

Efecto de la vacunación con virus homólogos inactivados en la inducción de anticuerpos neutralizantes contra el virus de influenza A en cerdas de reemplazo

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

POR:

**Médico Veterinario Zootecnista
Jannet Concepción Franco Farfán**

**Asesor:
Dra. Guadalupe Ayora Talavera**

Mérida, Yuc., México, Noviembre 2016

Declaratoria de originalidad

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo de ciencia y tecnología (CONACYT), a la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) y al Centro de Investigaciones Regionales (CIR) “Dr. Hideyo Noguchi” por su apoyo y patrocinio para la realización de este trabajo de investigación.

Agradezco a mi asesora de tesis la Dra. Guadalupe Ayora Talavera por la confianza y la paciencia otorgada durante mi estancia en el laboratorio de virología para la realización del trabajo de investigación, así como a los compañeros del laboratorio por sus atenciones y cordialidad durante mi estancia.

Agradezco al Dr. Alejandro Alzina López por su apoyo y sus enseñanzas durante mi formación académica y durante la realización de este trabajo de investigación.

Agradezco a mis padres y familia por todo el apoyo y paciencia durante mi formación académica.

Agradezco sobre todo a mi esposo y mi hija por el apoyo incondicional, por permitirme trabajar y ausentarme para poder alcanzar un logro más en mi carrera como profesional, sabiendo que los amo y son lo más importante para mi.

Resumen

Los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2 del virus de influenza A porcina afectan a las poblaciones de cerdos en todo el mundo y representan un factor de riesgo en la economía de las granjas porcícolas y en la salud humana. Los sistemas preventivos como la vacunación disminuyen el riesgo de brotes de enfermedad en animales de producción. La finalidad de las vacunas es la generación de anticuerpos que neutralicen al virus, evitando que infecte a las células y se disemine en el organismo. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes en cerdas de reemplazo inmunizadas con vacunas de virus de influenza A inactivados. Se realizaron ensayos de inhibición de la hemaglutinación para observar seroconversión a partir de la aplicación de las vacunas, así como la actividad neutralizante de los anticuerpos por medio de ensayos de microneutralización, contra cepas del virus de influenza A porcino. Los resultados indican seropositividad a los 50 días post-vacunación contra la cepa H1N1 del virus de influenza A y presencia de anticuerpos neutralizantes a partir de una segunda aplicación de dosis vacunal. Concluimos que el uso de vacunas con cepas de virus inactivados, activan la respuesta inmune mediada por anticuerpos en la protección contra el virus de influenza A porcina.

Palabras clave: influenza porcina; seroconversión; seropositividad; anticuerpo neutralizante; microneutralización.

Abstract

Swine influenza A H1N1, H1N2 and H3N2 viruses are an important cause of disease in pigs worldwide and represent a risk factor in the economy of pig farms and to the human health. Vaccination as a prophylactic measure decreases the risk of influenza virus outbreaks through the induction of neutralizing antibodies, avoiding cell infection and virus spread in the organism. The objective of the vaccines is the production of antibodies to neutralize the virus, avoiding cell infection and the spread in the organism. The objective of this work was to determine the presence of neutralizing antibodies in replacement gilts vaccinated with inactivated influenza virus. Seroconversion after vaccination was assessed by hemagglutination inhibition assays and the presence of neutralizing antibodies was detected by a microneutralization assay. The results indicated seropositivity against the swine influenza virus H1N1 at 50 days post-vaccination and presence of neutralizing antibodies only after the second application of the vaccine dose. We conclude that the use of vaccines of homologous strains of inactivated virus, induce an immune response mediated by antibodies in the protection against swine influenza A virus.

Keywords: swine influenza virus; neutralizing antibodies; homologous strains; microneutralization.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I

1. Introducción general.....	1
------------------------------	---

CAPÍTULO II

2. Revisión de Literatura	3
2.1 Características estructurales del virus de influenza.....	3
2.2. Dispersión del virus de influenza entre aves, cerdos y humanos.....	6
2.3. Evolución y deriva antigénica del virus de influenza A.....	7
2.4. Situación actual del virus de influenza porcina en México y el mundo.....	10
2.5. Evolución y epidemiología del virus de influenza porcina	10
2.6. Situación actual del virus de influenza porcina en México y el mundo	11
2.7. Respuesta inmune del hospedero frente al virus de influenza.....	11
2.8. Pruebas diagnósticas contra el virus de influenza porcina y anticuerpos dirigidos al virus	14
2.9. Vacunas contra el virus de influenza.....	15
3. Hipótesis y objetivos.....	18
3.1. Hipótesis y objetivos.....	18

3.2 Hipótesis.....	18
3.2.3 Objetivo general.....	18
REFERENCIAS	19
CAPÍTULO III	
ARTÍCULO	29
REFERENCIAS DEL ARTÍCULO	65
CONCLUSIONES GENERALES DE LA TESIS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del virus de influenza A.....	4
Figura 2. Reasociación de segmentos genómicos del virus de influenza en cerdos.....	9
Figura 3. Regulación de la respuesta inmune, mediada por la actividad de las células presentadoras de antígeno.....	13

ABREVIATURAS

- DNA = Ácido desoxiribonucleico (por sus siglas en inglés)
- IHA = inhibición de la hemaglutinación
- HA= Hemaglutinina, proteína estructural presente en la superficie del virus de influenza A.
- MDCK = Madin- Darby canine kidney cells, por sus siglas en inglés; células de riñón de perro utilizadas en cultivo celular para aislamiento viral.
- NA = Neuraminidasa proteína estructural presente en la superficie del virus de influenza A.
- NP = Nucleoproteína, mantiene la estructura del ARN viral.
- OPD = o-fenilendiamina dihidrocloruro.
- PA = Proteína ácida, polimerasa que forma parte del complejo de ribonucleoproteínas encargadas de la replicación del ARN viral.
- pb = pares de bases
- PB1 = Proteína básica 1, polimerasa que forma parte del complejo de ribonucleoproteínas encargadas de la replicación del ARN viral.
- PB2 = Proteína básica 2, polimerasa que forma parte del complejo de ribonucleoproteínas encargadas de la replicación del ARN viral.
- PBS = solución salina fosfatada, constituida por 40 ml de buffer fosfato 25x, 8.5 g de cloruro de sodio diluido en 1L de agua destilada.
- RNA =Ácido ribonucleico (por sus siglas en ingles).
- rpm= revoluciones por minuto
- TCID₅₀ = Dosis infecciosa del 50 % del cultivo celular. Que corresponde a la dilución del virus que infecta el 50% de células en cultivo celular.
- TPCK = Clorimetil cetona L-1-tosilamida-2-feniletilo; aumenta la infectividad viral a través de la actividad proteasa de la tripsina.
- UHA = unidades de hemaglutinina
- µl = microlitros. (1x 10⁻⁰⁶ litros).

CAPÍTULO I

1. Introducción General

La porcicultura juega un papel importante en la economía de México. En 2013 la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) indicó que la carne de cerdo fresca y procesada que se comercializa en el extranjero proviene de establecimientos Tipo Inspección Federal (TIF) ubicados en 10 estados de la República Mexicana; entre ellos Yucatán, que ocupa el 5° lugar a nivel nacional en producción porcina.

Uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la producción porcina son las enfermedades respiratorias causadas por virus, entre los más frecuentes están el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), el virus de la fiebre porcina clásica y el virus de influenza porcina (Mussa, *et al.*, 2011; Crisci, *et al.*, 2013).

Los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 son los responsables de la influenza porcina en México y el mundo (Mussa, *et al.*, 2011; Crisci, *et al.*, 2013).

Animales de producción como los cerdos, que representan un sustento en la alimentación de los seres humanos, son uno de los hospederos naturales del virus de influenza A y pueden albergar virus de tipo aviar y de mamíferos. La presencia de dos tipos diferentes de virus en un mismo hospedero incrementa el riesgo en la aparición de cepas mutantes con carácter pandémico y zoonótico (Mussa, *et al.*, 2011; Crisci, *et al.*, 2013).

Los mayores problemas para controlar la influenza porcina radican parcialmente en la circulación simultánea de cepas genéticamente diferentes entre las granjas. Debido a la amplia distribución de cerdos en el estado, el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas entre los animales por contacto directo, fómites o esporas incrementan las tasas de prevalencia e incidencia dentro de las unidades de producción. Por tal motivo los productores optaron por manejar animales de reemplazo de sus propias granjas (Mussa, *et al.*, 2011; Crisci, *et al.*, 2013).

Los programas de control y prevención de enfermedad infecciosas en animales de producción están dirigidos a minimizar la entrada de virus a través de la implementación de medidas sanitarias, como el uso de animales de reemplazo y la aplicación de vacunas (Alberini, *et al.*, 2009; Collin, *et al.*, 2009; Girard *et al.*, 2010; Koyama, *et al.*, 2010).

El genoma del virus de influenza A es de estructura segmentada, lo que le permite el intercambio de genes entre diferentes subtipos. Este virus presenta variantes antigénicas que ocurren como resultado de las mutaciones acumuladas por el cambio y la deriva antigénica (Alberini, *et al.*, 2009; Collin, *et al.*, 2009; Girard *et al.*, 2010; Koyama, *et al.*, 2010).

Las vacunas comerciales contra el virus de influenza, que se aplican en los sistemas de producción porcina, no protegen contra cepas mutantes con diferentes determinantes antigénicos (McClean, *et al.*, 2014). Una manera de contrarrestar esta situación es a través del manejo de esquemas regionales de vacunación. Es decir, las vacunas se basan en inóculos de aislados virales que se encuentren en circulación dentro de las granjas porcíneas de la región. Esto asegura que las variantes de virus de influenza porcina que circulan en las granjas estén contenidas en la vacuna que se aplica.

Se ha reportado que las vacunas con virus homólogos favorecen la eficacia en la inducción de respuesta inmune cruzada, asegurando la protección contra variantes homologas del virus. La homología de los virus se refiere a las similitudes en las proteínas antigénicas presentes entre los virus de influenza porcina (Albarino, *et al.*, 2009; Collin, *et al.*, 2009; Girard *et al.*, 2010; Koyama, *et al.*, 2010).

En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de la vacunación con inóculos de virus homólogos inactivados en la inducción de anticuerpos neutralizantes contra el virus de influenza A en cerdas de reemplazo.

CAPÍTULO II

2. Revisión de Literatura

2.1 Características estructurales del virus de influenza.

El virus de influenza A es de genoma RNA en sentido negativo. Está compuesto por 8 segmentos que codifican para 14 proteínas virales. La envoltura del virus está integrada por 3 proteínas de membrana: la HA, la NA y la proteína de matriz M compuesta por 2 subunidades (M1 y M2). Las proteínas no estructurales NEP, NS1 y el complejo de las ribonucleoproteínas, conforman el genoma del virión. El complejo de las ribonucleoproteínas está formado por dos polimerasas básicas: la proteína PB1 y PB2; y una polimerasa ácida o PA, las cuales participa en la replicación. El complejo de las polimerasas está envuelto por la nucleoproteína NP, que en conjunto resguardan el ARN viral (Figura 1) (Arranz, *et al.*, 2012; Bouvier, *et al.*, 2008; Wu, *et al.*, 2014).

