esto solo puede realizarse de forma presuntiva dado que los signos no son patognomónicos de la enfermedad, siendo necesario hacer un diagnóstico diferencial con la variedad de cuadros respiratorios que afectan al ganado porcino. Por lo tanto, un diagnóstico definitivo sólo es posible a través del

aislamiento vírico o la detección de ácido nucleico, proteínas virales y anticuerpos específicos en el laboratorio (Martín A, Chillada y Real, 2009).

Los veterinarios en campo que hacen recomendaciones para el control o la prevención de IAV-S en hatos porcinos desean pruebas de diagnóstico de IAV-S precisas y rentables con un tiempo de respuesta rápido. Los diagnósticos confiables brindan información crítica para ayudar a los veterinarios en el proceso de toma de decisiones. Hay varias pruebas de diagnóstico disponibles (Sandbulte, *et al*, 2015) que pueden ser moleculares o serológicas.

## **8.1 Diagnóstico diferencial**

Otros agentes que pueden originar una enfermedad respiratoria en los cerdos son el virus del síndrome disgenésico y respiratorio porcino (SDRP), síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), el virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV), el Coronavirus respiratorio porcino (OMSA, 2018), *circovirus porcino tipo 2* (PCV-2), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Haemophilus parasuis*, (Martelli P, *et al*, 2019) solo *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en la infección aguda, presenta signos clínicos muy similares a los de las infecciones por los VIA-P, como disnea, taquipnea, respiración abdominal, tos, fiebre, depresión y anorexia (OMSA, 2018). Las coinfecciones son extremadamente comunes en las enfermedades respiratorias llamados Complejo de Enfermedades Respiratorias Porcinas, que siempre deben estar en la lista diferencial (Martelli P, *et al*, 2019).

## 8.2 Pruebas de detección de Antígenos

Comprende técnicas y procedimientos con la finalidad de aislar el virus que puede ser a través de la inoculación de huevos o cultivo celular o mediante la detección del antígeno o genoma viral. La detección del antígeno viral a partir de una muestra de tejido también puede realizarse mediante una prueba de anticuerpos fluorescentes u otras técnicas aprobadas por la OMSA (Aungtragoolsuk, *et al*, 2013).

### Aislamiento del virus IAV

El aislamiento de un virus es una técnica de alta sensibilidad y muy útil para el diagnóstico de las infecciones virales cuando se obtienen muestras con la calidad requerida, dentro de los parámetros ya señalados (OMSA, 2018). El aislamiento del virus se puede obtener mediante distintas técnicas.

### Aislamiento en cultivo celular

El cultivo celular presenta la ventaja de amplificar en gran escala el virus para poder utilizarlo en pruebas de caracterización antigénica, genética o pruebas de susceptibilidad a medicamentos. Aunque el huevo embrionado suele ser el sistema de cultivo utilizado con mayor frecuencia, en la actualidad existen varios sistemas de cultivos de células para el desarrollo y diagnóstico del virus de influenza porcina. Incluyen líneas celulares a partir de riñón de cerdo, ternero, de pulmón de feto de cerdo, de riñón canino, fibroblastos de embrión de pollo, células diploides humanas. Las células MDCK (Madin-Darby canine Kidney), son las más apropiadas para el

aislamiento del virus de influenza (Martín A, Chillada y Real, 2009). Los virus de influenza A pueden replicarse en cultivos celulares dentro de las 24 a 48 horas o pueden demorar hasta 5 a 6 días si la concentración inicial de virus en la muestra es baja. El crecimiento de virus en cultivos celulares induce la producción de lisis celular o efectos citopáticos (CPE) (Richt, *et al*, 2012).

#### Aislamiento en embrión de pollo

La inoculación de huevos de pollo embrionado de nueve a once días de edad se considera el estándar para el aislamiento y la propagación de los virus de la influenza aviar y ciertos SIV adaptados a los huevos (Richt, *et al*, 2012).

Existen técnicas moleculares que también nos permiten la detección del antígeno, por ejemplo:

#### Técnica PCR

La RT-PCR constituye un método altamente específico y sensible que garantiza la amplificación de un número bajo de copias del genoma viral, pudiendo ser aplicada directamente a muestras clínicas para la identificación de los diferentes subtipos del virus y para la caracterización de virus multiplicados en embrión de pollo o cultivo de tejidos, utilizando para ello cebadores específicos de subtipo, que son regiones complementarias altamente conservadas del gen que codifica para la HA1. El proceso consiste en la repetición del ciclo de síntesis de ADN que cuenta con tres secuencias: desnaturalización de la cadena molde por calor, hibridación de los iniciadores al ADN desnaturalizado y extensión o polimerización de la nueva cadena

de ADN a partir del cebador por una polimerasa. La amplificación se realiza utilizando oligonucleótidos cebadores sintéticos, que flanquean la región diana e hibridan en cadenas opuestas del ADN. Los productos de cada ciclo de síntesis son utilizados como molde en el ciclo siguiente, por lo que la amplificación presenta una cinética exponencial (Oropesa S, 2012).

#### Prueba de inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHC) es una prueba económica, rápida y fácil de realizar que se utiliza para detectar antígenos del virus de la influenza H1N1 y H3N2 en portaobjetos de hisopos nasales o tejidos fijados con formalina. Se ha demostrado que las pruebas IHC tienen una sensibilidad equivalente al aislamiento del virus y mayor que la Fluorescencia (FA) (Sandbulte, *et al*, 2015).

### **8. 3 Pruebas de detección de Anticuerpos**

El diagnóstico serológico es un procedimiento importante cuando se hace imposible obtener la muestra clínica del individuo o se carece de los recursos en el laboratorio. Muchos laboratorios dependen de la serología para identificar infecciones individuales recientes. El diagnóstico se basa en la toma de una muestra de suero durante la fase aguda (hasta el 5 día de comenzados los síntomas) y otra en la fase convaleciente, 2-3 semanas más tarde (Richt, *et al*, 2012).

#### Inhibición de la Hemaglutinación (IH)

La IH es la técnica recomendada para el diagnóstico serológico, aunque pueden utilizarse otras técnicas como la fijación de complemento y técnicas inmuno enzimáticas. (OMSA, 2018). La aglutinación de glóbulos rojos es una reacción natural que ocurre en presencia de la proteína HA en la superficie del virus. La HA se puede inhibir específicamente con el anticuerpo contra la influenza, que se puede medir en un ensayo de IH (Richt, *et al*, 2012).

Se realiza en placas de microtitulación, mezclándose una cantidad estandarizada de antígeno con antisueros diluidos en forma doble seriada, posteriormente se añaden eritrocitos para determinar una unión específica del anticuerpo a la molécula HA (IPK, 2003).

Otras pruebas complementarias

La mayoría de los kits de pruebas basados en ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), están disponibles comercialmente y pueden detectar el antígeno del virus de la influenza en muestras clínicas (Richt, *et al*, 2012). La inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la inmunodifusión (Martín A, Chillada y Real, 2009).

## **9. Tratamiento**

Las intervenciones terapéuticas pueden ser una importante línea de defensa contra la influenza, especialmente cuando la eficacia de la vacuna es baja o la vacuna no está disponible. Sin embargo, varios factores limitan la eficacia de la terapia antiviral contra la influenza. El mayor desafío en la terapia antiviral contra la influenza es que

actualmente solo está disponible una clase de medicamentos, los inhibidores de NA (NAI) otra clase de medicamentos contra la influenza aprobados por la FDA (Webster y Govorkova, 2014).

## **10. Respuesta Inmunológica a virus de influenza**

El sistema inmune comprende una variedad de componentes que cooperan para defender al hospedador contra agentes infecciosos, estos mecanismos pueden dividirse en dos formas, está la inmunidad inespecífica o natural y la inmunidad específica o adquirida; Los principales componentes de la inmunidad inespecífica son el complemento, las células fagocíticas y algunos tipos de interferones, este tipo de inmunidad es muy importante para controlar una infección durante los primeros días después de la exposición ante un agente infeccioso; Mientras que los linfocitos T y B son los componentes de la inmunidad específica, la cual requiere de un tiempo determinado de 2- 3 semanas para alcanzar su óptima capacidad funcional, cuando existe una segunda exposición su actividad óptima es alcanzada de forma más rápida y esto ocurre como resultado de una respuesta de memoria (Straw BE; Roth JA, 2001).

Durante la fase aguda de la enfermedad (5 a 6 días) los virus de Influenza A (Khatri, *et al*, 2010) son reconocidos por moléculas de patrones en las células infectadas y desencadena la producción de proteínas llamadas interferones tipo I, interferón  $\alpha$  e interferón  $\beta$  (Sandbulte, *et al*, 2015) así como la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos producidos en los linfonodos (Khatri, *et al*, 2010). Los interferones tipo I, a su vez, tienen una serie de propiedades antivirales que inhiben la replicación del

virus de la influenza. Por otra parte, la proteína NS1 del virus de influenza A puede inhibir las defensas del huésped mediadas por interferón (Sandbulte, *et al*, 2015), además de las IL-6, la IL-12. Estas respuestas inmunitarias median los signos clínicos y las lesiones pulmonares (Khatri, *et al*, 2010).

### **10.1 Inmunidad mediada por anticuerpos**

Las respuestas inmunitarias adaptativas dependen de anticuerpos y se pueden encontrar en el tracto respiratorio de los cerdos tan pronto como 4 o 5 días después de la infección con IAV-S, y los títulos séricos aparecen en aproximadamente a los 7 días, aunque los niveles máximos ocurren más tarde, por ejemplo 2 semanas después (Sandbulte, *et al*, 2015). Hasta ahora solo hay reportes de respuestas protectoras de anticuerpos IgA e IgG específicas contra el virus (Khatri, *et al*, 2010); la HA del virus de la influenza A es quien generalmente induce las respuestas de anticuerpos más fuertes después de la infección, probablemente porque esta proteína está presente en grandes cantidades en la superficie del virus. Sin embargo, los títulos de anticuerpos contra la HA se ven afectados por la dosis de virus y, posiblemente, por su subtipo. Los animales expuestos a los virus de la influenza normalmente producen menos anticuerpos contra la NA que contra la HA; sin embargo, parecen contribuir a que se reduzca la diseminación del virus y/o que la enfermedad se presente de forma menos grave (Sandbulte, *et al*, 2015).

### **10.2 Inmunidad mediada por células**

La inmunidad mediada por células (CMI) es la que las células inmunitarias (células T citotóxicas) reconocen y destruyen directamente las células huésped infectadas (Sandbulte, *et al*, 2015). Las respuestas mediadas por células (T citotóxicas) como forman parte de la respuesta adaptativa son clave para proteger contra la infección de IAV, ya que se ha demostrado la especificidad del virus con las células T residentes en los pulmones y en los linfonodos así como en el torrente sanguíneo; a diferencia de los anticuerpos neutralizantes, las células T tienen el potencial de ser ampliamente reactivas entre los distintos subtipos del virus y por tanto se ha demostrado una reducción en la replicación y excreción viral, esto quiere decir, que participan activamente tanto en la eliminación de la infección primaria como en la reinfección heteróloga (Talker, *et al*, 2016).

### **10.3 Anticuerpos maternos contra el virus de influenza**

Tanto la inmunidad específica como la inespecífica se desarrollan durante la vida intrauterina y son funcionales (Straw BE; Roth JA, 2001), sin embargo, se considera que los lechones nacen inmunocompetentes (Augustyniak y Pomorska-Moil, 2023), ya que el recién nacido no ha sido expuesto todavía a antígenos y por tanto no ha desarrollado una respuesta inmune humoral o mediada por células contra ningún agente infeccioso (Straw BE; Roth JA, 2001). Los anticuerpos maternos IgA, IgG e IgM contra IAV-S se transfieren a los lechones mediante el calostro de la madre, generalmente durante las primeras 36 h de vida (Sandbulte, *et al*, 2015) debido a que la placenta porcina de tipo epiteliocorial impide la transferencia durante la gestación de inmunoglobulinas y células inmunitarias (Augustyniak y Pomorska-

Moil, 2023); es por tal razón, que el acceso al calostro rico en IgG dentro de las primeras 6 h posparto es más crítico para la tasa de supervivencia de 3 semanas y el aumento de peso, pues se sabe que el cierre intestinal para la absorción de calostro se completa a las 24 a 48 h de edad (Helke, Ezell y Swindle, 2015). A diferencia de la mayoría de las demás especies, el cerdo carece del gen de IgD, que es una inmunoglobulina precursora en la vía de diferenciación a IgM (Helke, Ezell y Swindle, 2015). Desde un punto de vista inmunológico, el componente más importante del calostro son las inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) sin embargo, otros factores como las citocinas o las células inmunitarias (células epiteliales, macrófagos, células NK, células T y B) también desempeñan un papel importante en la protección del recién nacido. Los anticuerpos derivados de la madre (MDA) son eficientes solo para proteger a los lechones contra los patógenos a los que se han enfrentado las madres debido a la infección natural o la vacunación (Sandbulte, *et al*, 2015). Aunque la presencia de MDA en lechones destetados reduce significativamente la transmisión de virus de influenza tipo A (IAV), la protección es limitada (Cador C, *et al.*, 2016). Es bien sabido que los (MDA) durante la vacunación pueden conducir a una reducción o inhibición completa de la respuesta inmune contra vacunas inactivadas, pero también con vacunas de virus activado debido a la fiebre y signos clínicos prolongados y neumonía más grave. Por otra parte, se documentó que la inmunización de lechones proporciona una mejor protección contra SIV que los MDA (Augustyniak y Pomorska-Moil, 2023). El momento ideal para llevar a cabo la vacunación en lechones es cuando el MDI desciende al nivel que permite el desarrollo de inmunidad celular y humoral a largo plazo, pero aún es suficiente para proteger contra la infección; la disminución de los MDA ocurre hasta

las 10 semanas de edad (Augustyniak y Pomorska-Moil, 2023) sin embargo se ha encontrado que los anticuerpos maternos persisten hasta las 14-16 semanas, mientras que a menudo desaparecen alrededor de las 6 semanas en lechones nacidos de madres expuestas, pero no vacunadas ( Sandbulte, *et al*, 2015).