Los virus de influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Estos virus se clasifican en 3 subtipos: el A, el B y el C, que se diferencian en los sitios antigénicos presentes en la nucleocápside (NP) y la proteína de matriz (M). Estos subtipos se han presentado en diferentes poblaciones de aves y mamíferos, incluido el hombre (Bouvier, *et al.*, 2008; Han, *et al.*, 2011).

Los subtipos de influenza A y B son los responsables de las epidemias de influenza estacional. La influenza A se asocia con la presentación de casos severos en humanos. Se subdivide en subtipos basado en los principales antígenos de superficie: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Hasta la fecha se han reportando 18 subtipos diferentes de HA y 11 subtipos diferentes de NA (Bouvier, *et al.*, 2008; Han, *et al.*, 2011; Wu, *et al.*, 2014).

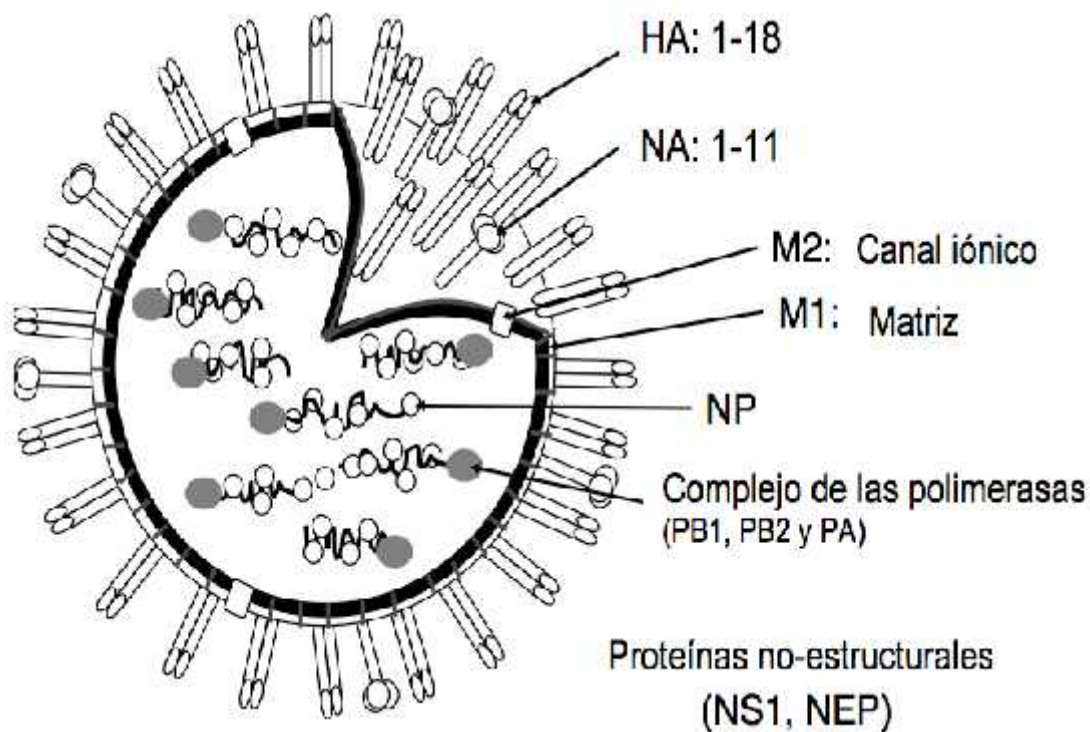


Figura 1. Estructura del virus de influenza A. La membrana está integrada por tres proteínas HA, NA y la proteína del canal iónico M2, esta última está incrustada en la envoltura lipídica del virión. La proteína de matriz (M1) conforma la base de la envoltura lipídica. Asociado con el RNA viral está el complejo de las polimerasas, constituido por las proteínas PA, PB1 y PB2. La nucleoproteína viral se encarga de encapsular los segmentos que componen el RNA viral (Landolt G., *et al.*, 2007).

La replicación viral inicia con el reconocimiento de la HA a un receptor de membrana que contiene residuos terminales del ácido neuramínico. Mediante endocitosis, los viriones entran a la célula formando un endosoma, donde la disminución del pH favorece el desnudamiento del genoma viral. La envoltura viral se fusiona con la membrana del endosoma mediante el estrangulamiento de la proteína HA, lo que permite la liberación del genoma viral al citosol de la célula. Dentro de la célula las ribonucleoproteínas del virus son transportadas al núcleo donde comenzará la síntesis del ARN viral de sentido positivo, que servirá como RNA mensajero para síntesis de proteínas virales, y del RNA en sentido negativo, que con ayuda de la RNA polimerasa, participará en la construcción de

ribonucleoproteínas virales (Nayak, et al., 2004; Neuman et al., 2009; Kawaoka et al., 2012).

El RNA viral cuenta con nucleótidos conservados en ambos extremos de la cadena. Los nucleótidos funcionan como promotores para la transcripción del RNA en sentido 5', generados por el RNA mensajero. Los virus de influenza con RNA en sentido negativo son transcritos a RNA mensajero poliadenilado cubierto por el complejo de las polimerasas (Neuman, et al., 2009; Kawaoka et al., 2012).

La HA es sintetizada como un precursor o HA0, la cual es ensamblada en el retículo endoplasmático, es transportada a la membrana plasmática, pasando previamente por el aparato de Golgi para ser glicosilada. Esta HA0 está conformada por la unión de 2 subunidades la HA1 y la HA2. Estructuralmente la HA1 es más vulnerable a presentar mutaciones puntuales y la subunidad HA2 es la más conservada entre los virus de influenza A. La separación de las subunidades de HA, contribuyen con la infectividad y patogenicidad viral. Esta separación se presenta por la acidificación del pH, inducido por las proteasas de la célula hospedero durante la fusión de la membrana endosomal. Esta característica de la separación en subunidades de la HA puede variar entre los diferentes virus de influenza (Han T., et al., 2011).

La proteína de membrana NA tiene actividad sialidasa, se encarga de cortar la unión del ácido siálico con la hemaglutinina para la liberación de los viriones nuevos de la célula infectada y permitir su dispersión hacia otras células sanas, también participa en el corte de la mucina presente en las células del tracto respiratorio y la diseminación de los viriones a las células adyacentes (Landolt, et al., 2007; Bouvier, et al., 2008).

Parte de la glicoproteína M que cubre al virión, permite la formación de un canal iónico que acidifica el pH en el interior de la célula, debido a la entrada de iones de hidrógeno durante la infección viral. El ensamblado de las proteínas de superficie en el aparato de Golgi, permite la modulación del pH por parte de los canales iónicos de la proteína M2 favoreciendo los cambios conformacionales en los precursores de la proteína de superficie HA (Landolt, et al., 2007).

Los virus de influenza codifican dos proteínas no estructurales NS1 y NS2, también conocida como NEP (proteína nuclear de extensión, por sus siglas en inglés). La NS1

participa como antagonista del interferón gamma (IF- γ), de tal manera que evita un estado antiviral. Esta es la más abundante de las proteínas en las células infectadas durante la replicación viral. La NS2 representa una cuarta parte de las proteínas del virus de influenza (Landolt, et al., 2007).

2.2. Dispersión del virus de influenza entre aves, cerdos y humanos

Las aves son el principal medio de dispersión del virus de influenza entre las demás especies (Landolt, et al., 2007). Entre las especies de aves, los subtipos H5, H7 y H9 provocan infección aguda y sub-aguda que afecta el aparato respiratorio, digestivo, cardiovascular y reproductivo, por lo que la transmisión de virus entre las aves es eficiente debido a que pueden eliminar en las heces fecales partículas virales infectivas. Los subtipos de influenza H5, H7 y H9 son los que se presentan con mayor frecuencia entre las poblaciones de aves (Landolt, et al., 2007).

Se han reportado en humanos infección con virus de influenza de origen aviar (Wang, et al., 2013; Husain, 2014). Sin embargo, los virus aviares tienen dificultades para replicarse en hospederos humanos. La transmisión de los virus aviares pueden ocurrir de manera directa entre aves y humanos, sin embargo la transmisión de humano a humano no es eficiente. Para que ocurra es necesaria la adaptación del virus ya sea en un hospedero intermediario que actúe como mezclador de las secuencias genómicas, o a través de la adaptación del virus por medio de mutaciones en la proteína de superficie viral HA que le permita unirse a receptores específicos de humanos durante la infección (Landolt, et al., 2007).

Los cerdos son los principales mediadores para la transmisión de virus aviar a especies mamíferas como el ser humano. La especie porcina tiene receptores celulares en su tracto respiratorio capaces de permitir la unión de virus de origen aviar y de humano. Como resultado de la eficiente replicación de dos diferentes subtipos virales en los cerdos, surgen cepas pandémicas capaces de replicarse eficientemente en diferentes especies (Landolt, et al., 2007).

El virus de influenza porcino causa problemas respiratorios en los cerdos. Estos virus están ampliamente dispersos en el mundo. Se caracterizan por presentar una alta morbilidad y una mortalidad superior al 5% (Gutiérrez, 2010). Se han reportado 3 principales subtipos de virus de influenza (H1N1, H3N2 y H1N2) en la población porcina a nivel mundial. Estos subtipos tienden a ser endémicos en la población de cerdos y son los responsables de las enfermedades respiratorias más importantes en estos animales (Pacheco, *et al.*, 2013).

En animales de producción, las enfermedades respiratorias causadas por virus de influenza han tenido importancia económica. El sector pecuario se ha visto devastado frecuentemente por la aparición de cepas de influenza que han acabado con granjas completas de cerdos y aves. Además de que han tenido un impacto en la salud pública con la presentación de cepas zoonóticas con alta patogenicidad y virulencia (Gutiérrez, 2010; Wang *et al.*, 2014).

2.3. Evolución y deriva antigénica del virus de influenza A

En el siglo XIX se presentó la primera pandemia ocasionada por el virus de influenza, un subtipo de influenza A H1N1 infectó a la población humana y causó la conocida gripe española que fue altamente patógena y virulenta (Filette, *et al.*, 2005; Girard *et al.*, 2010; Yassine, *et al.*, 2010).

Tres de los subtipos virales de influenza A son los responsables de las pandemias en la historia del mundo; el subtipo H1N1 que tuvo su aparición en 1918 y 2009, el subtipo H2N2 en 1957 y el subtipo H3N2 en 1968; en humanos (Yassine, *et al.*, 2010; Han, *et al.*, 2011).

Estudios filogenéticos entre virus pandémicos, como el H2N2 de 1957, han mostrado que estos virus adquirieron los genes HA2 y NA2 de virus aviáres. Este mismo patrón se determinó para los virus H3N2 que emergieron en la pandemia de 1968, y se ha sugerido también que adquirieron genes del subtipo H3 de origen aviar (Han, *et al.*, 2011; SSA, 2014).

En 1930 se aisló en cerdos el primer virus de influenza A H1N1. Este virus es antigénicamente similar al virus humano de la gripe española de 1918. Este virus porcino “clásico” ha estado en circulación desde 1930 y hasta finales de los 90’s y se caracterizó por presentar cierta estabilidad antigénica. Sin embargo, la introducción del virus H3N2 en los cerdos en el año de 1998 dio lugar a rearrreglos genéticos entre segmentos del virus de origen humano y segmentos del virus de origen aviar. Lo que resultó en un triple rearrreglante, que dio lugar a los virus porcinos H1N1 y H1N2 (Garten, *et al.*, 2009).

Los virus de influenza sufren constantes variaciones antigénicas en sus proteínas HA y NA que les permite evadir la respuesta inmune. Estas variaciones antigénicas derivan de las mutaciones puntuales como sustituciones de nucleótidos, inserciones y deleciones de tripletes que ocurren en los genes como resultado de los errores en el copiado por la ARN polimerasa viral durante la transcripción (Webster *et al.*, 1992).

Las variaciones antigénicas se llevan a cabo por dos mecanismos conocidos como cambio y deriva antigénica. El cambio antigénico se da por mutaciones puntuales en los segmentos que conforman el ARN viral y se le conoce también como drift antigénico. Por otro lado, la deriva antigénica es el resultado de cambios genéticos mayores, que resultan en cambios en la composición estructural del virus; este proceso da lugar a la generación de subtipos nuevos del virus de influenza y también se le conoce como shift antigénico. La replicación del ARN viral resulta en una tasa de mutación de aproximadamente un cambio por cada genoma copiado (Webster *et al.*, 1992).

Las mutaciones generadas por la presión selectiva y/o los errores en la transcripción por parte de la ARN polimerasa viral se van acumulando dando lugar a variantes de las proteínas que se expresan en la cápside de los virus de influenza. La tasa de evolución es diferente para cada segmento; los genes de la hemaglutinina, la neuraminidasa y la M2, evolucionan más rápidamente que los demás. Se ha calculado que la tasa de evolución (esto es, la fijación de mutaciones de las proteínas Ha y Na) es alrededor del 1% anual. (Neuman *et al.*, 2009; Kawaoka *et al.*, 2012).

Sorprendentemente, el virus de influenza A H1N1 pandémico del 2009, se originó de un rearrreglo entre genomas de virus de origen humano, aviar y porcino (Figura 2).

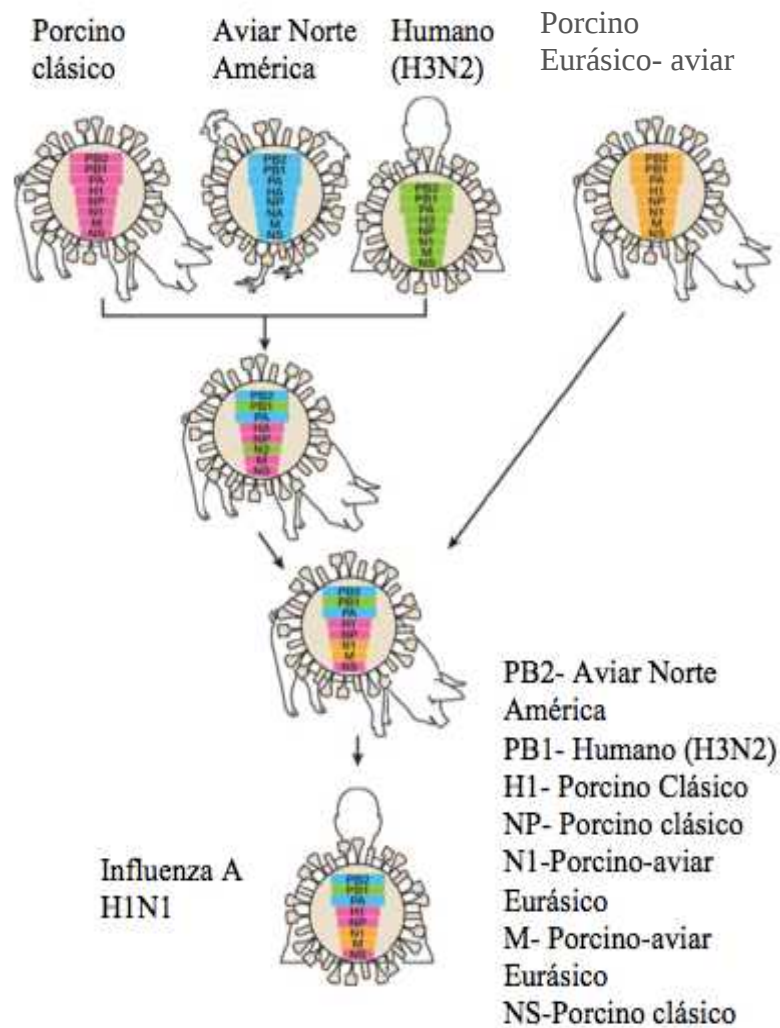


Figura 2. Rearreglo de segmentos genómicos del virus de influenza en cerdos. Células del cerdo tienen receptores específicos para las proteínas del virus de influenza aviar y para el virus de influenza de mamíferos, permitiendo de esta manera el intercambio y reasociación de las proteínas en los segmentos específicos del virus con la aparición de nuevas variantes de los subtipos (tomado de: Neuman *et. al.*, 2009).

En la primavera del 2013 se registraron en China casos de influenza en humanos originados por el virus H7N9 de origen aviar, con una alta tasa de mortalidad y una elevada frecuencia de aparición entre personas mayores de 30 años. A la fecha se han reportado en Asia un total de 453 casos confirmados de infecciones en humanos con esta cepa aviar que

ha presentando una mortalidad del 27.72% (WHO, 2014). Este hecho remarca la constante variación que existe en el virus de influenza (Wang, *et al.*, 2013; Husain, 2014).

2.4. Influenza Porcina

La influenza porcina es una enfermedad respiratoria aguda e infecciosa causada por el virus de influenza tipo A. Los virus de influenza son endémicos en las poblaciones de cerdos y son los responsables del aumento de casos de enfermedad respiratoria en estos animales (Brown, 2000; Ayora, 2005).

La patogenicidad del virus se caracteriza como una enfermedad de carácter agudo, con un período de incubación de 1 a 3 días. Ocasionalmente la viremia es de corta duración, lo que la hace difícil de detectar (Mi et al., 2009). La infección ocurre en el tracto respiratorio alto, la replicación viral se efectúa a nivel de las células del epitelio mucoso nasal, tonsilas, tráquea, pulmones y nódulos linfáticos traqueobronqueales. El principal órgano blanco son los pulmones, ya que se ha demostrado alto tropismo del virus en el epitelio bronqueo alveolar (Olsen et al., 2006; Van Reeth et al., 2006).

El cuadro clínico en cerdos se presenta con episodios de fiebre de entre 40 a 42°C, letargia, conjuntivitis, aumento en la secreción nasal, estornudo, tos, disnea y pérdida de peso. El estado inmunológico, la edad, la presencia de patógenos oportunistas y el estrés ambiental son factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad e incrementan la severidad de la misma (Vincent et al., 2008; Simon-Grifé et al., 2012).

2.5. Evolución y epidemiología del virus de influenza porcina

El primer virus de influenza porcina identificado fue el subtipo H1N1, que se considera la cepa prototipo de un grupo de virus conocidos como clásicos y que están presentes en las poblaciones de cerdos en todo el mundo. Los subtipos H1N1 y H1N2 circulan de manera continua en poblaciones de cerdos, siendo el principal reservorio de este virus, generalmente se asocian con enfermedades como la influenza H1N1 porcina clásica, influenza H1N1 de origen aviar y la influenza H3N2 de humanos (Ayora, 2005; Brown, 2000; Chapona, et al., 2014).

En 1918 fue observada por primera vez la influenza porcina en Estados Unidos de América, Hungría y China coincidiendo con la pandemia de influenza en humanos. Un estudio serológico confirmó la presencia del virus de influenza A en los casos reportados en cerdos y humanos. Sin embargo fue hasta 1930 cuando se aisló e identificó el virus de influenza como el causante de la enfermedad. En Europa se reportó la evidencia de infecciones causadas por el virus de influenza porcina en 1976 cuando se aisló en cerdos el virus de influenza porcina clásica en el norte de Italia, de una embarcación proveniente de Estados Unidos (Webster, et. al., 1992; Brown, 2000; Ayora, 2005).

En 1984 surge un brote de influenza causada por el virus de influenza A del subtipo H3N2 en cerdos, relacionado antigénicamente con el virus que afectó a humanos durante los años 70's en Europa, presentando elevadas seroprevalencias (Brown, 2000).

2.6. Situación actual del virus de influenza porcina en México y el mundo

En México, se reportó en el año 2010 evidencia serológica de la circulación ~~viral~~ de los serotipos H3N2 y H1N1 del virus influenza en granjas porcinas de ciclo completo del estado de Yucatán, con una prevalencia del 56% en granjas, mientras que el 8.3% y 65.1% de los sueros presentaron seropositividad a los subtipos H1N1 y H3N2 respectivamente. Un 6.6% de los sueros compartían ambos subtipos (Pacheco, *et al.*, 2013).

Según reportes del Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC, 2015) en los últimos años se ha detectado la circulación de variantes del virus de influenza H1N1, H3N2 y H1N2, con triples rearreglantes en cerdos de Estados Unidos.

2.7. Respuesta inmune del hospedero frente al virus de influenza

Los virus de influenza activan la respuesta inmune innata y adaptativa al entrar en contacto con células del tracto respiratorio. Sin embargo, el tipo y la eficacia de la respuesta inmune para controlar la infección viral puede depender de si existió una exposición previa y/o de la capacidad de acción de las células presentadoras de antígeno (Gerhard et al., 1997).

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa del hospedero contra la infección por el virus de influenza. La respuesta inmune mediada por inmunoglobulinas presentes en la mucosa del tracto respiratorio, ya que ahí se desarrolla la infección y es el área donde se encuentra la primera defensa contra el virus. Los virus de influenza son detectados y destruidos en pocas horas post-infección por mecanismos inespecíficos (Villalobos, et al., 2010; Criscis, et al., 2013).

Los macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y células asesinas (NK por sus siglas en inglés) son las encargadas de controlar la replicación y diseminación viral durante la infección, así como de dirigir la respuesta inmune (Criscis, et al., 2013). Estas células secretan diferentes mediadores químicos como las citosinas que activan células T y células de memoria e inducen la respuesta inmune adaptativa de tipo humoral y celular, como se describe en la figura 3 (Villalobos, et al., 2010; Criscis, et al., 2013).