## **11. Control y prevención**

Es necesario comprender tanto el movimiento de animales, como el de virus, para implementar y/o mejorar las prácticas de bioseguridad o las medidas de contención (Vincent a, *et al*, 2016). Dentro de las medidas de bioseguridad se debe de incluir la restricción en el contacto con otras especies sobre todo aves, de igual forma se debe considerar el contacto humano, en particular con aquellos que presenten síntomas de la enfermedad (Straw B, *et al*, 2001).

La vacunación es otro medio de mitigar los efectos de la enfermedad por el virus de la influenza y las vacunas son más efectivas si las cepas incluidas coinciden estrechamente con las cepas que circulan actualmente en los cerdos. (Vincent, *et al*, 2016)

## **12. Vacunación**

Desde hace más de 100 años se sabe que los animales pueden desarrollar inmunidad si estos son expuestos al agente infeccioso de forma inactivada o modificada de manera que no se genere la enfermedad, esto condujo al desarrollo de muchas vacunas a comienzos de 1900 (Straw B, *et al*, 2001).

El objetivo final de la vacunación es generar inmunidad humoral y/o mediada por células, induciendo así la producción de una memoria inmunológica que confiera protección contra infecciones naturales posteriores. La obtención de anticuerpos neutralizantes ha sido durante mucho tiempo el principal objetivo de las vacunas. (Nelson y Vincent, 2016).

La vacunación es el medio más eficaz para prevenir y controlar la gripe en humanos y animales. Las vacunas de virus completo inactivado (WIV) disponibles en el mercado han demostrado ser eficaces para proteger a los cerdos contra infecciones por virus homólogos o genéticamente similares y se utilizan ampliamente en la industria porcina en muchos países. Sin embargo, la influenza porcina se ha controlado parcialmente debido a la falta de protección hetero-variante y heterosubtípica de las vacunas WIV (Wenjun, 2020).

Aunque la vacuna puede reducir la enfermedad y la propagación del virus, el sistema inmunitario del huésped no genera inmunidad esterilizante, por lo que la replicación viral puede ocurrir a pesar de la vacunación. Los objetivos más realistas son prevenir la enfermedad clínica y reducir la replicación y eliminación del virus hasta el punto de que los eventos de transmisión se reduzcan en gran medida sin causar inmunopatología. La protección depende de que la vacuna y el virus de desafío estén estrechamente relacionados y, a menudo, solo resulta en una protección parcial (Vincent, *et al*, 2016).

Los factores que pueden influir en la eficacia de la vacuna incluyen la homología entre la vacuna y las cepas de desafío, la inmunogenicidad de los componentes de la vacuna, la cantidad de antígeno incluido y el adyuvante utilizado. La coincidencia

de la HA viral es un componente crítico en la vacunación porque el objetivo de las vacunas inactivadas es principalmente producir anticuerpos neutralizantes contra esta proteína (Sandbulte, *et al*, 2015).

La introducción repetida de diversidad viral de origen humano, particularmente en forma de múltiples proteínas HA y NA co-circulantes antigénicamente distintas, ha complicado en gran medida el desarrollo de vacunas eficaces para el control de la influenza en cerdos (Nelson y Vincent, 2016). Sin embargo, dentro de cada cepa de virus existen diversos subtipos antigénicos. La hemaglutinina (HA) es el objetivo principal de los anticuerpos neutralizantes y, por lo tanto, un componente clave de la vacuna (Tizard I, 2021).

Las variantes de virus que no son reconocidas por anticuerpos provocados previamente pueden hacer que las vacunas tradicionales que provocan principalmente respuestas humorales sean ineficaces y, por lo tanto, resulte en la necesidad de reformulación y revacunación de la cepa vacunal (Vincent, *et al*, 2016). Por lo que las vacunas para IAV deben actualizarse regularmente para brindar suficiente protección, sin embargo, la actualización de la vacuna requiere un tiempo considerable para determinar la composición, las pruebas, la distribución y la administración de la vacuna (Chong L, *et al*, 2020).

Otra forma en el que la eficacia de la vacuna se puede ver comprometida está en el que diferentes adyuvantes pueden alterar la respuesta a los antígenos. (Vincent, *et al*, 2016). Existen otras causas por las que algunas veces las vacunas no producen los efectos esperados y fallan, están los factores internos, propios del individuo, algunos ya mencionados y otros poco descritos, pero no menos importantes como

el estrés o el microbioma y existen otros factores externos que incluyen a la vacuna misma e incluso a la planificación de los calendarios de vacunación (Augustyniak y Pomorska-Moil, 2023).

El éxito de las medidas de control de la vacunación depende en gran medida a la capacidad de la vacuna para estimular el sistema inmunitario del huésped y provocar altos niveles de respuesta inmunitaria humoral y mediada por células. La protección impartida por la respuesta inmune humoral proviene no solo de la secreción de anticuerpos anti-hemaglutinina que neutralizan el virus, sino también de la producción de anticuerpos que estimulan el sistema del complemento y la posterior citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) que inhibe aún más la replicación del virus (Chong L, *et al*, 2020).

Las cepas de IAV utilizadas en vacunas porcinas y el uso de vacunas en poblaciones porcinas no están regulados a nivel político, como lo están para ciertos subtipos en poblaciones avícolas, sino más bien, la elección de vacunar y qué vacuna o combinación de vacunas usar está, en gran parte controlado por el productor y guiado por veterinarios de rebaños individuales, sin embargo, los programas de vacunación varían y carecen de consenso con respecto a las diferentes características de la vacuna, la población objetivo y el manejo del rebaño (Chong L, *et al*, 2020).

## **12.1 Tipos de vacunas**

Durante los últimos 80 años, las vacunas contra el virus de la influenza han evolucionado hacia formulaciones más complejas, que incluyen vacunas

inactivadas trivalentes y tetravalentes, vacunas vivas atenuadas y vacunas de subunidades, sin embargo, las vacunas actuales tienen niveles variables de protección y deben reformularse cada pocos años para combatir la deriva antigénica.

### **12.1.1 Vacunas no replicativas**

#### Vacunas con virus inactivado

La mayoría de las vacunas IAV-S actuales contienen virus inactivados completos (WIV) y se usan en cerdas para protegerlas durante la gestación y a sus lechones durante el período de lactancia o en cerdos en crecimiento para disminuir la enfermedad clínica (Mancera, *et al*, 2020). Este tipo de vacunas son administradas por vía intramuscular (Dhakal S y Renukaradhya, 2019). El objetivo de estas vacunas son el de inducir anticuerpos séricos neutralizantes que se dirijan vs la HA y que los anticuerpos se transfieran a las mucosas de las vías respiratorias para neutralizar los virus de influenza (Mancera, *et al*, 2020) sin embargo, no inducen anticuerpos de la mucosa ni respuestas inmunitarias celulares adecuadas y sufren interferencia de anticuerpos maternos en lechones jóvenes e incluso pueden causar un aumento de la enfermedad respiratoria (Dhakal S y Renukaradhya, 2019). Las vacunas inactivadas se producen localmente y contienen diferentes cepas de acuerdo con el tipo de cepa que circula en determinada región (Mancera, *et al*, 2020).

#### Vacunas de vectores virales

Las partículas de replicón de alfavirus que contienen segmentos de genes estructurales de virus de influenza tipo A (IAV) se incluyeron en esa estrategia porque permiten actualizaciones rápidas de cepas. Las partículas de replicón de alfavirus son vectores de un solo ciclo defectuosos en la propagación que entregan material genético al citoplasma de la célula, pero no pueden propagarse de una célula a otra. El primer producto recombinante aprobado para la vacunación contra virus de influenza tipo A (IAV-S) en los EE. UU. fue una vacuna de partículas de replicón derivada de alfavirus autorizada por Harris vaccines (actualmente Merck Animal Health). Otra estrategia de vector viral adicional explorada en cerdos fue el uso de adenovirus humano de replicación defectuosa serotipo 5 (Ad5) como vector (Mancera, *et al*, 2020).

#### Vacunas de subunidades

Las vacunas de subunidades virales contienen antígenos proteicos que se fraccionan del virus completo o se expresan individualmente en un sistema recombinante. Una vacuna de subunidades consiste en una mezcla de proteínas más simple que el virus inactivado completo, lo que permite que las proteínas diana (como HA) se formulen con una mayor concentración y pureza (Nelson y Vincent, 2016).

#### Vacunas autógenas

Son vacunas hechas de una bacteria o virus específico "muerto" aislado de granjas infectadas. Por lo general, los fabrica una empresa con licencia en USDA para usar solo en el rebaño o la manda de un cliente. Para que un productor adquiera y utilice

una vacuna autógena, debe existir una relación veterinario-cliente válida. El organismo seleccionado se cultiva, se inactiva, generalmente con formalina y se estandariza para el contenido bacteriano o viral. Por lo general, no se prueban para determinar su seguridad o eficacia. Un ejemplo de este tipo de vacuna es contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* donde hay múltiples cepas diferentes, pocas de las cuales están presentes en las vacunas comerciales. Otro ejemplo, es el uso de bacterinas autógenas contra la epidermitis exudativa causada por *Staphylococcus hyicus*. Las vacunas autógenas contra la gripe porcina también se emplean ampliamente (Tizard I, 2021).

### **12.1.2 Vacunas Replicativas**

Vacunas con virus atenuados

Las vacunas vivas atenuadas contra el virus de la influenza (LAIV) consisten en virus producidos por genética inversa modificados genéticamente para reducir la replicación viral (Mancera, *et al*, 2020), son administradas directamente a la mucosa mediante la administración intranasal, imitando así la infección natural, este tipo de vacunas tienen el potencial de provocar una inmunidad de protección cruzada más amplia (Nelson y Vincent, 2016) dada por los anticuerpos de la mucosa, como son las IgA que son importantes para controlar el IAV-S, y la respuesta inmunitaria mediada por células inducida por la replicación de las LAIV siendo esencial para una protección cruzada más amplia contra la infección natural, ya que las células T reconocen principalmente epítomos conservados (Mancera, *et al*, 2020) y por tanto pueden presentar la mejor estrategia para vacunar contra la importante variación antigénica de los virus de origen humano que circulan en los cerdos

estadounidenses.(Nelson y Vincent, 2016). Se han probado tres estrategias diferentes de LAIV en cerdo, está la atenuación por truncamiento de proteína NS1 no estructural, la atenuación por mutaciones de genes de polimerasa y otra tecnología de atenuación es la modificación del sitio de escisión de HA para ser activado por la enzima elastasa en lugar de la tripsina que resulta en la atenuación del virus debido a la escasa presencia de elastasa en los tejidos del huésped en comparación con la tripsina (Mancera, *et al*, 2020).

La vacuna deseable debe ser fácil y segura de administrar, generar una respuesta inmune para conferir protección amplia heteróloga o incluso heterosubtipica, funcionar en presencia de MDA o inmunidad activa, y no inducir enfermedad potenciada asociada a vacunas (VAERD). Ninguna de las vacunas descritas cumple con todas las características descritas. (Mancera, *et al*, 2020).

### **12.1.3 Vacunas experimentales**

Otro tecnología explorada en la vacunación que se ha probado en cerdos son vacunas de plásmidos de ADN que codifican antígenos protectores y que son un concepto atractivo para la medicina veterinaria, incluida la inmunización contra IAV-S. Una vacuna de ADN ofrece una forma de inducir la expresión de proteínas de interés en las células del animal huésped, lo cual es clave para inducir una inmunidad mediada por células, pero sin exponer al huésped a ningún patógeno. La plataforma permite una combinación versátil de antígenos de múltiples cepas y la simple sustitución de una cepa por otra. Se considera que los anticuerpos maternos tienen menos probabilidades de impedir la vacunación con ADN, en comparación

con las inyecciones de antígenos proteicos o virus atenuados. (Sandbulte, *et al*, 2015)

En México se encuentran disponibles comercialmente vacunas con virus completo-inactivado, en la tabla 2 se muestran las vacunas disponibles con sus correspondiente cepas con las que están elaboradas.