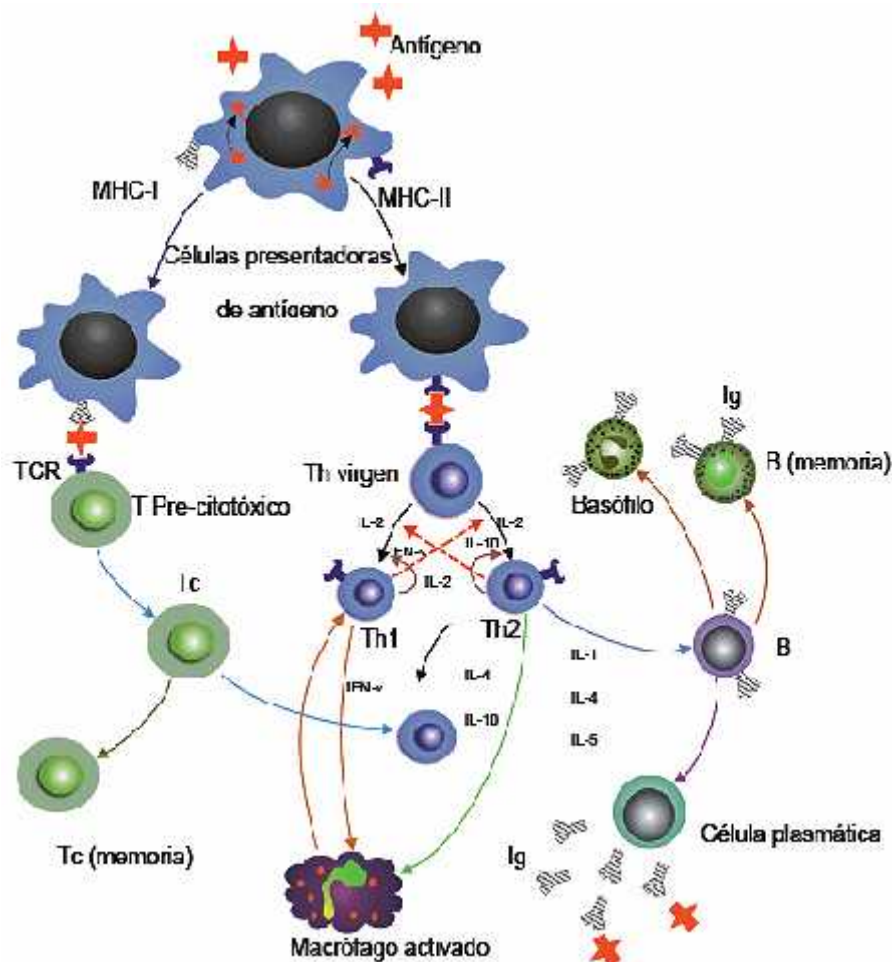


Figura 3. Regulación de la respuesta inmune, mediada por la actividad de las células presentadoras de antígenos. Las células dendríticas nativas detectan la presencia de virus, maduran con la expresión de citoquinas y receptores de quimiocinas. Estas células del sistema inmune detectan receptores tipo T de reconocimiento (TCR) y migran a los órganos linfoides secundarios para presentar al antígeno a los linfocitos T. La inmunidad adquirida, contra el virus de influenza, es mediada por anticuerpos neutralizantes. La activación depende de la estimulación del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II (MCH-I y MCH-II) a partir de la activación de linfocitos B, linfocitos T cooperadores (Th) CD4+ y linfocitos T citotóxicos (Tc) CD8+. Tomado de Penna (2013).

La inmunidad mediada por células frente a virus de influenza tiene actividad cruzada entre los diferentes subtipos virales (Nicholson, *et al.*, 1998). La principal línea de defensa de la respuesta inmune adaptativa contra el virus de influenza es mediada por la activación de linfocitos T cooperadores (CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD8+) y la activación de linfocitos B para la producción de anticuerpos neutralizantes dirigidos a la

glicoproteína de superficie viral HA. Esta primera línea de defensa tiene capacidad de eliminar al virus y las células infectadas (Nicholson, *et al.*, 1998; Doherty, *et al.*, 2000; Brown, *et al.*, 2004; Karp, 2009).

En la superficie de la subunidad HA1 se definen 5 sitios antigénicos principales, denominados A, B, C, D y E, corresponden a la región más expuesta en la membrana del virus, para detectar los receptores de reconocimiento en la célula blanco. Los anticuerpos que se unen al mayor número de sitios antigénicos inhiben la adhesión del virus a los residuos terminales del ácido siálico presente en la membrana de las células blanco y previenen la entrada del virion al citosol de la célula (Nicholson, *et al.*, 1998).

La actividad cruzada de los anticuerpos neutralizantes está dirigida a las glicoproteínas de superficie HA y NA, siendo menos eficiente cuando se presentan mutaciones puntuales como resultado de la deriva antigénica presente en los virus de influenza (Air, 2015).

2.8. Pruebas diagnósticas para detección del virus de influenza porcina y anticuerpos dirigidos al virus

El diagnóstico definitivo de la influenza se logra por medio de pruebas de laboratorio, ya que los signos clínicos característicos de la influenza porcina se presentan en una amplia variedad de enfermedades respiratorias (Losen et al., 2006).

Para realizar el diagnóstico se pueden llevar a cabo dos procedimientos de laboratorio basados en la detección de anticuerpos en suero y en la detección de partículas virales en muestras clínicas (suero, exudado nasal y tejido animal) (OMS, 2014).

Para el diagnóstico serológico se emplean los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o ensayos de inhibición de la hemaglutinación (IHA). De acuerdo al manual diagnóstico y vacunas para animales terrestres de la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE, 2015), el ensayo de IHA permite la detección de anticuerpos específicos para virus de influenza, y es considerado como la prueba estándar de oro para determinar la protección mediada por anticuerpos. El ensayo consiste en exponer los sueros de los animales a concentraciones conocidas del antígeno viral y posteriormente se agregan

glóbulos rojos de alguna especie animal como puede ser pollo o pavo principalmente. El título de anticuerpos se determina como la última dilución del suero en donde se observa la ausencia de aglutinación de eritrocitos. Es un ensayo sencillo y económico pero que requiere de homología entre los antígenos virales (Sambute, et al., 2015).

Para el diagnóstico virológico se emplean los ensayos de aislamiento viral en cultivo celular o embriones de pollo; para la amplificación de los virus y la detección de ácidos nucleicos derivados de antígeno viral, por la técnica de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa por retrotranscripción), a partir de muestras de suero, tejido animal y secreciones nasales (GISN-WHO, 2011).

Las técnicas de RT-PCR se emplean para la amplificación genómica de virus RNA y pueden ser por punto final o en tiempo real. El principio fundamental de esta técnica es la síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir de RNA extraído de muestras clínicas usando la enzima transcriptasa reversa (RT). La amplificación logarítmica del DNA por RT-PCR en punto final ocurre en una reacción térmica cíclica.

La RT-PCR en tiempo real cuantitativa con sondas consiste en la acumulación de productos amplificados que permite la detección y medición progresiva del DNA. La reacción consiste en la emisión de fluorescencia la cual mide de manera directamente proporcional el incremento en la cantidad de DNA (Vio-Rad Laboratories, 2006; GISN-WHO, 2011); Tamay de Dios, et al., 2013). Este método es mas confiable debido a la especificidad en la sondas que se unen a secuencias específicas del DNA.

2.9. Vacunas contra el virus de influenza porcina

En 1942 la comisión para el control y prevención de epidemias causadas por influenza en Estados Unidos, comenzó el estudio clínico usando vacunas inactivadas contra el virus de influenza A y B (Nicholson, *et al.*, 1998).

En 1950 se descubrió la inducción de anticuerpos específicos contra la HA presentes en la superficie de los virus. A partir de entonces los esfuerzos estaban orientados al desarrollo de vacunas basadas en antígenos de superficie del virus de influenza (HA y NA). En 1980 se implementa el uso de vacunas dirigidas a las proteínas de superficie HA y NA (McClean, et al., 2014).

Las estrategias en los sistemas de vacunación que actualmente se emplean contra virus de influenza proporcionan protección significativa contra los subtipos A H3N2 y el virus de influenza B. Estas vacunas, están elaboradas con virus inactivos, y son de tipo trivalente y tetravalente, que han sido fabricadas para brindar protección contra 3 o 4 subtipos, respectivamente (McClean, et al., 2014).

Las vacunas contra el virus de influenza porcina que actualmente se producen a nivel comercial, con licencia en Estados Unidos, son de virus inactivados. A partir de aislados de muestras de cerdos con signos clínicos de enfermedad. Los virus son cultivados en embriones de pollo para amplificar el título viral e inactivados por múltiples reacciones químicas y medios físicos (luz ultravioleta) y adiamantados o emulsionados con químicos y aceites minerales.

Para determinar la eficacia de las vacunas se llevan a cabo retos de animales seronegativos, donde se mide la seroconversión de anticuerpos hacia cepas homologas del virus y la presentación de signos clínicos y el daño a nivel pulmonar, en algunos casos. Las vacunas convencionales de virus de influenza inactivados, inducen la activación de una respuesta inmune contra antígenos similares a los contenidos en las vacunas. Es ideal que se pruebe la eficacia de la vacuna en la producción de anticuerpos neutralizantes tempranos sin desencadenar una respuesta inflamatoria extendida (Kitikoon, et al., 2006; Hoffman, et al., 2015; Sandbulte, et al., 2015).

Las técnicas de seroneutralización viral permiten evaluar la eficacia de las vacunas en la generación de anticuerpos neutralizantes. Esta técnica consiste en exponer anticuerpos presentes en suero a una concentración constante conocida de partículas virales infectivas (TCID₅₀), y de esta manera evaluar la capacidad de los anticuerpos neutralizantes en evitar el incremento de partículas virales en cultivo celular (OMS, 2011).

La porcicultura representa un sustento monetario y de alimento para la población humana. Las tasas de mortalidad y morbilidad en los cerdos a consecuencia de la infección con el virus de influenza en combinación con patógenos oportunistas representan un impacto negativo en la producción. Por esta razón, los productores han optado por la búsqueda de esquemas de vacunación alternativos para el control de enfermedades como la aplicación de autovacunas. Este esquema de autovacunas consiste en la inmunización de los

animales con inóculos de virus de influenza homólogos inactivados que se encuentren en circulación en las granjas piscícolas.

Debido a que la principal vía de entrada de patógenos a las granjas porcícolas radica en la circulación de los animales entre las granjas, los productores han optado por el manejo de animales de reemplazo, por lo que el control y la prevención de enfermedades está dirigido a la vacunación y tratamiento de estos animales, antes de iniciar su etapa reproductiva.

Por tal motivo el objetivo de este proyecto de investigación fue determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes en cerdas de reemplazo vacunadas con virus de influenza inactivados.

3. Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

La aplicación de vacunas con virus homólogos inactivados generará una respuesta mediada por anticuerpos neutralizantes contra el virus de influenza A en cerdas de reemplazo.

3.2 Objetivo general

Evaluar el efecto de la vacunación con virus homólogos inactivados en la inducción de anticuerpos neutralizantes contra el virus de influenza A en cerdas de reemplazo.

3.3 Objetivos específicos

- Determinar seroconversión contra el virus de influenza A en cerdas de reemplazo vacunadas con virus homólogos inactivados.
- Determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus de influenza A porcina en cerdas de reemplazo vacunadas con virus homólogos inactivados.
- Caracterizar los subtipos del virus de influenza circulantes en la población de cerdas de reemplazo

REFERENCIAS

- Alberini I., Del Tordello E., Fasolo A., Nigel, Fasolo A., Temperton J., Galli G., Gentile C., Montomoli E., Hibert A., Banzhoff A., Del Guidice G., Donnelly J., Rappouli R., Capecchi B., (2009). Pseudoparticle neutralization is a reliable assay to measure immunity and cross-reactivity to H5N1 influenza viruses. *Vaccine Rev.* (27): 5998-6003.
- Air G., (2015). Influenza virus antigenicity and broadly neutralizing epitopes. *ciencedirect.* (11): 113-121.
- Arranz R., Coloma R., Chichon F.J., Conesa J.J., Carrascosa J., L., Valpuesta J.M., Ortin J., Martin-Benito J., (2012). The structure of native influenza virion ribonucleoproteins. *Science.* (338): 1634-1637.
- Ayora G., (2005). Epidemiología, prevención y control de influenza en los animales domésticos. En: Rodríguez V.I. Enfermedades de importancia económica en producción animal. Mc Graw-Hill-Interamericana UADY. México, D.F. pp. 119-137.
- Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y., Pulendran B., Palucka K., (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Rev. Immunol.* (18): 767-811.
- Bouvier N. M., Palese, P., (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 4:D49-D53.
- Bridgen A., (2013). Revers genetics of RNA viruses. applications and perspectives. Wiley-Blackwell. pp. 225-241.
- Brown D., Roman E., Swain S., (2004). CD4 T cell responses to influenza infection. *Semen Immunol.* (16):171-177.

- Center for disease control and prevention (CDC). Information on Swine Influenza/Variant Influenza Viruses, (2015): <http://www.cdc.gov/flu/swineflu/index.htm>.
- Chiapponi C., Baioni L., Luppi A., Moreno A., Castellan A., Foni E., (2014). Temporal insight into the natural generation of a new reassortant porcine influenza virus in a swine holding. *Veterinary Microbiology*. (174): 9-15.
- Chu C., Fan S., Li C., Macken C., Kim J., Hatta M., Neumann G., Kawaoka Y., (2012). Functional Analysis of Conserved Motifs in Influenza Virus PB1 Protein. *PLos one* 7(5):1-8.
- Collin N., Radiguès X., The World Health Organization H1N1 Vaccine Task Force., (2009). Vaccine production capacity for seasonal and pandemic (H1N1) 2009 influenza. *Vaccine Rev.* (29): 5184-5186.
- Crisci E., Mussa T., Fraile L., Montoya M. Review: Influenza virus in pigs, (2013). *Molecular immunology*. (55): 200-215.
- De Filette M., Min J., Birkett A., Lyons K., Schultz B., Tonkyro A., Resch S., Fiers W., (2005). "Universal influenza A vaccine: Optimization of M2-based constructs." *Virology* 337 (1):149-161.
- Direccion General de epidemiologia (DGE). De la Secretaria de prevencion y promicion de la salud, (2015). Informe semanal de vigilancia epidemiologica. En: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/2015/influenza/influenza15_06.html.
- Doherty P., Christensen J., (2000). Accessing complexity, the dynamics of virus-specific T cell responses. *Annul Rev. immunol* 18: 561-592.
- Dormitzer P., Galli G., Castelino F., Golding H., Khurana S., Del Giudice G., Rappuoli R., (2011). Influenza vaccine immunology. *Immunological reviews* (239): 167-177.

- Flinsenber T., Compeer E., Boelens J., Boes M., (2011). Antigen cross-presentation: extending recent laboratory findings to therapeutic intervention. *Clinical & experimental immunology* (165): 8-18.
- Fodor E., Devenish L., Engelhardt O. G. Palese P., Brownlee G. G., Garcia S. A. 1999. Rescue of Influenza A Virus from recombinant DNA. *Journal of virology* (73): 9679-9682.
- Garten R., Davis T., Rossell C., Sho B., Lindstrom S., Balish A., Sessions W., Xu X., Skepner E., Deyde V., Okomo-Adhiambo M., Gubareva L., Barnes J., Smith C., Emery S., Hillman M., Rivaller P., et al. (2009). Antigenic and genetic Characteristics of Swine- Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses circulating in humans. *Science* 325, 197: 197-201. En: www.sciencemag.org/cgi/content/full/1176225/DC1.
- Gerhard, W., Mozdzanowska, K., Furchner, M., Washko, G., Maiese, K., (1997). Role of the B-cell response in recovery of mice from primary influenza virus infection. *Immunol. Rev.* (159): 95–103.
- Germain R., Jenkins M., (2004). In vivo antigen presentation. *Carr Open Immunol* (16):120-125.
- Girard M., Tam J., Assossou O., Kieny M. (2010). The 2009 A (H1 N1) influenza virus pandemic. 4895-4902. A review vaccine 28 en www.elsevier.com/locate/vaccine
- Global Influenza Surveillance Network-World Health Organization (GISN-WHO). (2011). Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Library Cataloguing-in-Publication Data. En: www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/
- Gomez L., Blanco M., Domenech A. (2007). Manual de inmunologia veterinaria. Pearson. Madrid-España. pp. 63-103; 409-430.

- Gottlieb, T., and T. Ben-Yedidia. (2014). Epitope-based approaches to a universal influenza vaccine. *Journal Autoimmun* 54. pp. 15-20 en: www.elsevier.com/locate/jautimm.
- Gutierrez J. (2010). *Inmunología veterinaria 2ª Edición. Manual moderno*. México, D.F. pp.89-139.
- Han T., Marasco W., (2011). Structural basis of influenza virus neutralization. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1217):178-190.
- Hoffman E., Stech J., Guan Y., Webster G.R., Perez D.R. (2001), Universal Primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*. (146): 2275-2286.
- Husain, M., (2014). Avian influenza A (H7N9) virus infection in humans: Epidemiology, evolution, and pathogenesis. *Infection, Genetics and Evolution* 28 (0):304-312. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.016>.
- Itano A., Jenkins M., (2003). Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat. Immunol* (4): 733-739.
- Karp G., (2009). *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos*. 5ª edición. Mc Graw-Hill. México D.F. pp. 693-718.
- Kawaoka Y., (2006), *Influenza virology: current topics*. Caister academic press. England.
- Kawaoka Y., Neumann G., (2012), *Influenza virus. Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*. 865. pp. 1-7; 193-206; 175-191.
- Kitikoon P., Nilubol D., Erickson B.J., Janke B.H., Hoover T.C., Sornen S.A., Thacker E.L., 2006. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. *Vet immunol Immunopathol*. (112): 117-128.

- Knossow M., Gaudier M., Douglas A., Barre`re B., Bizebard T., Barbey C., Gigant G., Skehel J., (2002). Mechanism of Neutralization of Influenza Virus Infectivity by Antibodies. *Virology* (302): 294–298.
- Koyama S., Aoshi T., Tanimoto T., Kumagai Y., Kobiyama K., Tougan T., Sakurai K., Coban C., Horii T., Akira S., Ishii1, K., (2010). Plasmacytoid Dendritic Cells Delineate Immunogenicity of Influenza Vaccine Subtypes. *Science Translational Medicine* (2): 1-8.
- Kreijtz J., Fouchier R., Rimmelzwaan G., (2011). Immune responses to influenza virus infection. *Review Virus Research*. (162): 19-30.
- Lagoja I, Clercq E., (2008). Anti-influenza virus agents: synthesis and mode of action. *Medical Research Rev.* 28 (1): 1-38.
- Landolt G., Olsen C., (2007). Up to new tricks-A review of cross-species transmission of influenza A viruses. *Animal Health Research Rev.* 8(1): 1-21.
- Lee HK., Tang JW., Kong DH., Koay Es., (2013). Simplified large-Scale sanger genome sequencing for influenza A/H3N2 virus. *Plos One*. 1-8.
- Marcelin G., Sandbulte M., Webby., (2012). Contribution of antibody production against neuraminidase to the protection afforded by influenza vaccines. *reviews medical virology* (22): 267-279.
- Ma W., Vincent A., Janke B., Gramer M., Richt J. (2009). The role of swine in the generation of novel Influenza viruses. *Zoonoses Public Health*. (56): 326-337.
- Mclean H., Thompson M., Sundaram M., Kieke B., Gaglani M., Murthy K., Piedra P., Zimmerman R., Nowalk M., Raviotta J., Jackson M., Jackson L., Ohmit S., Petrie J., Monto A., Meece J., Thaker S., Clippard J., Spence S., Fry A., Belongia E., (2014). Influenza Vaccine Effectiveness in the united states during 2012-2013: variable protection by age and virus type. *Jornal of infectious diseases*. 1-12.

- Mussa T., Rodríguez-Cariño C., Pujol M., Córdoba L., Busquets N., Crisci E., Domínguez J., Fraile L., Montoya M., (2011). Interaction of porcine conventional dendritic cells with swine influenza virus. *Virology*. (420): 125-134.
- Nayak D.P., Hui E.K., Barman S., (2004). Assembly and budding of influenza virus. *Virus Research*. (106): 147-165.
- Neumann G., Noda T., Kawaoka Y., (2009). Emergence and pandemic potential of swine- origin H1N1 influenza virus. *Nature Rev*. (18): 931-939.
- Nicholson K., Webster R., Hay A., (1998). Textbook of influenza. Blackwell science Oxford. pp. 267-322.
- Noah D., Hill H., Hines D., White E., Wolff M. (2009). Qualification of the Hemagglutination Inhibition Assay in Support of Pandemic Influenza Vaccine Licensure. *Clinical and vaccine immunology*. 16(4): 558-566.
- Olsen C., Brown I., Easterday B., Van Reeth K. (2006). Swine Influenza. En: S. D'Allaire D., Taylor B., Straw J., Zimmeran Ed. *Diseases of swine*. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. pp. 469-479.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2011). Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Library Cataloguing-in-Publication Data. En: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44518/1/9789241548090_eng.pdf.
- Organización mundial de la salud (OIE), Manual terrestre, (2015): <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/> <http://www.oie.int/>).