Nombre de la vacuna	Fabricante	Linaje IAV-S incluido	Nombres de cepas específicas (si esta disponible)
FluSure XP®	Zoetis	Delta-1 H1N2 Delta-2 H1N1 Gama H1N1 Grupo IV H3N2	A/Sw/Oklahoma/0726H/2008 (H1N2) A/ Sw/Carolina del Norte/031/2005 (H1N1) A/Sw/Iowa/110600/2000 (H1N1) A/Sw/Missouri/069/2005 (H3N2)
Gripork®	HIPRA		(Hsw1 N1) OLL A (Hsw3 N 2) G A (Hsw3 N2)
Innovac® IP	Avimex		H1N1 H3N2
Porcimune®Influenza	Lapisa		H1N1 H3N2

**Tabla 2.** Vacunas contra IAV disponibles en México (Mancera, *et al*, 2020).

Es importante seguir las instrucciones del fabricante con respecto a la dosis, vía de administración y cualquier período de espera, si esto no se hace de manera correcta puede desencadenar reacciones adversas (Dyer RM, 2021).

## 12.2 Programas de vacunación

Los protocolos de vacunación exitosos son más complejos de lo que parecen debido a múltiples factores que pueden interactuar con la inmunidad posvacunal; por lo tanto, se requiere un enfoque holístico que considere todos estos agentes para lograr una eficacia adecuada de la vacuna, y por tanto proteger a los cerdos contra

diversas enfermedades y así minimizar las pérdidas económicas, además de conferir mayor seguridad en cuanto a la salud pública se trata (Augustyniak y Pomorska-Moil, 2023).

La vacunación en cerdas previas a la reproducción es para protegerlas de fallas reproductivas y pensando en la inmunidad pasiva que se confiere a los lechones, se pueden incluir vacunas contra la leptospirosis, la erisipela y el parvovirus. Muchas granjas vacunan a las cerdas gestantes contra *E. coli* enterotoxigénica para proporcionar inmunidad calostrual contra la diarrea en los lechones. Otras vacunas que se pueden considerar incluyen aquellas dirigidas contra PRRSV, influenza porcina y *Lawsonia intracellularis*. Ya que la inmunidad materna dura seis semanas, en lechones la vacuna contra la influenza porcina debe administrarse a las siete u ocho semanas de edad (Tizard I, 2021).

No existe una estrategia de vacunación única es decir que todo se adapta según sea el caso por ejemplo de las prevalencias de agentes infecciosos que circulan en el país, estado y en la granja misma (Thompson, Benjamin y Brown, 2022).

Recomendaciones para vacunar contra IAV´s

Lechones menores de seis meses

Vacunar a los lechones durante 3 a 5 semana por vía intramuscular, seguida de una segunda dosis 2 a 3 semanas después. Revacunar semestralmente (Tizard IR, 2021).

Cerdos adultos

Vacunar a cerdos reproductores con dos aplicaciones con 3 a 5 semanas de diferencia y revacunación antes de la reproducción. Con 21 días de retiro (Tizard IR, 2021).

### **13. Antecedentes**

En 2009, surge en México un subtipo H1N1 con un distinto reordenamiento a los que ya circulaban entonces, siendo este el primer virus pandémico en pleno siglo XXI, propagándose eficientemente en la población humana pero también en la población porcina de América del norte al igual que en Europa en circulación junto con el endémico. Fue entonces que en 2010 el grupo de investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdo (DMZC- UNAM) se dio a la tarea de determinar la circulación viral de los subtipos H1N1 y H3N2 de influenza porcina en el Bajío del país, donde se determinó que se encuentra ampliamente distribuido y se corroboró la circulación de los distintos subtipos resultando el H1N1 con mayor seroprevalencia (Carrera, 2010). Estudios posteriores demostraron que en 2012 se reportó la circulación del subtipo H1N2 (Gaitán, 2016) para ese entonces se consideraba como un virus exótico y estaba prohibida su vacunación, por lo que el grupo de investigación demostró con evidencia serológica que al menos desde el año 2010 este subtipo H1N2 circulaba en la población porcina mexicana y demostró que los subtipos H1N1 (A/swine/México/EdoMex752/2010(H1N1) y el subtipo H1N2(A/swine/MexMic/DMZC/2014(H1N2) no están relacionados antigénicamente (Gaitán, 2016). Dado que el virus de influenza presenta factores que favorecen la adaptación de infección a la población humana y representa un riesgo a la salud pública, en 2017 se evaluó el riesgo de infección mediante un estudio *in vitro*, como

resultado se obtuvo que los influenza virus porcinos mexicanos poseen la capacidad de infectar células de origen humano que expresen receptores SA-a2,2 ySA-a2,6 (Martínez, 2017). Todo lo anterior conduce a tener la necesidad de establecer políticas de vigilancia epidemiológica para comprender los procesos evolutivos y diseminación de los influenza virus por lo que en 2019 se hizo un análisis de secuenciación de los diferentes subtipos que se han adaptado la población porcina en México; este estudio demostró que los virus son antigénicamente diferente entre ellos además de que se identificó un subtipo de origen humano en cerdos el H1N2 con una seroprevalencia de 26.74% (Saavedra- Montañez, 2019).

## **14. JUSTIFICACIÓN**

El virus de la influenza porcina tipo A es uno de los agentes de enfermedades infecciosas más importantes de los cerdos, a pesar de no ser una enfermedad que se caracterice por su alta tasa de mortalidad, el impacto económico en la industria porcina se ve afectada por la reducción en el crecimiento de cerdos, prolonga el tiempo de estadía en la granja, además de mencionar su gran potencial zoonótico, teniendo en cuenta las importantes consecuencias las medidas de control y prevención son necesarias. La finalidad de este estudio es evaluar una vacuna que genere anticuerpos protectores usando los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2 que se encuentran circulando en el país.

## **15. HIPÓTESIS**

Una vacuna formulada con subtipos actuales H1N1 H3N2 y H1N2 de IAV-S inducirá una respuesta inmune protectora contra la infección de virus de influenza porcina tipo A.

## **16. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la capacidad protectora de la vacuna experimental contra influenza porcina.

### **16.1 Objetivos específicos**

1.- Evaluar la respuesta inmune humoral mediante el uso de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

2.- Determinar la concentración de carga viral en cerdos vacunados y desafiados a través de hisopados nasales mediante la prueba de RT-PCR cuantitativa.

3.- Evaluar los signos clínicos, lesiones macroscópicas y microscópicas de los cerdos en experimentación.

## **17. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **17.1 Replicación viral**

La replicación de los subtipos A/Swine/EdoMexico/2021 (H1N1), GtoDMZCC01/2014 (H1N2) y A/Swine/México/2020 (H3N2) se realizó a partir de embrión de pollo (EP) libre de patógenos específicos de entre 9 a 11 días.

Material y Reactivos:

- Embrión de pollo libre de patógenos específicos (SPF)
- Alícuotas de 1 ml del virus a replicar (la cantidad a utilizar en total dependerá de cuantas inoculaciones se hagan)
- Jeringa de 1 ml
- Resistol liquido
- Aguja hipodérmica
- Alcohol 70%
- Lápiz
- Ovoscopio o lámpara
- Equipo de protección (bata. Guantes, cubrebocas)

Nota. El procedimiento se realizó dentro de un gabinete de flujo de aire en un medio estéril para evitar contaminación.

Procedimiento para replicación viral en embrión de pollo (EP):

A la llegada de los embriones de pollo con ayuda de un ovoscopio se revisó la viabilidad de embrión y permanecieron en incubación durante 24 hr con la finalidad de estabilizarlos.

- I. Con un lápiz se trazó una línea alrededor de la cámara de aire y se realizó una marca para identificar la posición del embrión.
- II. Se desinfectó la cáscara con alcohol 70% y realizó una perforación con aguja hipodérmica en sitio de inoculación siendo la cavidad alantoidea (OMSA, 2018).
- III. Los EP fueron inoculados con 200 uL del virus por medio de jeringas insulínicas de 1ml.
- IV. El orificio de la inoculación se cubrió con resistol blanco para impedir la entrada de contaminantes o partículas externas.
- V. Se dejó incubar a 37 °C durante 72 hr, a través del cual se monitoreó cada 24 hr para comprobar la viabilidad del embrión, aquellos embriones muertos a las 24 hr fueron desechados, solo aquellos muertos a las 48hr se consideraron para la recolección del virus.
- VI. Transcurridas las 72 hr se colocaron a los embriones en refrigeración durante 2 hr con la finalidad de favorecer la muerte.

- VII. Posterior a la incubación en frío se realizó la recolección del líquido alantoideo donde el virus replicó, esto se hace creando una apertura en la cámara de aire y atravesando la fáfara de manera cuidadosa sin romper algún vaso sanguíneo.
- VIII. La recolección se hizo mediante una jeringa y se colocó en un tubo de 15ml o 50 ml dependiendo del volumen extraído.
- IX. El fluido se centrifugó a 2500rpm durante 10 min con la finalidad de eliminar los precipitados que pudiesen quedar.
- X. Se mantuvo en congelación hasta su uso, aunque cabe destacar que su conservación depende del tiempo en que se vaya a ocupar se puede mantener en refrigeración 4°C si el tiempo en el que se use no es prolongado o bien -70°C hasta su uso, además de que es importante recalcar no resguardar los aislamientos a -20° C pues los virus de influenza son muy inestables a esta temperatura (IPK, 2003).

### **17.1.1 Titulación viral**

#### Material y reactivos

- Solución al 0.5% de eritrocitos de ave en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con un (pH 7.2-7.4)
- PBS (pH 7.2-7.4)
- Micropipeta multicanal
- Puntillas de 200 uL y 100 uL
- Microplaca de 96 pozos de fondo en U

#### Procedimiento:

- I. Se identificó la microplaca de 96 pozos de fondo en U.
- II. Añadió 50uL de PBS a los pozos de fila (1 A -12 A)
- III. Agregó 50 uL del virus únicamente a la fila 1 re-suspender de 7 veces hasta que se homogenice bien y transferir sucesivamente 50 uL a la siguiente fila y así sucesivamente hasta el último pozo. Se descarta los últimos 50 uL.
- IV. Se añadieron 50 uL de la solución de eritrocitos de ave al 0.5% a cada pozo con virus diluido para este paso se recomienda hacerlo desde la menor dilución a la dilución más alta que es de la fila 12 A -1A.
- V. Se dejó la placa a temperatura ambiente y se monitoreo cada 15 min para dar un tiempo de lectura final de 45-60 min.

#### Lectura y anotación de la hemaglutinación:

- Hemaglutinación completa: + los eritrocitos permanecen en suspensión
- Hemaglutinación incompleta: + / - (solo una porción de los eritrocitos aglutina o quedan parcialmente sedimentados).
- Ausencia de hemaglutinación: O. (los eritrocitos forman un botón compacto en el fondo del pozo).

El título se corresponde con la dilución más alta del antígeno control o de los aislamientos que mostro hemaglutinación completa, en la cual los eritrocitos forman una capa homogéneamente distribuida (IPK, 2003) como se muestra en la figura 3.



**Figura 3. Esquema de patrones de aglutinación (IPK , 2003).**

## 17. 2 Formulación de la vacuna

Los antígenos utilizados son del virus replicado en embrión de pollo, se titularon previamente, si era el caso se realizó una dilución con solución PBS para tener un título de 128 UH que corresponde a una concentración aproximada de  $1 \times 10^7$  copias/ reacción (Mora JC, 2014).

Procedimiento:

- I. De cada subtipo previamente diluido a 128 UH se inactivó con luz ultravioleta (UV) durante 60 min.
- II. Posteriormente se agregó 0.02% de formaldehído a la mezcla con el volumen final de los 3 subtipos y se homogenizó adecuadamente.
- III. Se añadió el adyuvante MONTANIDE ISA 71VG a proporción 1:1 y se homogenizó.
- IV. Una vez preparada la vacuna se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta el momento de la vacunación.

### 17. 3 Grupos experimentales

Se utilizaron 18 lechones de 18 días de edad libres de anticuerpos contra el virus de la influenza porcina provenientes de CEIEPP Jilotepec, los cuales fueron mantenidos en las instalaciones de aislamiento del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdo (FMVZ, UNAM).

Se formaron en 3 grupos de 6 cerdos cada uno, de acuerdo con el tratamiento y manejo que se les daría los cuales quedaron de la siguiente manera:

Grupo	Descripción
A	Vacunados - Desafiados
B	No vacunados - Desafiados
C	Testigo no Vacunado -No desafiado

**Tabla 3. Grupos experimentales**

### 17.4 Vacunación

#### 17.4.1 Primera dosis de vacuna

Se realizó a los 22 días de edad a los lechones del grupo A con un volumen de 1 ml vía intramuscular profunda en la tabla del cuello.

#### 17.4.2 Segunda dosis de la vacuna

Se realizó a los 43 días de edad a los lechones del grupo A con un volumen de 1 ml vía intramuscular profunda en la tabla del cuello.

### **17.5 Desafío**

A los 53 días de edad fueron desafiados con los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 del virus de influenza porcina de cada subtipo con una proporción 1:1 con un volumen final de 1 ml por lechón para la infección, estos virus fueron diluidos de manera que tuvieran un título de 128 UH con PBS.

Todos los días se monitorearon los cerdos dos veces al día (mañana-tarde) durante 10 minutos hasta el día del sacrificio con la finalidad de evaluar y llevar un registro de los signos clínicos característicos de la enfermedad, además de que se llevó a cabo un registro de la temperatura corporal diaria hasta el día del sacrificio tomada cada mañana.