- Pacheco J., Lugo J., Canche L., Ruiz H., (2013). Estudios multidisciplinarios de las enfermedades zoonóticas y ETVs en Yucatán. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. pp. 203-205.
- Penna S., (2013). Trastornos inmunológicos inducidos por mercurio en el sistema reproductor masculino humano. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela 25(1): 11-34.
- Prickett J., Zimmerman J., (2010). The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. Anim Health Reserch Reviews 2(207):1-10.
- Quattrocchi M., Lobreglio G., Leuzzi G., De Donno A. (2011). Evaluation of Immune Responses to Seasonal Influenza Vaccination in Healthy Volunteers in South Apulia, Italy: A Pilot Study. J Clin Med Res. 3(6):291-295
- Ramos I., Fernández-Sesma A., (2012). Cell receptors for influenza A viruses and the innate immune response. Frontiers in Microbiology, 3 doi:10.3389/fmicb.2012.00117
- Salazar M., López O., Ávila G., Ramírez G., Castro M., (2010). El origen de la variabilidad genética de los virus de la influenza. Gac. Méd. México 146:199- 206.
- Sandbulte M., Spickler A., Zaabel P., Roth J. (2015). Optimal use of vaccines for control of influenza A virus in swine. Vaccines. (2): 22-73
- Secretaria de salud (SSA). Subsecretaria de prevención y promoción de la salud. Dirección general de epidemiología. (2014). Influenza documento técnico. En: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/lineamientos/influenza/documento_tecnico_influenza.pdf
- Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agropecuaria (SENASICA). Del Sistema nacional de vigilancia epidemiológica. Dirección de epidemiología y

análisis de riesgo. En la dirección general de salud animal, (2014). Informe semanal sobre enfermedades y plagas de reporte obligatorio inmediato.

- Sistema nacional de notificación semanal de casos nuevos (SINAVE). Dirección General de Epidemiología de la Subsecretaría de prevención y promoción de la salud, (2015). Informe semanal de vigilancia epidemiológica: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/2015/influenza/influenza15_06.html
- Skehel J., Wiley D. (2000). Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The influenza Hemagglutinin. *Annu Rev. Biochem.* (69): 531-569.
- Stephenson I., Das R., Wood J., Katz J., (2007). Comparison of neutralizing antibody assays for detection of antibody to influenza A/H3N2 viruses: An international collaborative study. *Vaccine.* (25): 4046-4063.
- Stephenson I., Heath A., Major D., Newman R., Hoschler K., Junzi., Katz J., Weir J., Zambon M., Wood J., (2009). Reproducibility of serologic assays for influenza virus A (H5N1). *EID Journal* 15(8): 1250–1259.
- Tamay de Dios L., Ibarra C., Velasquillo C. (2013). Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad.* 2(2): 70-78.
- Tizard, I., (2009). *Veterinary immunology: an introduction.* 8th ed. Mc Graw Hill. México D.F.
- Van Reeth K., Vleeschauwer A., Kyriakis C., Pensaert M. (2006). Influenza in birds, pigs and human: Old theories versus current viewpoints. En : *Proceedings of the 19th IPVS Congress Volume I.* del 19 al 16 de Julio de 2006. Copenhagen, Dinamarca. International Pig Veterinary Society. pp. 26-35.
- Villalobos J., Gomez J., Ponce de Leon., (2010). La epidemia de influenza A/H1N1 en México. México D.F. Medica-Panamericana. p. 47-66.

- Vincent A., Ciacchi-Zanellaa J., Lorussoa A., Gaugerc P., Zanellaa E., Kehrli Jr. M., Jankec B., Lagera K., 2010. Efficacy of inactivated swine influenza virus vaccines against the 2009 A/H1N1 influenza virus in pigs. *Vaccine* 28. (15): 2781-2787.
- Wang, J., Q. Wang, T. Han, Y. K. Li, S. L. Zhu, F. Ao, J. Feng, M. Z. Jing, L. Wang, L. B. Ye, and Y. Zhu. (2014). Soluble interleukin-6 receptor is elevated during influenza A virus infection and mediates the IL-6 and IL-32 inflammatory cytokine burst. *Cell Mol Immunol*. doi: 10.1038/cmi.2014.80.
- Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y. (1992), Evolution and ecology of Influenza A. *Microbiology Reviews* march 56 (1):152-179.
- World Health Organization (WHO), (2015). Influenza Vaccine Response during the Start of a Pandemic. Report of a WHO Informal Consultation held in Geneva, Switzerland. Junio, 2016. En: <http://www.who.int/influenza/resources/publications/influenzavaccinereponse>
- World Health Organization (WHO) RISK ASSESSMENT. (2014). Human infections with avian influenza A(H7N9) virus. En: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/
- World Health Organization (WHO). (2009). Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Wu J., Fang H., Chen J., Zhou J., Feng Z., Li C., Qiu Y., Liu Y., Lu M., Liu L., Dong S., Gao Q., Zhang X., Wang N., Yin W., Dong X., (2009). Immunogenicity, Safety, and Cross-Reactivity of an Inactivated, Adjuvanted, Prototype Pandemic Influenza (H5N1) Vaccine: A Phase II, Double Blind, Randomized Trial. *Clinical Infectious Diseases*. (48): 1087-1095.

- Yang H., Chen Y., Qiao C., Xu C., Yan M., , Xin X., Bu Z., Chen H., (2015). Two different genotypes of H1N2 swine influenza virus isolated in northern China and their pathogenicity in animals. *Veterinary Microbiology*. (175): 224-231
- Yassine H., Lee C., Gourapura R, Saify Y., (2010). Interspecies and intraspecies transmission of influenza A viruses: viral, host and environmental factors. *Animal Health Research Reviews* 11(1): 53–72.

CAPÍTULO III

Para enviar a la revista Veterinary Immunology and Immunopathology

Artículo

Actividad de anticuerpos neutralizantes contra el virus de influenza A en cerdas de reemplazo vacunadas con virus inactivados

Jannet Concepcion Franco- Farfán*, Guadalupe Ayora-Talavera**, Alejandro Alzina
López***

*Estudiante de Maestría en Ciencias Agropecuarias. Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán. Km 15.5 carretera 11 Mérida-Xmatkuil, apartado postal 4-116, Mérida Yucatán, México.

** Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán, C.43 s/n entre 96 Paseo de las Fuentes y 40 Col. Inalámbrica. Apartado postal 97225, Mérida, Yuc., México.

*** Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán. Km 15.5 carretera 11 Mérida-Xmatkuil, apartado postal 4-116, Mérida Yucatán, México.

AUTOR RESPONSABLE: Dra. Guadalupe Ayora Talavera. Centro de investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán, C.43 s/n entre 96 Paseo de las Fuentes y 40 Col. Inalámbrica. Apartado postal 97225, Mérida, Yucatán, México. Apartado postal 97225, Mérida, Yucatán, México. Tel. 9246412 Ext. 1213 Laboratorio de Virología unidad Inalámbrica. E-mail: talavera@correo.uady.mx

El texto fue elaborado acorde con las normas editoriales de dicha revista.

Resumen

Los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2 del virus de influenza A porcina son los responsables de enfermedades respiratorias en cerdos de granja. Los sistemas preventivos como la vacunación disminuyen el riesgo de brotes de enfermedad en animales de producción. La finalidad de las vacunas es la generación de anticuerpos que neutralicen al virus, evitando que infecte a la célula y se disemine en el organismo. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes en cerdas de reemplazo vacunadas con virus de influenza inactivados. Se realizaron ensayos de inhibición de la hemaglutinación donde se observó la seroconversión a partir de la aplicación de las vacunas, así como la actividad neutralizante de los anticuerpos por medio de ensayos de microneutralización, contra cepas del virus de influenza A porcino. Los resultados nos indican seropositividad en el títulos de anticuerpos a partir de los 50 días pos vacunación. Los resultados observados en el ensayo de microneutralización indican presencia de anticuerpos neutralizantes a partir de una segunda aplicación de dosis vacunal. Concluimos que el uso de vacunas con cepas homólogas de virus inactivados, activan la respuesta inmune mediada por anticuerpos en la protección contra el virus de influenza A porcina.

Palabras clave; influenza porcina; anticuerpo neutralizante; virus homólogo; microneutralización.

Abstract

Swine influenza A H1N1, H1N2 and H3N2 viruses are an important cause of disease in pigs worldwide and represent a risk factor in the economy of pig farms and to the human health. Vaccination as a prophylactic measure, decreases the risk of influenza virus outbreaks through the induction of neutralizing antibodies, avoiding cell infection and virus spread in the organism. The objective of the vaccines is the production of antibodies to neutralize the virus, avoiding cell infection and the spread in the organism. The objective of this work was to determine the presence of neutralizing antibodies in replacement gilts vaccinated with inactivated influenza virus. Seroconversion after vaccination was assessed by hemagglutination inhibition assays and the presence of neutralizing antibodies was detected by a microneutralization assay. The results indicated seropositivity against the swine influenza virus H1N1 at 50 days post-vaccination and presence of neutralizing antibodies only after the second application of the vaccine dose. We conclude that the use of vaccines of homologous strains of inactivate virus, induce an immune response mediated by antibodies in the protection against swine influenza A virus.

Keywords: swine influenza virus; neutralizing antibodies; homologous strains; microneutralization.

1. INTRODUCCIÓN

La influenza A es causada por un virus envuelto con genoma de RNA de sentido negativo, perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*. Esta familia de virus se clasifica según la composición de su genoma en influenza A, B y C, que se diferencian en los sitios antigénicos presentes en la nucleocápside (NP) y la proteína de matriz (M). Los virus de influenza están ampliamente dispersos en el mundo y se caracterizan por presentar una alta morbilidad y una mortalidad superior al 5%. Los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 se han presentado en diferentes poblaciones de aves y mamíferos, incluido el hombre (Bouvier, *et al.*, 2008; Gutiérrez, 2010; Han, *et al.*, 2011; Crisci, *et al.*, 2013; SSA, 2014).

El virus de influenza porcino causa enfermedad respiratoria en los cerdos, con aumento en la secreción nasal, anorexia, letargia, pérdida de peso y en algunas ocasiones se han reportado casos de abortos en cerdas preñadas infectadas con el virus. Los cerdos infectados por lo general cursan por una fase aguda febril corta, que puede complicarse por la presencia de patógenos oportunistas. La transmisión viral ocurre entre 5-7 días, a partir de la presentación de signos clínicos, y puede ser por contacto directo con secreciones nasales (Corzo, *et al.*, 2013).

Los sistemas de producción intensivos se encuentran en mayor riesgo de brotes causados por el virus de influenza lo que afecta de manera negativa la economía de la granja e incrementa el riesgo de una infección en humanos causada por una cepa del virus de influenza A porcina zoonótica (Corzo, *et al.*, 2013; Rah, *et al.*, 2015). Los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2 del virus de influenza A porcina son los responsables de enfermedades respiratorias en cerdos, siendo endémicos en la población porcina de todo el mundo (Pacheco, *et al.*, 2013; Rahn, *et al.*, 2015).

La porcicultura juega un papel importante en la economía de México. Yucatán ocupa el 5° lugar a nivel nacional en producción de carne fresca de cerdo. En un estudio retrospectivo realizado en granjas porcícolas de la zona sureste de México se observó presencia del subtipo H3N2 en el 65.1% y 8.3% del subtipo H1N1, lo que representa un mayor riesgo de presentación de casos en la producción porcina en México (López, *et al.*, 2014; Rahn, *et al.*, 2015).

Los sistemas preventivos como la vacunación disminuyen el riesgo de brotes infecciosos. Vacunas contra el virus de influenza reducen los signos clínicos de la enfermedad, disminuye la circulación del virus dentro de las áreas de producción, previene de pérdidas económicas en la porcicultura, y reducen el riesgo de brotes de influenza en humanos causados por cepas zoonóticas del virus (Rahn, et al., 2015).