### **17.6 Toma de muestras**

Se tomaron muestras de sangre y de hisopado antes de la primera inmunización, los cuales fueron conservados en congelación -70°C hasta su uso.

Para el caso de la sangre se procesaron al momento para la determinación de la presencia o no de anticuerpos contra el virus de influenza y se muestrearon los cerdos 8 días después de la primera dosis de la vacuna identificado como tiempo 1 (T1), 6 días después (T2), 7 días después (T3) y segunda aplicación de la vacuna y 8 días post- desafío.

El día del sacrificio se tomó muestra de sangre y de hisopado nasal utilizando hisopos estériles que se sumergieron en PBS estéril y se conservaron en congelación -70°C hasta su procesamiento, la finalidad de tomarlas fue para determinar la carga viral de la excreción nasal mediante la técnica de RT-PCR.

#### Necropsia de los cerdos

Se realizó a los 61 días de edad de los cerdos y 8 días post- desafío, fueron sacrificados con la finalidad de observar lesiones macroscópicas características de la enfermedad y el muestreo de tejidos para su posterior procesamiento mediante RT-PCR.

Se tomaron 2 muestras de cada lado del pulmón del cerdo, 2 de tráquea y 2 de tonsilas de 3 cm<sup>3</sup>, una muestra de cada tejido se puso en un frasco previamente identificado en formol al 10% y se mandó al departamento de patología de la FMVZ-UNAM, donde se realizó un estudio histopatológico, la otra muestra de cada tejido se conservó en un frasco identificado y se congeló a -20°C hasta su posterior uso.

**17.7 Inhibición de la hemoaglutinación tipo  $\beta$**  (Saavedra- Montañez, 2019).

#### Tratamiento o adsorción del suero

#### Material y reactivos

- Solución al 5% de eritrocitos de ave en solución PBS (pH 7.2-7.4)
- Caolín 25% en solución PBS (pH 7.2-7.4)

- Micropipetas 200 uL
- Puntillas de 200 uL
- Tubos de 1.5 ml
- Suero problema

Este procedimiento previo consiste en eliminar la aglutininas naturales (no-especificas) del suero (OMSA, 2018).

Procedimiento:

- I. En un tubo de 1.5 ml se agregó 60 uL de suero y se inactivo mediante baño maría a 56°C durante 30 minutos.
- II. Trascurrido el tiempo se agregó 120 uL de caolín y se re-suspendio.
- III. Posteriormente se agregó 120 uL de eritrocitos de ave al 5 %.
- IV. Se dejó incubando a 4 °C durante 24 hr.

Material y reactivos

- Microplaca de 96 pozos de fondo en U
- Micropipeta multicanal
- Micropipetas de 200UI
- Puntillas de 200 uL
- Sueros tratados
- Solución al 0.5% de eritrocitos de ave en PBS (pH 7.2-7.4)
- PBS (pH 7.2-7.4)
- Alícuotas del virus.

#### Procedimiento:

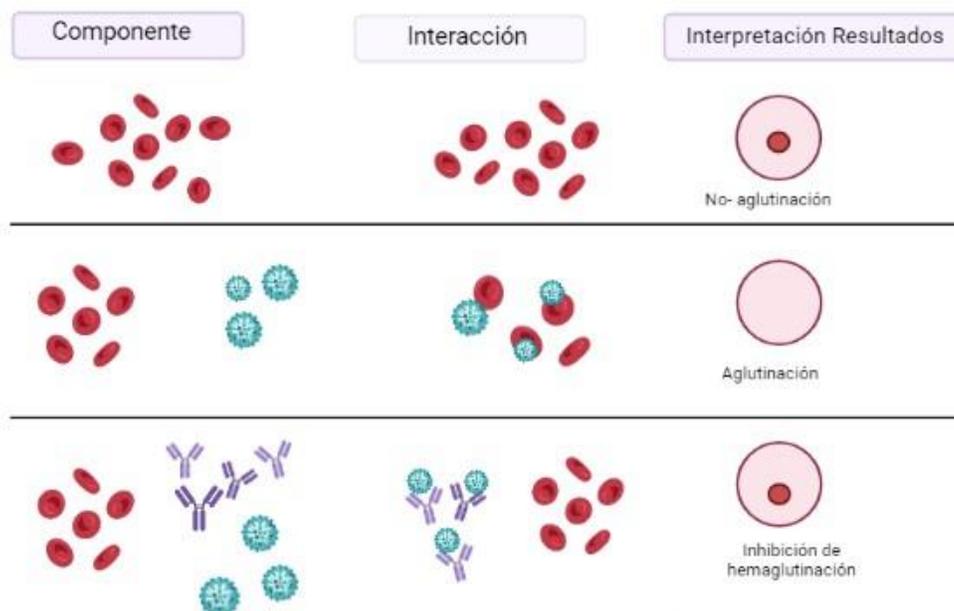
- I. Se hizo una dilución del virus de manera que esté al final tenga una concentración de 8 unidades hemaglutinantes (UH) PBS.
- II. Rotuló e identificar la placa y se agregó de la fila 1A – 12A, el número de filas a ocupar dependerá del número de muestras a evaluar y de los distintos subtipos virales si es el caso.
- III. Se identifico la fila 1A-12 A como el control positivo del virus donde se agrego 50 uL de PBS, posteriormente al primer pozo se agregó 50 uL del virus previamente diluido a una concentración de 8 UH, posterior a ello se agrego 50 uL de eritrocitos de ave .5% (titulación del virus).
- IV. Agregó 50 uL de PBS a la placa de la fila 2A – 12A.
- V. Añadió 50 uL del suero tratado, resuspender de 7 veces hasta que se homogenice y transferir sucesivamente los 50 uL hasta el último pozo y descartar los 50 uL restantes, esto con la finalidad de tener diluciones dobles seriadas desde 1:10 hasta 1:20480.
- VI. Se añade 50 uL del antígeno diluido a 8 UH de la 1A – 12A, dejando incubar a 4°C durante 20 minutos por cada suero.
- VII. Trascurrido el tiempo se agrega 50 uL de eritrocitos de ave al 0.5% de la 1A – 12A.
- VIII. Esperar el tiempo de lectura basándose en su control positivo cuando esté formado el botón del fondo o este sedimentado.

#### Lectura e interpretación:

Una muestra se considera positiva para un determinado subtipo de hemaglutinina si se inhibe la hemaglutinación. La prueba se considera válida si el antígeno positivo de referencia y su antígeno homólogo muestran el título de HI esperado y si la titulación por retroceso de cada antígeno (desconocido y control positivo) es de 8 HAU. Si no se cumplen estas condiciones, debe repetirse la prueba (OMSA, 2018).

El título se obtiene del último pozo donde se observa el botón o el sedimento. En general, se acepta que un título de HI de 1:40 contra ciertas cepas del virus de la influenza se correlaciona con una tasa de protección aproximada del 50 % contra infecciones por cepas homólogas (Saavedra- Montañez, 2019). En este trabajo se consideró este valor como referencia para observar una muestra positiva

En este proyecto se realizaron las pruebas de IH cada 7 días a partir de la primer dosis de la vacuna y 8 días post-desafío, esta prueba se realizó para los tres subtipos H1N1, H1N2, H3N2. Los títulos se transformaron a logaritmo base 10 para su análisis.



**Figura 4. Fundamento e interpretación de la prueba de inhibición de la hemaglutinación. Modificado (CDC, 2022).**

## 17.8 RT-PCR Tiempo real de muestras de hisopado nasal

### 17.8.1 Extracción de RNA viral

Se hizo mediante la utilización del kit QIAmp RNA (QUIAGEN®) el procedimiento se hace de acuerdo con las especificaciones del fabricante, las cuales se describen brevemente.

Procedimiento:

- I. En tubo cónico con tapa de 1.5 ml se añadió 560 uL de Buffer AVL – Carrier y en este mismo tubo se adiciono 140 uL de la muestra (durante la toma de la muestra se debe resuspender bien pues se trata de una muestra

previamente en congelación), se agito vigorosamente (Vortex) y se dejó incubar 10 min a temperatura ambiente.

- II. Posteriormente se adicionaron 560 uL de etanol al 96% y homogenizo, se prepararon en una gradilla un tubo colector y una columna a esta última se le agregó 630 uL de la mezcla y se centrifugó a 8000rpm durante 1 min.
- III. Se desechó el contenido del tubo colector y se colocó otro tubo colector a la columna, transfiriendo nuevamente 630 uL de la mezcla, se centrifugo y desecho el tubo colector.
- IV. Se coloco otro tubo colector a la columna y se agregaron 500 uL de AW1 a esta última y se centrifugo igualmente 8000rpm durante 1 minuto, se desechó el tubo colector.
- V. De nuevo se colocó un nuevo tubo colector a la columna y se adicionaron 500 uL de Buffer AW2 a la columna, se centrifugo a 13200 rpm durante 3 minutos y se desechó el tubo colector.
- VI. Por último, se pasó la columna a un tubo de 1.5 previamente identificado y se adicionaron a la columna 60 uL de buffer AVE, se incubo durante 1 minuto y se centrifugo a 8000rpm durante un minuto, se desechó la columna y se cerró el tubo cónico con tapa de 1.5 ml y almacenó en refrigeración o congelación hasta su uso, aquí se encuentra ya el material genético obtenido.

### **17.8.2.RT-PCR**

Una vez obtenido el RNA, a través de la técnica de RT-PCR tiempo real, se determinó la presencia de material genético de influenza presente en los hisopados nasales de los cerdos.

Se utilizó el kit VetMax swine Influenza Virus RNA (Applied Biosystem) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

A continuación, se describe brevemente el procedimiento:

En un tubo de 0.6 ml se preparó el total del Mix que se utilizó, adicionando 17 uL por muestra que se va a analizar. Posteriormente en tubos de 0,2 ml (previamente identificados) se agregó a cada tubo 17 uL de mix más 8 uL de cada muestra, finalmente se mete al termociclador de tiempo real Rotor Gene 5 plex (QIAGEN®).

## **17.9 RT-PCR Tiempo real de muestras de pulmón, tráquea y tonsila**

### **17.9.1 Extracción de RNA viral de pulmón, tráquea y tonsila**

Antes de la extracción del material genético, los tejidos se maceraron, proceso que consiste en descongelar el tejido y cortar un trozo de 1 cm<sup>3</sup> aproximadamente por cada tejido se ocupa un mortero distinto con la finalidad de no mezclar las muestras además de evitar contaminación. El tejido se maceró con un mortero estéril que se le agregó de 2-3 gr de arena hasta quedar con una consistencia de masa, posteriormente se le agrega de 1 a 3 ml de PBS estéril, al final debe de tener una apariencia líquida adecuadamente homogenizada. Este líquido obtenido fue transferido a un tubo de 1.5 ml o dependiendo del volumen final obtenido que será

centrifugado a 2500 rpm durante 10 min y se recolectará el excedente en otro tubo y así obtener un fluido más limpio, el cual se conservó en congelación hasta su uso.

Procedimiento de extracción de RNA mediante la técnica de perlas magnéticas MagMax CORE® Nucleic Acid Purification Kit:

- I. En un tubo de 1.5 ml se adiciona 495 uL de solución de lisis y 300 uL de muestra se agita en un vortex y se centrifuga a 15 000g por 2 minutos.
- II. En otro tubo se adicionan 600 uL de la mezcla y se agregan 30 uL del mix de perlas que está conformado por 20 uL de perlas y 10 uL de proteinasa K, se agita en un vortex y se centrifuga a 500g por 10 segundos, posteriormente se agregan 350 uL de solución de unión, se agita brevemente y se deja la muestra en el soporte magnético durante 3 min, transcurrido el tiempo se retira el sobrenadante y la muestra del soporte.
- III. Se adicionan 500 uL de solución de lavado 1, se agita y centrifuga a 500g por 10 segundos, se coloca nuevamente la muestra en el soporte durante 1 min, se retira el sobrenadante y la muestra del soporte magnético.
- IV. Se añade 500 uL de solución de lavado 2, se agita y centrifugar a 500g por 10 segundos, se coloca nuevamente la muestra en el soporte magnético durante 1 min, se retira el sobrenadante y se deja la muestra durante 5 minutos en el soporte magnético con la tapa abierta con la finalidad de que las perlas se sequen.
- V. Posteriormente se retira la muestra del soporte magnético se agrega 90 uL de solución de elución, se agita y centrifuga a 500g por 10 segundos, se coloca las muestras en el soporte durante un min y se transfiere el

sobrenadante en un nuevo tubo previamente identificado, para ser resguardado en congelación -70°C hasta su uso.

### **17.9.2 RT-PCR Tiempo real**

Una vez obtenido el RNA de las muestras de los tejidos pulmonares, tráquea y de las tonsilas se realizó el RT-PCR tiempo real utilizando la misma técnica previamente descrita.

## **18. RESULTADOS**

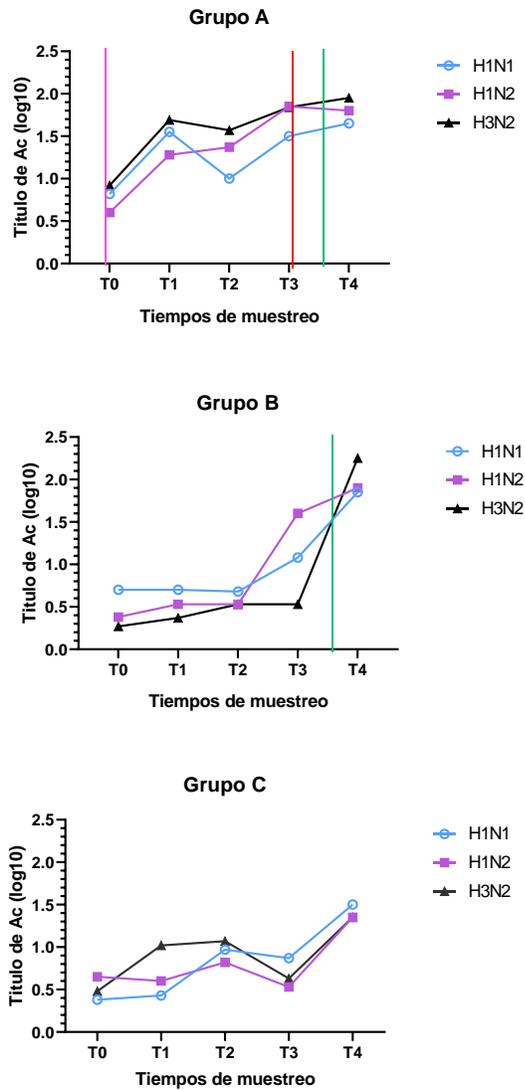
### **18.1 Prueba de inhibición de la Hemaglutinación**

La prueba se empleó con la finalidad de determinar si la vacunación logró generar anticuerpos específicos contra las cepas utilizadas H1N1, H1N2 y H3N2 como se muestra en la figura 5. Los resultados demostraron que en el grupo C (grupo control negativo) se detectaron títulos menores de anticuerpos específicos contra los 3 subtipos de virus de influenza A y un aumento de los tres subtipos virales después del T3 hasta el término del experimento. Por otra parte, también se observa que en el grupo B (no vacunado-desafiado) los títulos de anticuerpos específicos para los tres subtipos de virus de influenza A se mantienen bajos en todo el experimento hasta el momento del desafío, observándose un aumento para el subtipo H3N2 de 1.92 veces más, 0.3 para el subtipo H1N2 y 0.8 para el H1N1. El grupo A (cerdos vacunados-desafiados) presenta títulos de anticuerpos distintos en comparación a los detectados en los otros dos grupos experimentales; se hace evidente que los títulos de anticuerpos aumentan desde los seis días (T1) posteriores y hasta el

desafío. En este tiempo, la figura 5 (A) nos indica que se observan más títulos de anticuerpos específicas contra el virus H3N2 y 0.1 veces menor que el virus de influenza A H1N2; en el caso de los anticuerpos contra el virus del H1N1, en el T1 son ligeramente menores a los inducidos por el virus H3N2, pero superiores a los H1N2. Cuando observamos el T2 (14 días después de la primera dosis) los niveles de anticuerpos específicos contra el virus de influenza A H1N1 son menores a los títulos de anticuerpos detectados en T1 contra este mismo virus, pero estos se incrementan de nuevo en los tiempos posteriores a la segunda inmunización.

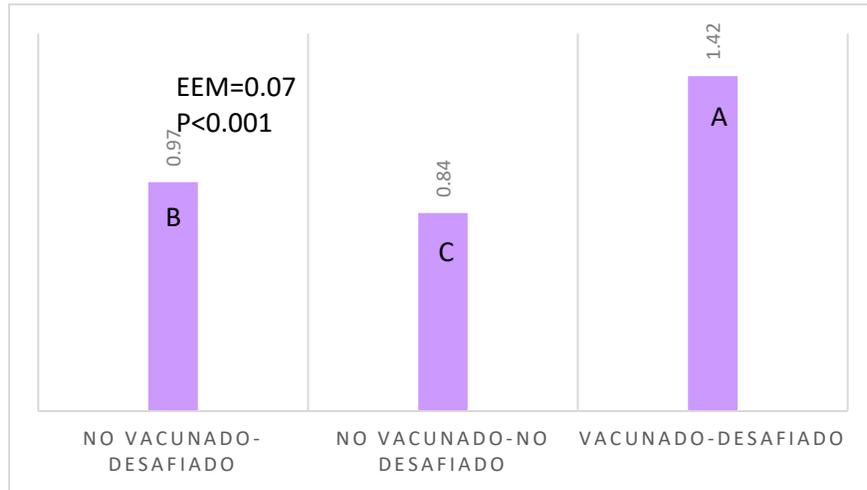
Por otra parte, la gráfica 1 demuestra que los cerdos vacunados-desafiados presentan 0.45 veces más anticuerpos que el grupo desafiado-no vacunado, por tal motivo se observa la respuesta inmune generada por la vacuna. El grupo C es diferente a los grupos A y B.

La grafica 2 indica el valor promedio de los títulos de anticuerpos específicos de cada subtipo viral generados durante los 5 muestreos en el grupo vacunado-desafiado y el grupo no vacunado-desafiado, donde se demuestra que el subtipo H3N2 es quien genero una mayor respuesta inmune a comparación de los otros dos subtipos con una diferencia de 0.9.



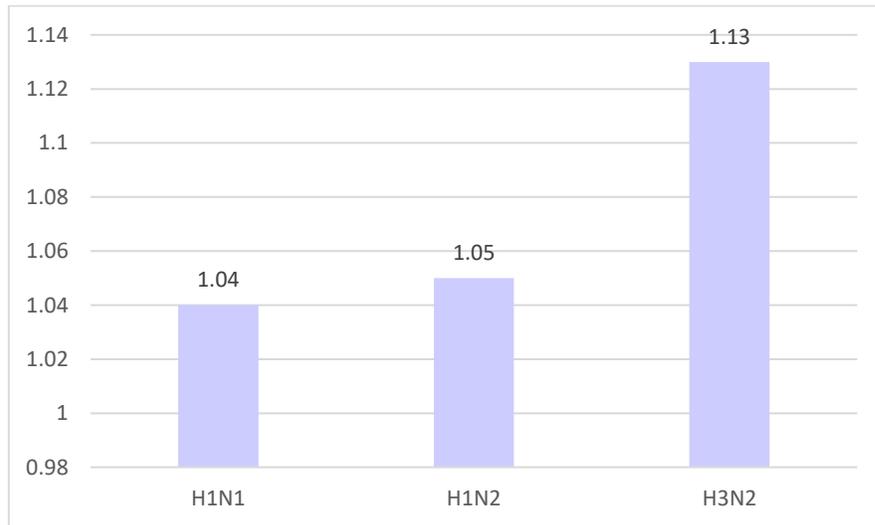
**Figura 5. Títulos de anticuerpos específicos inducidos después de la vacunación.** Se muestran los títulos de anticuerpos específicos expresados en  $\log_{10}$  contra los 3 subtipos de virus de influenza A empleados en la vacuna experimental. Grupo A (cerdos vacunados- desafiados); Grupo B (cerdos NO vacunados y desafiados); Grupo C (control negativo). En el eje X se marcan los tiempos experimentales. La línea rosa marca el tiempo de la primer dosis de vacuna; la línea roja la segunda dosis; la línea verde el momento del desafío.

**Gráfica 1. Títulos de anticuerpos inducidos de los tres grupos experimentales.**



En el eje de la X se presentan los tres grupos experimentales.

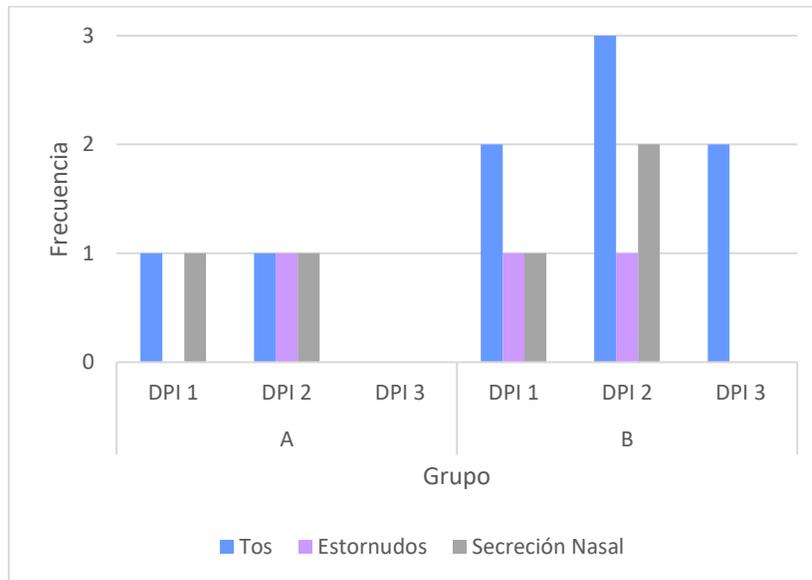
**Gráfica 2. Títulos de anticuerpos promedio de cada subtipo viral.**



## **18.2 Signos clínicos**

Los signos clínicos en los cerdos únicamente se observaron los primeros tres días pos-infección. En la gráfica 1 se observa que el grupo A, que recibió la vacuna experimental, un día posterior al desafío experimental presentó muy poca frecuencia de tos y mínima secreción nasal, situación que se mantuvo similar al segundo días posterior al desafío, con la diferencia que en este segundo día también se observó una ligera frecuencia de estornudos, sin embargo, estos 3 signos clínicos desaparecieron completamente tres días después de haber realizado el desafío experimental. Por otra parte, cuando observamos la signología clínica en los cerdos que no recibieron la vacuna experimental (grupo B) observamos como, en el caso de la tos, la frecuencia es 2 veces mayor desde el primer día posterior al desafío y se incrementa hasta 3 veces más el segundo día en comparación al primer día, sin embargo, ésta disminuye al tercer día después del desafío de manera similar a como se observó al día 1. Además, en este grupo se observa que los estornudos se encuentran presentes desde el día 1 pos-desafío y estos se mantienen similares el segundo día hasta desaparecer a los 3 días después de haber sido desafiados. En el caso de la secreción nasal, esta se observa desde el primer día posterior al desafío, se incrementa 2 veces más el día 2 y al tercer día disminuye a los mismos niveles observados el primer día posterior al desafío. Por otra parte, el grupo C al ser el control negativo no presento signos clínicos.

**Gráfica 3. Signos clínicos observados después de desafiar los cerdos con los 3 subtipos virales.**

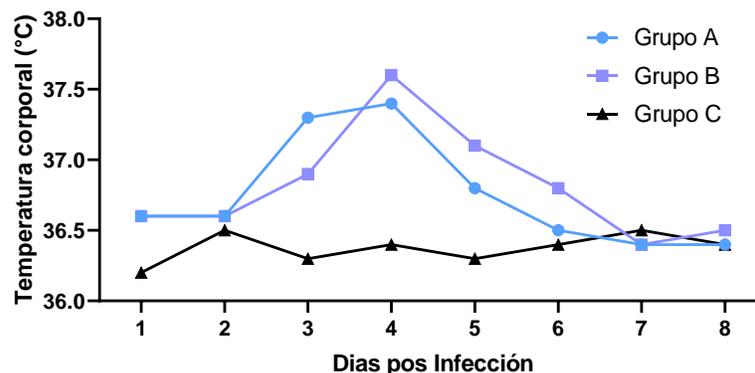


Comparación entre el grupo A y B con respecto a la frecuencia de los signos clínicos presentados los primeros 3 días pos-infección (DPI).

### 18.3 Temperatura corporal de los cerdos

La temperatura se registró diariamente desde el día 1 posterior a la inoculación de los 3 subtipos de virus de influenza A hasta el día de sacrificio. Tal como se presenta en la gráfica 2, el grupo C (control negativo) durante los 8 días mantiene una temperatura corporal constante que en promedio fue de 36-36.5°C. Al observar la temperatura corporal de los cerdos que recibieron la vacuna experimental (el grupo A) los días 1 y 2 mantienen su temperatura en 36.5°C sin embargo, los días 3 y 4 presentan un aumento de temperatura promedio, la cual se reestablece a los niveles iniciales al día 6 posterior al desafío y se mantiene así hasta el momento del sacrificio; El grupo B (cerdos desafiados sin vacuna) presenta el pico más alto de temperatura corporal registrado, el cual fue superior a las 37.5 °C el día 4 posterior al desafío, teniendo una diferencia de .4°C entre el grupo B y A. Este aumento de temperatura se registró desde el día 3 y regreso a sus niveles iniciales hasta el día 7 posterior a que se les inocularon los 3 subtipos de virus de influenza utilizados.