Las vacunas comerciales contra el virus de influenza porcina que actualmente se producen, con licencia en Estados Unidos, son de virus inactivados. Estas vacunas se derivan de virus aislados de muestras de cerdos. Los virus son cultivados en embriones de pollo para amplificar el título viral e inactivados por múltiples reacciones químicas y medios físicos (como luz ultravioleta) y adyuvantados o emulsionados con químicos y aceites minerales. La eficacia de las vacunas se llevan a cabo por retos de animales seronegativos, y se evalúa la seroconversión y la presentación de signos clínicos y el daño a nivel pulmonar, en algunos casos. Las vacunas convencionales de virus de influenza inactivados, inducen la activación de una respuesta inmune contra antígenos similares a los contenidos en las vacunas (Kitikoon, et al., 2006; Hoffman, et al., 2015; Sandbulte, et al., 2015).

El objetivo del presente estudio fue determinar la seroconversión y la presencia de anticuerpos neutralizantes, en muestras de suero de cerdas de reemplazo vacunadas con virus de influenza A porcina H1N1 y H3N2 inactivados, en una granja porcícola del estado de Yucatán. Se llevó a cabo el análisis de la respuesta inmune mediada por anticuerpos, para determinar si las vacunas aplicadas generan la activación de una respuesta inmune frente a subtipos del virus de influenza A.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio

El estudio se realizó en una granja porcícola de ciclo completo ubicada en la zona Noroeste del estado de Yucatán, situada en el municipio de Motul del estado de Yucatán, carretera Motul-Cacalchén, Yucatán, México, coordenadas 21° 00' 05.2" latitud norte y 89° 14' 03.9" longitud Oeste del meridiano de Greenwich, cuyo clima de la región es tropical subhúmedo. El estudio se llevó a cabo durante los meses de noviembre del 2015 a mayo del 2016.

2.2. Esquema de Vacunación

Se evaluaron dos vacunas que contienen virus inactivados proporcionadas amablemente por diferentes compañías, denominadas como vacunas A y B. La vacuna A contiene los subtipos H1N1 y H3N2 del virus de influenza A porcino, aislados de animales enfermos en granjas porcícolas del estado de Yucatán. La vacuna B contiene los subtipos H1N1 y H3N2 del virus de influenza A porcino aislados de granjas porcícolas a nivel nacional.

Brevemente se describe el esquema de vacunación. Se seleccionaron dos grupos de 50 animales cada uno. La vacunación consistió en la aplicación de cada vacuna (A y B) en dos tiempos por grupo con un intervalo de 150 días entre cada aplicación. La primera aplicación se llevó a cabo a las 4 semanas de edad de las cerdas y la segunda a las 26 semanas de edad de las mismas.

El esquema consistió en realizar una toma de muestra de suero a partir de sangre entera considerada como basal previo a la aplicación de la primera dosis. Posteriormente se realizaron tres tomas de muestras de suero a los 20, 50 y 150 días post-vacunación. En este último inmediatamente después a la toma de las muestras se aplicó la segunda dosis de la vacuna. Para medir el efecto de la segunda dosis se colectaron muestras de sangre a los 170 días post-vacunación. Como se describe el esquema de vacunación en la figura 1.

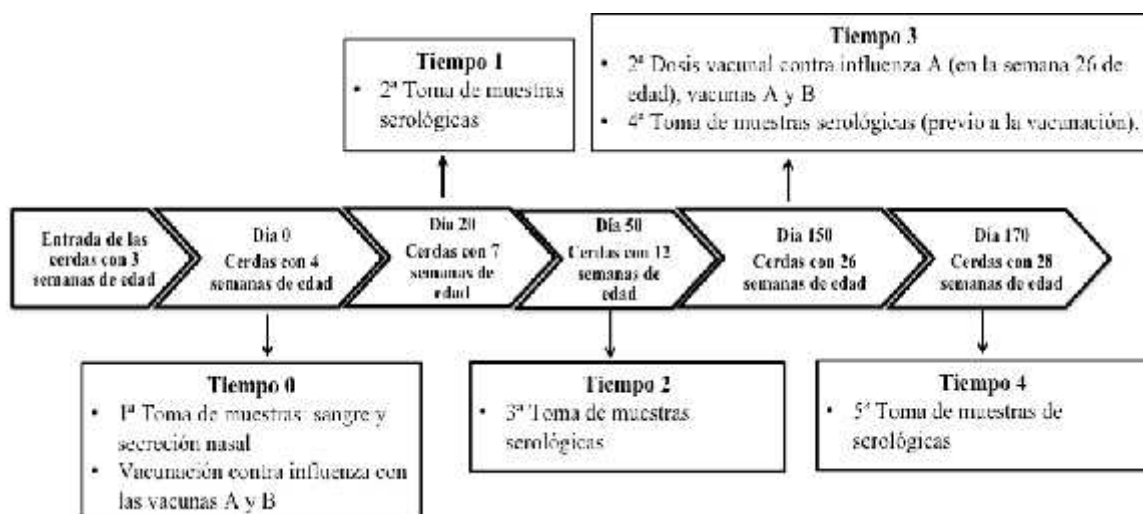


Figura 1. Esquema de vacunación y recolección de muestras serológicas y exudado nasal de los grupos inmunizados con las vacunas A y B.

2.3. Obtención y procesamiento de muestras biológicas.

Se llevó a cabo la recolección de muestras de sangre por punción de la vena yugular externa derecha. Todas las muestras de sangre se dejaron reposar por 24 horas a 4°C para separar por coagulación el paquete globular. El plasma se obtuvo por decantación, se obtuvieron 2 alícuotas de cada suero y se almacenaron a -20 °C hasta su uso posterior.

Con la finalidad de determinar la presencia de virus de influenza circulante en los animales de la granja, durante los días previos al inicio del estudio se realizó la necropsia de un animal con signos clínicos de enfermedad del cual se obtuvo tejido pulmonar que fue transportado en bolsas estériles de polietileno en una red de frío a 4 °C. Del mismo modo se colectaron exudados nasales y muestras de sangre de animales con síntomas respiratorios. Todas las muestras fueron almacenadas a - 70 °C hasta su uso posterior (Prickett, et al., 2010).

Para la toma de muestras de exudados nasales se utilizaron hisopos estériles que inmediatamente después de la toma de muestra fueron colocados en medio de transporte

viral que contenía medio D-MEM suplementado con 1 ml de antibiótico- antimicótico 100x (penicilina/estreptomicina 50 000 U/50 000 µg) y albúmina bovina al 7.5 %. Por otro lado, las muestras de suero fueron tomadas de las mismas cerdas por punción de la vena yugular como se describió anteriormente. Las muestras fueron transportadas en red de frío y almacenadas a -80°C hasta su uso posterior.

2.4 Antígeno viral

Para determinar la seroconversión y la presencia de anticuerpos neutralizantes en las muestras de suero se utilizaron como antígenos virales las cepas del virus de influenza porcina de los subtipos AH1N1, AH1N2 y AH3N2 amablemente proporcionadas por la empresa IDISA

El título viral fue amplificado en embriones de pollo de 10 días de edad. Brevemente, se inocularon 100 µl del stock de virus por cada embrión de pollo (por vía alantoidea) y se incubaron durante 72 horas a 37 °C. Posteriormente, se provocó la muerte de los embriones con un choque térmico a 4°C. Se tomó el líquido alantoideo y se centrifugó a 2600 rpm/10 minutos. Previo a ser alicuotados y almacenados a – 70 °C se determinó el título viral utilizando un ensayo de hemaglutinación (OMS, 2009).

2.5. Seroconversión contra el virus de influenza A porcina por ensayos de inhibición de la hemaglutinación (IHA)

Para determinar la seroconversión post-vacunación se realizó un ensayo de Inhibición de la hemaglutinación (WHO, 2011). La seroconversión se determinó por el incremento en el título de anticuerpos de hasta cuatro veces entre las muestras pre y post-vacunación.

2.5.1. Tratamiento de los sueros

Previo a realizar del ensayo se llevó a cabo el tratamiento de los sueros para eliminar inhibidores inespecíficos hemaglutinantes. Un volumen de 100 µl de suero se incubó con cuatro volúmenes de buffer de borato salino pH 9 y cinco volúmenes de kaolin al 25% para obtener una dilución final del suero de 1:10. Se obtuvo el sobrenadante en un tubo colector y posteriormente se le añadió a cada dilución de los sueros glóbulos rojos de pavo para la absorción de aglutininas. Finalmente el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su uso posterior (Noah, et al., 2009; Vincent et al., 2010).

2. 5. 2 Ensayos de IHA

Se realizaron diluciones seriadas (1:10 hasta 1:1280) por duplicado de cada uno de los sueros tratados en PBS (pH 7.2), posteriormente se añadieron 25 µl de antígeno viral a una concentración de 4 UHA/25µl, las mezclas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió 50 µl de una suspensión de glóbulos rojos de pavo al 1% en PBS a todos los pozos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El título de anticuerpos se determinó como la última dilución del suero que inhiba la hemaglutinación.

2. 6. Determinación de la presencia de anticuerpos neutralizantes mediante el ensayo de microneutralización

Con la finalidad de determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes se llevaron a cabo ensayos de microneutralización. El ensayo de microneutralización se divide en 3 partes: 1) Determinación de la dosis infecciosa o TCID₅₀; 2) ensayo de neutralización; y 3) un ensayo de ELISA) (Knossow, et al., 2002; Stephenson, et al., 2007).

2.6.1 Determinación de la dosis infecciosa viral (TCID₅₀)

Se realizó la primera dilución del virus de 1:100 en PBS. En una placa de 96 pozos se llevaron a cabo diluciones seriadas del virus, partiendo de 146 µl de la primera dilución por cuadruplicado para cada virus. Se hicieron diluciones logarítmicas en base 10 (diluciones $1/2 \text{ Log}_{10}$) del virus, transfiriendo 46 µl de la primera dilución en 100 µl de medio D-MEM suplementado con TPCK-tripsina (concentración de 0.5 µg/ml de medio) por pozo. La placa fue incubada por 72 horas a 37 °C. Una vez concluido el periodo de incubación se retiró el medio y las células fueron teñidas con una solución de cristal violeta al 0.4 % en metanol frío. El cálculo del TCID₅₀ se realizó por el método Reed and Muench (GISN-WHO, 2011). Una vez determinados los títulos virales para la infección, se procedió a realizar la microneutralización viral.

2.6.2 Microneutralización viral

Para llevar a cabo este ensayo de microneutralización se inactivaron los sueros a 56 °C por 30 minutos. Se realizaron las diluciones seriadas de los sueros partiendo de 10 µl de cada suero inactivado por duplicado. Las diluciones se realizaron en una placa de 96 pozos con 50 µl de PBS y 40 µl D-MEM (suplementado con antibiótico y HEPES) por cada pozo. Posteriormente se añadió 50 µl de virus a una concentración constante de 100 TCID₅₀ ($2 \times 10^2 \text{ TCID}_{50}/100 \text{ µl}$) diluido en PBS suplementado con tripsina TPCK (0.5 µg/µl de medio). La placa se incubó por 2 horas a 37 °C y 5% de CO₂ (Knossow, et al., 2002; Stephenson, et al, 2007).