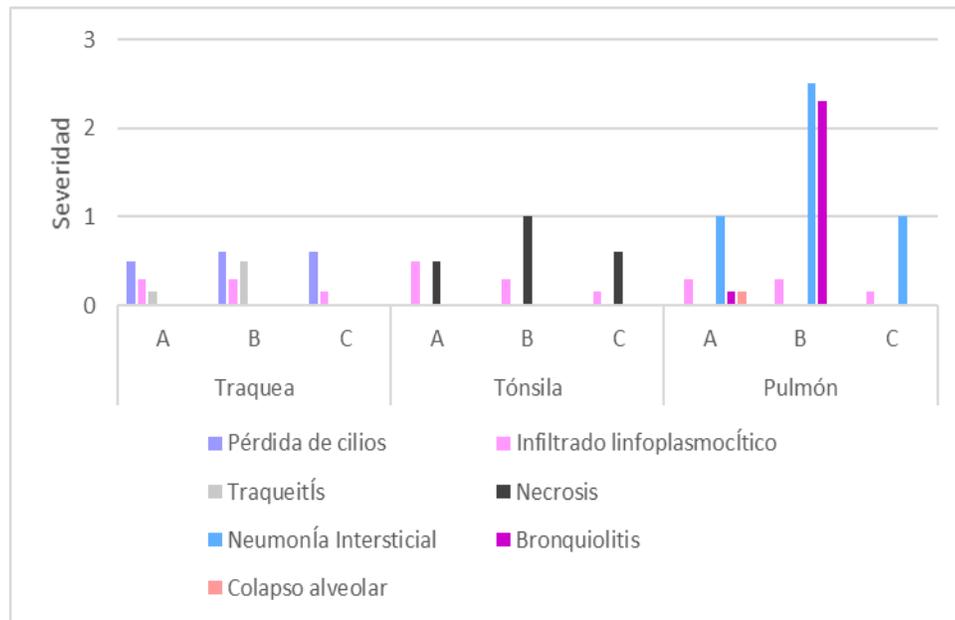
**Gráfica 4. Temperatura corporal promedio registrada en los días posteriores al desafío.**



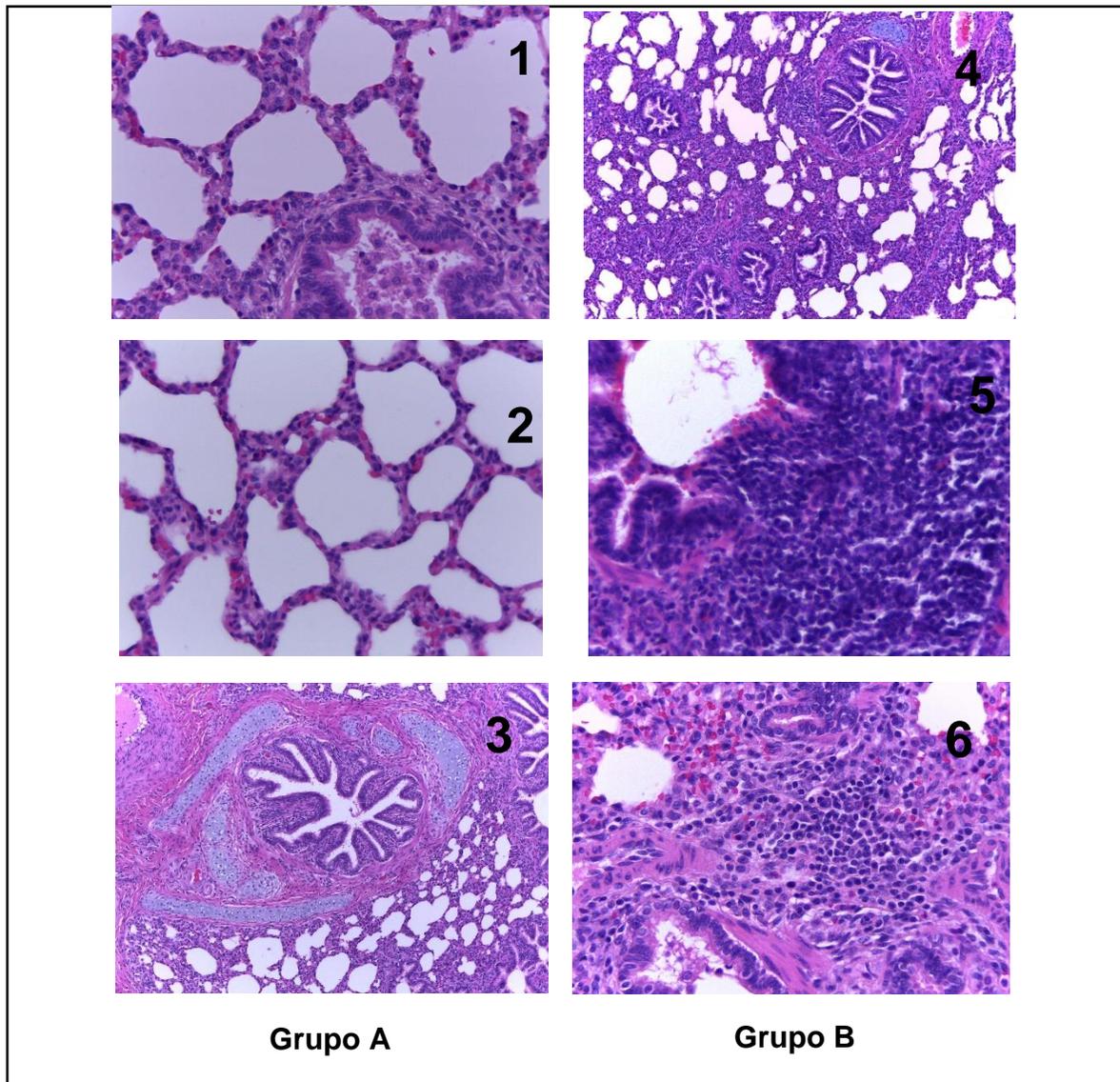
#### **18.4 Lesiones histológicas**

Las lesiones que se analizan en la gráfica 3 fueron seleccionadas del estudio histopatológico de aquellas que coinciden con las lesiones histológicas típicas que se observan en una infección por virus de influenza. Al observar la tráquea en los tres grupos se obtienen observaciones similares en cuanto a las lesiones que se describen, del que se distinguen la pérdida de cilios e infiltrado linfoplasmocítico, sin embargo, los grupos A y B presentan traqueítis; las tres lesiones de ambos grupos se clasifican de forma leve. Al observar las tonsilas en los tres grupos se observan las mismas lesiones: que son necrosis e infiltrado linfoplasmocítico leve. Al observar las lesiones del pulmón en el grupo C (control negativo) se observa neumonía intersticial e infiltrado linfoplasmocítico leve. Por otra parte, el grupo que recibió la vacuna (grupo A), además presentó bronquiolitis y colapso alveolar clasificados como leve, sin embargo, el grupo B a pesar de que comparte el infiltrado linfoplasmocítico leve, presenta neumonía intersticial y bronquiolitis moderada.

**Gráfica 5. Representación gráfica de la severidad y de las lesiones microscópicas presentes de cada tejido muestreado entre los tres grupos después del desafío.**



En el eje Y se muestra la severidad de la lesión: 1= leve; 2 = moderado; 3 = severo.



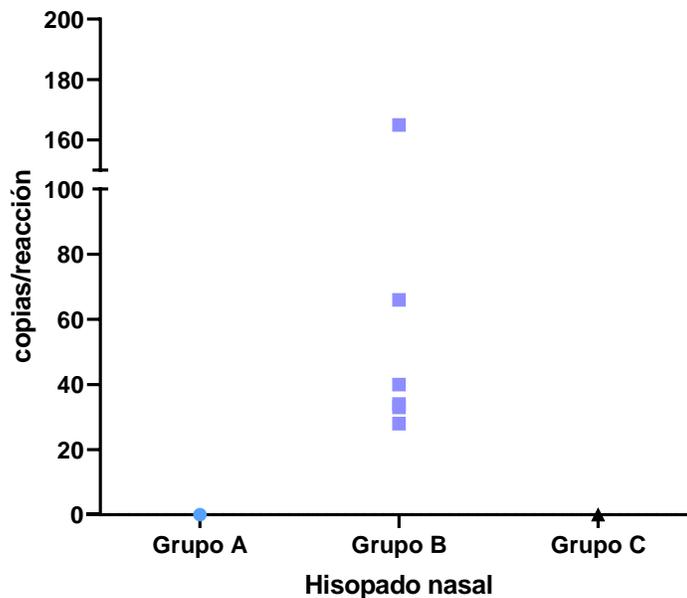
**Figura 6. Lesiones histológicas del grupo A y B.** La sección del pulmón del grupo A representa el epitelio alveolar y se observan los neumocitos tipo II bien definidos **(1 y 2)** Los bronquios pulmonares normales **(3)**, en el grupo B se observa neumonía intersticial leve, infiltrado linfoplasmocítico (inflamatorio) e hiperplasia de epitelial alveolar **(4)**, las células predominantes en el infiltrado está compuesto por linfocitos **(5 y 6)**.

### 18.5 RT- PCR

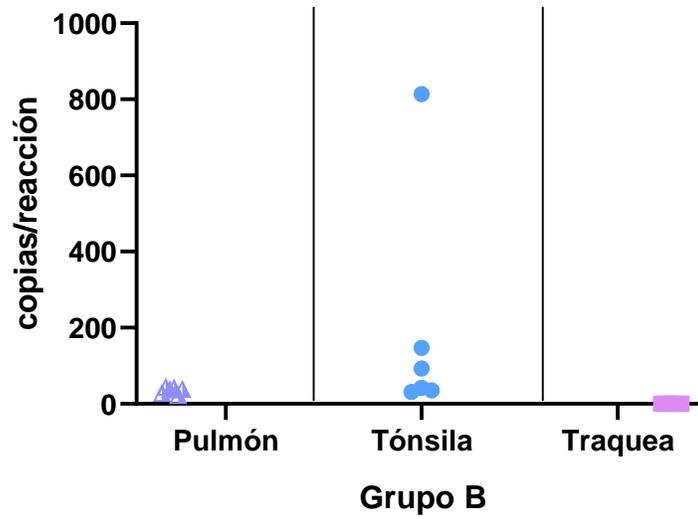
Como se observa en la gráfica 4 a partir de hisopado nasal el grupo B que fue desafiado sin recibir la vacuna experimental, se detectó carga viral 8 días pos-infección (DPI), obteniendo un mínimo de 28 y hasta un máximo de 165 copias/reacción siendo 137 veces más en alguno de los cerdos, mientras que el grupo vacunado y el control negativo no se detectó carga viral.

Por otra parte, en la gráfica 5 se puede apreciar la carga viral detectada en distintos tejidos de los cerdos que conforman el grupo B. Es evidente que la mayor carga viral se observa en las tonsilas 158 veces más que pulmón y tráquea donde no se presenta carga viral.

**Grafica 6. Representación gráfica de la excreción de virus detectados en hisopados nasales 8 días después de la infección.**



**Gráfica 7. Representación gráfica de la carga viral detectada en distintos órganos pertenecientes a los cerdos desafiados no vacunados.**



## 19. DISCUSIÓN

Actualmente en México existen vacunas comerciales disponibles contra influenza porcina A, elaboradas con virus inactivados y 4 de ellas únicamente están conformadas por las cepas H3N2 y H1N1, solo 1 cuenta con los 3 subtipos, sin embargo, ha quedado demostrado que el subtipo H1N2 encontrado en el país es antigénicamente diferente con el de Estados Unidos, subtipo que conforma la vacuna trivalente disponible (Mancera, et, al, 2021); Por lo tanto la relación antigénica de la HA y NA entre la cepa de la vacuna y la cepa prevalente es la clave para brindar una protección eficaz (Yang, *et al*, 2020) y es por esta razón que en el presente trabajo se evaluó una vacuna multivalente conformada por cepas actualmente circulantes en el país (Saavedra, *et al*, 2019), siendo los subtipos A/Swine/EdoMexico/2021 (H1N1), GtoDMZCC01/2014 (H1N2) y A/Swine/México/2020 (H3N2) buscando obtener la protección deseada que pretende cualquier vacuna.

Estudios previos demuestran que la administración de vacunas homologas inducen anticuerpos anti-HA contra los virus incluidos en la vacuna o que estén estrechamente relacionados ya que es imposible cubrir todas las variantes circulantes debido a la diversidad genética de los influenza virus (Parys, *et al*, 2022). La inducción de anticuerpos contra HA llamados anticuerpos neutralizantes inhiben la entrada y la replicación del virus en la célula, por lo que títulos altos de anticuerpos contra la HA (principal antígeno de superficie del virus de influenza) evita la infección; otras funciones importantes de los anticuerpos es contribuir a promover

la fagocitosis del virus (Sandbulte, *et al*, 2015). Dada la importancia de los anticuerpos en la respuesta inmune para determinar el título de anticuerpos específicos contra los subtipos que conforman la vacuna experimental se realizó la prueba de inhibición de hemaglutinación. En este estudio la respuesta humoral después de la inmunización y el desafío apoya la capacidad de la vacuna de brindar protección, esto es respaldado con los títulos de anticuerpos de los cerdos que recibieron la vacuna se detectaron desde el T1, que son 7 días después que se aplicó la primer dosis evidenciando que este aumento se debe al estímulo inducido por la vacuna; posteriormente disminuyeron ligeramente y volvieron a incrementarse como consecuencia a la segunda aplicación, que fue 21 días posteriores a la primera inmunización, indicando la capacidad de la vacuna de generar anticuerpos manteniéndose así hasta después del desafío, donde incrementaron levemente de un título de anticuerpos promedio de los tres subtipos de 1.73 ( $\log^{10}$ ) 1.80 ( $\log^{10}$ ) como respuesta a la infección, estas observaciones apoyan que la vacuna sí protegió. Considerando las observaciones hechas por Parys y colaboradores (2022) donde establecen que un título de anticuerpos igual o mayor a 40 UH (que expresado a log base es de 1.60 o más) contra un virus de influenza se consideran positivos.

Al hablar de anticuerpos inducidos por vacunas experimentales se encontró un modelo experimental similar al que desarrollamos en este trabajo, ellos evaluaron la protección que confiere el uso de vacunas inactivadas utilizando distintos grupos de cerdos donde cada uno de ellos recibieron una vacuna diferente o combinación de vacunas y posteriormente fueron desafiados, además uno de los grupos de

cerdos fueron únicamente desafiados utilizados como control negativo. En este estudio demostraron mediante pruebas de inhibición de la hemaglutinación que los títulos entre los distintos grupos se comportan de forma diferente sin embargo el grupo no vacunado-desafiado tuvo títulos de anticuerpos superiores a los vacunados después del desafío (Kitikoon, *et al*, 2009) lo mismo se observó en otro estudio donde los títulos virales eran altos entre los 3 y 5 días después del desafío (Abente, *et al*, 2018), lo que nos indica un comportamiento similar al de este proyecto donde los cerdos que no fueron vacunados pero si desafiados (grupo B) desde el tiempo 0 hasta el tiempo 3 se mantuvieron títulos de anticuerpos seronegativos de forma constante, incrementándose a partir del T4 (figura 5). Los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 se consideran seroprotectores pues sus títulos de anticuerpos promedio son de 1.85 ( $\log^{10}$ ), 1.90 ( $\log^{10}$ ) y 2.25 ( $\log^{10}$ ) respectivamente siendo este el de mayor título registrado.

Para inducir con éxito la enfermedad y por tanto que la infección sea efectiva la cantidad del virus utilizado debe ser suficiente y esto es consistente con el trabajo de Mora (2014) donde se determinó que una concentración viral aproximadamente de  $1 \times 10^7$  que corresponde de igual manera 128 UH es suficiente para generar la enfermedad. En otros estudios se mencionan dosis infectantes de  $1 \times 10^6$  y hasta  $1 \times 10^5$  (Abente, *et al*, 2018). La vía de inoculación de elección fue intranasal, la razón de esta fue con la finalidad de apegarse a las características naturales de la infección por el que se transmite el virus de influenza. La mayoría de los estudios lo hacen de esta manera sin embargo se mencionan otras vías de inoculación como por ejemplo la intratraqueal (Souza, *et al*, 2016; Bundi R, *et al*, 2020).

Cuando se usan modelos experimentales donde se hace el desafío su objetivo es simular la infección mediante la observación de signos clínicos para determinar el comportamiento del individuo en el transcurso de la infección, pero observarlos dependerá en gran medida del propósito del experimento en cuestión. De acuerdo con diversos estudios la infección experimental no siempre muestra evidencia signología aparente, generalmente se reserva a presentar una enfermedad subclínica o signos leves de la enfermedad tales como tos, secreción nasal, anorexia y letargo (Salvensen y Whitelaw, 2021). En este estudio después del desafío los cerdos vacunados-desafiados y los no vacunados-desafiados mostraron signos leves característicos de la enfermedad, donde el grupo inmunizado no mostró signos clínicos después de la infección; en cambio el grupo no vacunado mostró una mayor frecuencia y evidencia de signos como son tos, secreción nasal y estornudos manteniéndose leves. El estornudo fue el signo con mayor presencia durante los tres días post infección, seguido de la secreción nasal y en menor medida la tos, muy similar a lo descrito por Takemae, *et al*, (2018). En otro trabajo similar a este estudio donde también se realizó un el análisis de los signos clínicos de la infección con virus de influenza en cerdos vacunados y no vacunados, demostrando que no hubo diferencias entre los signos clínicos y la temperatura corporal (Bundi, *et al*, 2020). En este trabajo un dato importante es que la ausencia de signos clínicos de la enfermedad antes del desafío en los cerdos vacunados respalda que la vacuna no mostró efectos. Otro parámetro que nos indica que la infección de influenza fue eficiente en nuestro modelo es el registro de la temperatura corporal, donde los cerdos que no recibieron la vacuna y fueron desafiados (grupo B) tuvieron un incremento de 1-1.5°C de la temperatura del día 2

al día 4 y posteriormente se va reduciendo. Esto contrasta con los cerdos vacunados-desafiados (grupo A) donde también hay un incremento de la temperatura, pero con una diferencia de 0.5°C entre ambos grupos; en la literatura se menciona que cerdos infectados por influenza tienden a tener temperaturas que oscilan por arriba de los 40°C (Janke, 2013) sin embargo cabe aclarar que al ser grupos experimentales el comportamiento y manejo es distinto por lo que puede haber diferencias.

Otra forma de evaluar la eficacia protectora de una vacuna inactivada contra influenza porcina es mediante el estudio histopatológico, por ejemplo en un estudio se realizó la comparación de las lesiones microscópicas entre los tres subtipos se determinó que el H1N1 y H1N2 exhibieron pocos cambios patológicos en comparación con el H3N2 de forma aguda, pero que de igual manera el H1N1 se asocia con lesiones pulmonares tardía durante la infección, además que la disminución de la severidad de las lesiones disminuyen gradualmente a partir del día 4 esto de acuerdo con Lyoo y asociados (2014). En otro estudio se evaluó la capacidad de ampliar la respuesta inmune con el uso de tres vacunas demostrando que las lesiones microscópicas fueron leves en aquellos cerdos inmunizados, las lesiones consisten principalmente en infiltrado linfoplasmocítico peri bronquial muy similares a las del grupo control negativo (Parys, *et al*, 2022) De acuerdo a estas observaciones en nuestro modelo experimental coinciden las lesiones histopatológica descritas, donde solo en el grupo desafiado tiene como hallazgos microscópicos relevantes la neumonía bronco intersticial de leves-moderadas indicando por tanto la infección por el virus de influenza, siendo en pulmón donde

las lesiones son mayormente descritas en comparación con la tráquea y tonsila. Los perfiles microscópicos en pulmón se caracterizaron por una inflamación con presencia de infiltrado linfoplasmocítico y el colapso alveolar leve, mientras que la tráquea y tonsila las lesiones observadas se sugieren por causa de la muerte, así como en el grupo inmunizado, donde las lesiones observadas no son para determinar que son por infección. Aunque la infección y la replicación fue eficiente, la patogénesis y el grado de lesión en los distintos tejidos depende de muchos factores como la infectividad, la virulencia, la eficacia de replicación, incluso se comenta que el equilibrio de unión entre la HA y las actividades de NA de acuerdo con Rajao (2017) incluso puede depender de la vía de inoculación (Takemae, *et al*, 2018).

Otra manera de evaluar la eficiencia de la vacuna se hizo determinando la excreción viral después del desafío. Solo en el grupo no inmunizado se detectó excreción viral en el día ocho pos-desafío; sin embargo, de acuerdo con otros estudios experimentales la duración de la excreción nasal del virus puede oscilar de 4 a 7 días después de la infección (Trebien, 2013), esto contrasta con la protección obtenida en los cerdos inmunizados donde no se detecta la excreción viral.

En otros estudios se evaluaron la eficacia de una vacuna determinando la carga viral en tejidos de la misma manera que se hizo en nuestro trabajo, Chong y asociados (2022) obtuvieron cargas virales en pulmón con un valor promedio de Ct de 23.62 en infecciones con los subtipos H1N1 y H3N2 donde se obtuvieron 8306 y 11281 copias por reacción respectivamente. En nuestro estudio experimental la carga viral se detectó únicamente en grupo no vacunado en pulmón y tonsila, sitios

diana para la replicación del virus de influenza, con 147 copias/reacción en tonsila y 44 copias por reacción en pulmón. En otro estudio, para evaluar la protección de una vacuna, teniendo un modelo experimental similar al de este trabajo con la diferencia que se sacrificaron cerdos a los 3 días después del desafío, determinaron el título viral donde se demostró que a diferencia del grupo desafiado no vacunando los grupos inmunizados obtuvieron títulos en frotis nasal, tráquea y pulmón reducidos no significativos (Parys, *et al*, 2022).

## **20. CONCLUSIÓN**

Los resultados de este estudio confirman la protección de la vacuna multivalente contra influenza porcina ya que induce anticuerpos específicos contra los tres subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 empleadas en la vacuna. Se presento poca/nula signología clínica. Se redujo las lesiones microscópicas descritas en la infección de influenza A en pulmón y tonsila. No se detectó excreción viral ni carga viral en los tejidos muestreados para el grupo de cerdos desafiados- vacunados, por lo tanto, se demuestra la efectividad de la vacuna contra los tres subtipos de la influenza porcina.

## **21. RECOMENDACIÓN**

Se recomienda complementar los resultados haciendo un análisis estadístico con mayor profundidad usando variables y su relación entre sí.

## 22. REFERENCIAS

Abente E, Rajao D, Santos J, Kaplan B, Nicholson T, Brockmeier S, *et al.*, Comparison of Adjuvanted-Whole Inactivated Virus and Live-Attenuated Virus Vaccines against Challenge with Contemporary, Antigenically Distinct H3N2 Influenza A Viruses. *J Virol.* [Internet] 2018 [citado 04 julio 2023]; 92(22):23-18 doi: 10.1128/JVI.01323-18

Augustyniak A, Pomorska-Moil M. Vaccination failures in pigs-the impact of chosen factor son the immunisation efficacy. *Basel* [Internet] 2023 [citado 25 de mayo 2023];11(2):230 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9964700/>

Aungtragoolsuk N, Sagarasaeranee P, Mahantachaisakul C, Pamaranon N, Parchariyanon S, Teankum K, *et al.* Diagnosis of swine influenza. *Royal Gaz.* [Internet] 2013 [Citado 28 junio 2023]; 130 (173) Disponible en: [https://www.acfs.go.th/standard/download/eng/DIAGNOSIS\\_OF\\_SWINE\\_INFLUENZA.pdf](https://www.acfs.go.th/standard/download/eng/DIAGNOSIS_OF_SWINE_INFLUENZA.pdf)

Ayora-Talavera G. Influenza: Historia de una enfermedad. *Rev. Biomed* [Internet] 1999 [Citado 23 mayo 2023]; 10: 57-61. Disponible en: <file:///C:/Users/Paola%20Barranco/Downloads/187-274-1-PB.pdf>

Bundi R, Lai K, Kiremu G y Lynne Heather. Experimental PCEP-Adyuvanted Swine Influenza H1N1 Vaccine Induced Strong immune Responses but did not protect

piglets against heterologous H3N2 virus challenge. Basel. [Internet] 2020 [citado 29 junio 2023]; 8(2): 235 doi: 10.3390/vaccines8020235

Cador C, Hervé S, Andraud M, Gorin S, Paboceuf F, Barbier N, *et al*, Los anticuerpos de la madre no previenen del virus de la influenza porcina A entre cerdos. Res veterinaria [Internet] 2016 [citado 25 mayo 2023]; 47:86 doi: 10.1186/s13567-016-0365-6

Carlyle T, Duncan R, William N. Veterinary Pathology.6<sup>a</sup> ed. Pensilvania (USA): William & Wilkins; 1997.

Carreara V. Estudio serológico retrospectivo (2000-2009) de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 en el distrito federal [Tesis de licenciatura] Distrito Federal (Mex); Universidad Nacional Autónoma de México: 2010

Carrera AV, Mercado MC, Trujillo M, Mendoza SE, Haspra P, Arias CF, *et al*. Cambios genéticos en los genes internos del virus de influenza porcina aislado en México. Scielo [Internet] 2014 [Citado 23 mayo 2023]; 1(1). Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2448-67602014000100001&script=sci\\_arttext&tlng=es](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2448-67602014000100001&script=sci_arttext&tlng=es)

Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, Mitchell TG, McKerrow JH, Sakanari JA. (Eds.), (2016). Microbiología médica, 27e. McGraw Hill.

<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1837&sectionid=128961002>

Carvajal MA. Influenza porcina: Diagnóstico, evaluación y patógenos secundarios. [Internet] 2013 [citado 25 mayo 2023] Disponible en: <https://www.porcicultura.com/destacado/Influenza-porcina:-Diagn%C3%B3stico,-evaluaci%C3%B3n-y-pat%C3%B3genos-secundarios>

Casanovas, C, Oliver S, Cárceles S, Garza L, Espigares D. Patogenia del virus de la gripe porcina y su relación con la aparición de complicaciones bacterianas secundarias. Porciplanet. [Internet] 2020 [citado 25 mayo 2023]; 165 Disponible en: <https://porciplanet.com/patogenia-del-virus-de-la-gripe-porcina-y-su-relacion-con-la-aparicion-de-complicaciones-bacterianas-secundarias/#:~:text=La%20patogenia%20del%20AIV&text=La%20obstrucci%C3%B3n%20causada%20por%20las,neumon%C3%ADa%20broncointersticial>

CDC. Influenza (gripe) [internet] 2022 [citado 01 julio 2023] Disponible en: <https://espanol.cdc.gov/flu/about/professionals/antigenic.htm#:~:text=La%20prueba%20de%20IH%20implica,aparici%C3%B3n%20de%20un%20punto%20rojo>.

Chong L, Culhane M, Cheeran M, Pantoja L, Jansen M, Amodie D, *et al*, Exploración de enfoques heterólogos de vacunación de refuerzo para mejorar el control de la influenza en cerdos. Res. Veterinaria [Internet] 2020 [citado 25 mayo 2023]; 51:89 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7344353/>

Chong L, Culhane M, Schroeder D, Cheeran M, Pantoja L, Jansen M, *et al*, Vaccination decreases the risk of influenza A virus reassortment but not genetic variation in pigs. E. Life. [Internet] 2022 [citado 04 julio 2023]; 11 doi: 10.7554/eLife.78618

Cordero RA, Roberts KL. Influenza (MS 654). Reference mod. Bio. Sciences [Internet] 2014 [citado 12 junio 2023]: 95-104 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02606-4>

Dhakal S, Renukaradhya G. Nanoparticle-based vaccine development and evaluation against viral infections in pigs. Vet Res [Internet] 2019 [Citado 24 mayo 2023]; 50:90 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6833244/>

Dyer RM. Vacunación de cerdos. Universidad de Delaware [Internet] 2020 [citado 03 julio 2023] Disponible en: <https://www.udel.edu/content/dam/udelImages/canr/pdfs/extension/4H/animal-science/VaccinationprogramsSwine.pdf>

Gaitán C. Análisis serológico retrospectivo del virus de influenza porcina subtipo H1N2 en los últimos seis años (2010-2015) en la república mexicana. [tesis de licenciatura]. Ciudad de México (Mex): Universidad nacional Autónoma de México;2016

González L, Orraca O, Guillermo J. La influenza A (H1N1): estado actual del conocimiento. Rev. Ciencias Médicas [Internet] 2010; 14(1) [Citado 23 mayo 2023] Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-31942010000100030](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942010000100030)

Helke K, Ezell P, Swindle M. Biología y enfermedades de los cerdos. Medicina de animales de laboratorio [Internet] 2015 [citado 25 mayo 2023]: 695-769 doi: 10.1016/B978-0-12-409527-4.00016-X

IPK. Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral. OMS [Internet] 2003 [citado 04 julio 2023] Disponible en: file:///C:/Users/Paola%20Barranco/Downloads/labs\_IPK-completo.pdf

Janke BH. Características clínico-patológicas de la influenza porcina. Microbiol Inmunol [Internet] 2013 [citado 05 julio 2023] ;370:69-83. Disponible en: doi: 10.1007/82\_2013\_308

Jubb, Kennedy, Palmer. Pathology of Domestic Animals. 6ª ed. Ontario (Canadá): M. Grant Maxie, DVM, PhD, Diplomate ACVP;2015

Khatri M, Dwivedi V, Krakowka S, Manickam C, Ali A, Wang L, Qin Z, *et al.* El virus de la influenza porcina H1N1 induce respuestas inmunitarias inflamatorias agudas de los cerdos: un posible modelo animal para el virus de la influenza humana H1N1. J Virol [Internet] 2010 [citado 29 mayo 2023]; 84(21): 11210-11218. doi: 10.1128/JVI.01211-10

Kitikoon, Vincent A, Jones K, Nilubol D, Hanke B, *et al.* Eficacia de la vacuna y respuesta inmune al virus de la influenza porcina en cerdos infectados con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino en el momento de la vacunación

con VIS. Microbiol. [internet] 2009 [citado 27 junio 2023] ; 139 (3-4): 235-44.  
Disponibile en: 10.1016/j.vetmic.2009.06.003

Landeras S. Interacciones del virus de la gripe con la célula hospedadora: identificación de dianas celulares con potencial para la inhibición del virus [tesis de doctorado]. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2014.

López-Valiñas A, Baioni L, Córdoba L, Ayub D, Chiapponi C, Segalés J, *et al.* Evolución de la influenza porcina H3N2 en cerdos vacunados y no vacunados después de una infección natural previa por H1N1 [Internet] 2022 [citado 25 mayo 2023]; 14(9):2008 doi: 10.3390/v14092008

Lyou K, Kim J, Jung K, Kang B, Song D. Comparative pathology of pigs infected with Korean H1N1, H1N2, or H3N2 swine influenza A viruses. Virol J. [Internet] 2014 [citado 23 junio 2023]; 11: 170. doi: 10.1186/1743-422X-11-170

Mancera CJ, Pearce D, Masicy A, BalaSch M. Virus de la influenza A en Porcinos: epidemiología, desafíos y estrategias de vacunación. Front. Vet. Sci. [Internet] 2020 [citado 02 junio 2023]; 7 <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00647>

Martelli P, Segalés J, Torremorell M, Canelli E, Maes D, Nathues H, *et al.* Complejo respiratorio porcino. 1ed. Grupo Asis Biomedica SL. España;2019

Martín A, Chinchilla B, Real G. La gripe porcina clásica con carácter zoonótico y emergente. Dialnet [Internet] 2009 [citado 02 junio 2023]; 22: 135-184 Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3327298>

Martínez MJ. Detección de receptores sialil alfa 2,3 y sialil alfa 2,6 en células MDCK y 549 y su relación con la capacidad infectiva de virus de influenza porcina mexicanos. [tesis de maestría]. Ciudad de México (Mex): Universidad nacional Autónoma de México;2017

Monjarrez ME, Arenas G. Virus Influenza Enigma del pasado y del presente. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. [Internet] 1999 [Citado 23 mayo 2023]; 12(4): 290-299 Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-1999/in994h.pdf>

Mora JC. Evaluación de una nueva vacuna inactivada contra influenza porcina incluyendo los serotipos de virus H1N1 y H3N2 de influenza prevalentes en México. [Tesis de maestría]. Ciudad de México (Mex): Universidad nacional Autónoma de México;2014

Nelson M, Vincent A. Zoonosis inversa de influenza porcina: nuevas perspectivas sobre la interfaz humano-animal. Tendencias Microbiol [Internet] 2016 Citado 23 mayo 2023]; 23(3):142-153 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4348213/>

OMSA, 2021. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2021. Organización Mundial de Sanidad Animal. Disponible en: <https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-ymanuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/>

Oropesa S. Virus Influenza. PHAO [Internet] 2012 [citado 23 mayo 2023] Disponible en: [file:///C:/Users/Paola%20Barranco/Downloads/labs\\_ipk\\_5%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Paola%20Barranco/Downloads/labs_ipk_5%20(1).pdf)

Parys A, Vandoorn E, Chiers K y Reeth K. Alternating 3 different influenza vaccines for swine in Europe for a broader antibody response and protection. *Vet Res.* [Internet] 2022 [citado 29 junio 2023];44 doi.org/10.1186/s13567-022-01060-x

PN. Influenza porcina: origen, variabilidad y expectativas de la protección vacuna. *Porcine News* [Internet] 2016 [Citado 23 mayo 2023] Disponible en: <https://porcinews.com/influenza-porcina-origen-variabilidad-y-expectativas-de-la-proteccion-vacuna/>

Rajao D, Walia R, Campbell B, Cauger P, Janas-Martindale A, Killian M, *et al.* El reordenamiento entre H3n2 porcino y H1N1 pandémico de 2009 en los estados unidos resulto en virus de influenza A con diversas constelaciones genéticas con virulencia variable en cerdos. *J Virol* [Internet] 2017 [citado 23 junio 2023]; 91(4): 1763-16 doi: 10.1128/JVI.01763-16

Richt JA, Webby R, Detmer S, Grammer M, Goyal S, Torremorell M., *et al.* Diagnostico y vigilancia de la gripe porcina. *Influenza porcina* [Internet] 2012 [citado 02 junio 2023]; 370:85-112 doi: 10.1007/82\_2012\_220

Saavedra-Montañez M, Carrera-Aguirre V, Castillo-Juárez H. Rivera-Benítez F, Rosas K, Pulido-Camarillo E, *et al.* Retrospective serological survey of influenza viruses in backyard pig from México City. *Epub* [Internet] 2012 [citado 17 junio 2023]; 7(5):827-32. doi: 10.1111/irv.12063.

Saavedra-Montañez M. Identificación de diferencia genéticas y su correlación con variaciones antigénicas de los subtipos del virus de influenza porcina que circulan

en territorio nacional [tesis de doctorado] Ciudad de México (Mex): Universidad Nacional Autónoma de México; 2019

Salvensen H y Whitelaw B. Estrategias de control actuales y prospectivas del virus de influenza A en cerdos. *Por. He. Managment.* [Internet] 2021 [citado 23 junio 2023] 7:23 Disponible en: <https://porcinehealthmanagement.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40813-021-00196-0>

Sandbulte MR, Spickler A, Zaabel P, Roth J., Uso óptimo de vacunas para el control del virus de la influenza A en cerdos. *Vacuna (Basilea).* [Internet]. 2015 [Citado 24 mayo 2023]; 3(1): 22-73 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4494241/>

Shaghayegh K, Rezaei N. *Encyclopedia of infection and Immunity.* ELSEVIER [Internet] 2022 [citado 12 junio 2023]; 2:67-78 Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128187319001762>

Souza C, Rajao D, Loving C, Gauger P, Pérez D y Vincent A. Age at Vaccination and Timing of Infection Do Not Alter Vaccine-Associated Enhanced Respiratory Disease in Influenza A Virus-Infected Pigs. *Clin Vaccine Immunol.* [Internet] 2016 [citado 04 junio 2023]; 23(6):470-482 doi: 10.1128/CVI.00563-15

Straw B. *Enfermedades del cerdo.* 8ª ed. D´Allaire S, Mengeling W, Taylor D. Buenos Aires (Republica Argentina): Inter-Médica S.A.I.C.I; 2001

Takemae N, Tsunekuni R, Uchida Y, Toshihiro I, Saito T. Infección experimental de cerdos con virus de influenza A H1 y H3 de cerdos mediante nebulización intranasal. BMC Vet. Res. [Internet] 2018 [citado 23 junio 2023]; 14: 115. doi: 10.1186/s12917-018-1434-z

Talker AC, Stadler M, Koining H, Mair KH, Rodríguez-Gómez I, Graage R, *et al.* La infección por el virus de la influenza A en cerdos atrae células T multifuncionales y de reacción cruzada al pulmón. J Virol [Internet] 2016 [citado 29 de mayo 2023]; 90(20): 9364-9382. doi: 10.1128/JVI.01211-16

Talledo M, Zumaeta K. Los virus Influenza y a nueva pandemia A/H1N1. Rev. Peru biol. [Internet] 2009 [citado 24 mayo 2023]; 16(2). Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-99332009000200018#:~:text=El%20ciclo%20de%20replicaci%C3%B3n%20del,glicoprote%C3%ADnas%20de%20superficie%2C%20las%20HA](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332009000200018#:~:text=El%20ciclo%20de%20replicaci%C3%B3n%20del,glicoprote%C3%ADnas%20de%20superficie%2C%20las%20HA)

Thomson D, Benjamin M, Brown D. Vaccination Strategies for pigs raised on small farms. MSU Extension [Internet]: Michigan state university; 2022 [citado 15 junio 2023] Disponible en: <https://www.canr.msu.edu/resources/vaccination-strategies-for-pigs-raised-on-small-farms>

Tizard I. Porcine Vaccines. Vaccines for Veterinarians [Internet] 2021 [Citado 24 mayo 2023]: 225-242 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7348622/>

Trebbien R, Bragstad K, Larsen L, Nielsen, Botner A, Heegaard P, *et al.* Caracterización genética y biológica de un virus de influenza porcina H1n1 y H3N2 de tipo aviar generado por la recombinación de los subtipos H1N1 y H3N2 de tipo aviar circulante en Dinamarca. *Virol J* [Internet] 2013 [citado 22 junio 2023]; 10:290 doi: 10.1186/1743-422X-10-290

Trebbien R, Larsen L, Viuff BM. Distribución de receptores de ácido siálico y virus de influenza de origen aviar y porcino en cerdos infectados experimentalmente. *Virol J* [Internet] 2011 [citado 29 de mayo 2023];8: 434 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3177912/>

Van Reeth K y Vincent LA. *Diseases of swine*. Willey Blackwell, 11<sup>a</sup> ed. EUA (Illinois); 2019

Vincent A, Perez D, Rajao D, Anderson T, Abente E, Walia R, *et al.* Vacunas contra el virus de la influenza A para cerdos. *MicrobiolVeterinario* [Internet] 2016 [Citado 23 mayo 2023]; 206: 35-44 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8609643/>

Webster RG, Govorkova EA. Continuing challenges in influenza. *ANN N Y Acad Sci*. [Internet] 2014 [citado 02 junio 2023]; 1323(1):115-39 doi: 10.1111/nyas.12462.

Wenjun M. Virus de la influenza porcina: estado actual y desafío. *Virus Res* [Internet]2020 [Citado 23 mayo 2023]; 288:1981 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7587018/>

Yang B, Yao Y, Wang S, Gong XQ, Liu X, Wang Q, *et al.* Protective efficacy of a bivalent inactivated reassortant H1N1 influenza virus vaccine against European avian-like and classical swine influenza H1N1 viruses in mice. *Vet Micro.* [Internet] 2020 [citado 04 julio 2023];246 Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108724>

Zachary JF. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. López A, 6ª ed. .Martinson SA. EUA (Illinois); 2017