Pasado el tiempo de incubación se añadió 100 µl de células MDCK (a una densidad de 1.5×10^4 de células/pozo en medio D-MEM suplementado). Se dejó incubar a 37 °C en CO₂ al 5% durante toda la noche. Se removió el medio y se lavó la placa 3 veces con PBS. Posteriormente se adicionó 100 µl/pozo de fijador (acetona a -20°C), se cubrió la placa y se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Se removió el fijador y se dejó secar a temperatura ambiente (Knossow, et al., 2002). Una vez realizado el procedimiento antes descrito, se procedió con la cuantificación de manera inversa de los anticuerpos

neutralizantes presentes en el suero de los animales por medio de un ELISA (CDC, 2013; Vincent et al., 2010).

2.6.3 Cuantificación de anticuerpos neutralizantes a partir del inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)

Las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween-20 al 0.05 %. Posteriormente, se diluyó el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal anti-influenza A/NP) en PBS suplementado con BSA al 1% y Tween-20 al 0.1%, a una concentración de 1:4000. Se adicionó la dilución a cada pozo de la microplaca y se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas en cuatro tiempos con PBS/Tween-20 al 0.05% y se añadió el anticuerpo secundario (anti IgG ratón marcado con Horse Radish Peroxidase HRP) diluido 1:2000 en PBS/BSA al 1%/Tween-20 al 0.1% a cada pozo de la placa. Se cubrió nuevamente la placa y se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas 6 veces con PBS/Tween-20 al 0.05 % y posteriormente se adicionó el sustrato 0.01 mg de OPD en 100 µl de buffer de citrato y H₂O₂ por pozo y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez pasado el tiempo de incubación se inactivó la reacción con una solución de ácido sulfúrico al 3% en agua destilada. Se colocaron las placas en un lector de ELISA y se determinó la densidad óptica (OD) a 490 nm (Stephenson, et al, 2007; Stephenson, et al, 2009).

Para determinar el 50% de los títulos de anticuerpos neutralizantes de cada suero se llevó la siguiente ecuación:

$$X = ((PCV - PCC) / 2) + PCC.$$

Donde PCV es el promedio de los resultados de la densidad óptica del control viral; y PCC es el promedio de la densidad óptica del control celular.

De esta manera se determinó el valor de X correspondiente a la infección del 50 % de células MDCK. Por lo tanto todos los valores iguales o inferiores al valor de X fueron considerados como positivos a neutralización viral.

2.7 Identificación del virus de influenza presente en los animales de la granja

Con la finalidad de detectar la circulación de virus de influenza en los animales de la granja se llevaron a cabo ensayos de aislamiento viral a partir de muestras biológicas (tejido de pulmón, exudado nasal, muestras de suero) de animales con signos de enfermedad respiratoria y problemas de aborto, en células de riñón canino Madin-Darby (MDCK). Así mismo se determinó la presencia del virus por RT-PCR en punto final y tiempo real a partir de las muestras biológicas antes mencionadas.

2.7.1 Aislamiento viral

Con la finalidad de aislar los virus presentes en las muestras biológicas se infectaron cultivos celulares. Las células MDCK fueron sembradas en placas de 6 pozos a una densidad celular de 2.5×10^6 células/pozo. Una vez confluyente la monocapa celular, previo a la infección, las células se lavaron dos veces con solución salina de fosfatos (PBS pH 7.2). Las células fueron infectadas con 100 μ l de muestra clínica y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente; posteriormente, se desechó el inóculo viral y se adicionó medio D-MEM suplementado con tripsina-TPCK a una concentración final de 2 μ g/ml. Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ hasta observar efecto citopático. Los virus fueron cosechados, alicuotados y almacenados a -70 °C hasta su uso.

2.7.2 Extracción de RNA viral y síntesis de cDNA

Así mismo se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR en punto final y en tiempo real para identificar el virus de influenza circulante entre los animales de la granja. Previo a realizar la RT-PCR, se realizó la extracción directamente de las muestras biológicas de suero, pulmón y exudados nasales, así como de los virus cosechados de cultivo celular. Se utilizó el estuche comercial de extracción RNAeasy de la marca Qiagen. Brevemente, para inactivar la muestra se añadió a un volumen de 140 μ l de muestra (suero/ exudado nasal/

aislamiento viral/ macerado de tejido animal) con base en lo recomendado el por manual del fabricante, las muestras fueron conservadas a -70°C hasta su uso posterior.

2.7.3 Tipificación por RT-PCR

Para a tipificar el virus de influenza en las muestras biológicas y/o aislamientos virales se realizó una RT-PCR en punto final en la cual se utilizaron los cebadores sentido Bm-M-1 y antisentido Bm-M-1027R para amplificar el gen completo M de 1027 pb. Así mismo, se utilizaron los cebadores sentido Bm-HA1 y antisentido Bm-NS890 los cuales amplifican el gen completo de HA de 1778 pb (Cuadro 1).

A partir del RNA previamente extraído de las muestras se llevó cabo la síntesis de cDNA. El primer paso en la síntesis de cDNA consistió en la mezcla de reacción de los oligonucleótidos sentido MBtuni-12m (AGCRAAAGCAGG) y antisentido MBtuni-13 (ACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG) como se describe en el cuadro 1, siguiendo lo descrito por Chan Ho, et. al (2006). Posteriormente se realizó la PCR con los oligonucleótidos del gen M y oligonucleótidos del gen HA, siguiendo las condiciones del manual de la enzima *Super-Script III RT/afide*, las recomendaciones de la OMS (2009) y las condiciones establecidas por Lee, *et al.* (2013). Los productos de RT-PCR en punto final se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con Siber-Safe.

Para confirmar los resultados obtenidos de la RT-PCR en punto final, se realizó una PCR en tiempo real utilizando cebadores que amplifican segmentos de los genes M, NP y HA. Cabe mencionar que el uso de estos cebadores permiten identificar la presencia del virus de influenza A (gen M), la correspondencia con virus de influenza de linaje americano clásico (gen NP), y virus de origen pandémico humano (gen HA), como se describe en el manual de la OMS (GISN-OMS, 2011).

Para la amplificación de los segmentos se utilizaron los oligonucleótidos InfA-F y InfA-R para un fragmento del 100 pb de gen M 100 pb; Pdm-InfA-F y Pdm-InfA-R, para un fragmento de 120 pares de bases del gen NP; Pdm-H1-F y Pdm-H1-R, para el gen completo de 1778 pb de HA (cuadro 1). Las condiciones de amplificación se realizaron con

base en lo reportado por Lee, et al., (2013). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con el equipo OneStep-Plus (Applied Biosystems).

Cuadro 1. Secuencias de oligonucleótidos y sondas utilizadas para amplificar genes del virus de influenza A (tomado del manual de la OMS, 2015).

Tipo de reacción	Gen	Primers Sentido y antisentido	Secuencias	Tamaño del fragmento en pares de bases (pb)
PCR punto final	M	Bm-M-1F	5' TATTCGCAGGGAGCAAAAGCAGG 3'	1027
		Bm-M-1027R	5' ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAA 3	
	HA	Bm-HA1F	5' TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG 3	1778
		Bm-NS-890R	5' ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT 3	
PCR tiempo real	M	InfA-F	5' GACCRATCCTGTCACCTCTGAC 3	100
		InfA-R	5' AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA 3	
		<u>Sonda</u>	<u>5' TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG 3</u>	
	NP	Bm-NP-1F	5' TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGG 3	100
		Bm-NP-1565R	5' ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAA 3	
		<u>Sonda</u>	<u>5' TGAATGGGTCTATCCCGACCAGTGAGT AC 3</u>	
	HA	Pdm-H1-F	5' GTGCTATAAACACCAGCCTCCCAT 3	100
		Pdm-H1-F	5' AGACGGGAYATTCTCAATCCTG 3	
		<u>Sonda</u>	<u>5' ATACATCCGATCACM ATT GGA AAA TGT CC 3</u>	

Oligonucleotidos sentido (F), antisentido (R) y sondas para la amplificación de los genes M, NP y HA en RT-PCR.

Para la amplificación del gen HA se utilizó el oligonucleótido NS (que se alinea para amplificar segmentos de la proteína no estructural), ya que contiene secuencias idénticas que se alinean a la secuencia antisentido del gen HA.

2.8 Análisis estadístico

Mediante el análisis de varianza de datos de distribución normal, se llevó a cabo la comparación estadística de los títulos de anticuerpos presentes en suero antes y después de llevar a cabo la vacunación de los animales. Por medio de la prueba t-student y comparación de varianzas, se determinó la significancia de las medias, +/- las desviación estándar, entre los títulos de anticuerpos entre los tiempos post-vacunación y se determinaron los alcances mínimo y máximo en los títulos de anticuerpos de cada vacuna a partir de los resultados obtenidos por el ensayo de inhibición de la hemaglutinación. Para el cálculo de los valores se utilizó el programa estadístico XLSTAT en Excel. Con un nivel de confianza del 95%, los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos (Vincent et al., 2010).

3. RESULTADOS

3.1 Seroconversión a partir de la aplicación de vacunas en cerdas de remplazo por medio de la técnica de Inhibición de la hemaglutinación

Para determinar si se indujo seroconversión a partir de la vacunación, se consideró que las muestras de suero deberían de mostrar un incremento en el título de anticuerpos a partir de cuatro veces respecto al título antes de la vacunación. Al mismo tiempo para establecer seropositividad se tomó como punto de corte un título de IHA de 1:80 para ambos subtipos H1N1 y H3N2. El número de animales muestreados a partir de la vacunación disminuyó debido a causas externas al proyecto, ya que 6 animales del grupo A y 8 animales del grupo B presentaron retraso en crecimiento y peso, por lo cual fueron trasladados a otras áreas o sacrificados por disposición del dueño de la granja porcícola.

Virus de influenza AH1N1. En general, para el grupo de animales inmunizados con la vacuna A, los resultados del análisis de las muestras de suero indicaron seroconversión a los 20 días post-vacunación (T1) solo en el 4 % de los animales, con títulos de IHA de 0 hasta 1:80; este porcentaje incrementó hasta el 42 % a los 50 días post-vacunación, con incrementos en los títulos de IHA de 0 hasta 1:640 (Cuadro 2). Para este grupo de animales se detectó una seropositividad general del 74% a los 50 días post-vacunación contra el subtipo H1N1 cuando se aplicó la primera dosis de vacuna.

Interesantemente, la seropositividad disminuyó al 23 % a los 150 días de aplicada la primera dosis, con una disminución en el título máximo de anticuerpos detectados a 1:320. Sin embargo, como resultado de la aplicación de la segunda dosis, la seropositividad alcanzó un 95 %, que correspondió al T4, con títulos máximos de anticuerpos de 1:1280. La seropositividad fue altamente significativa (vacuna A H1: $p = < 0.0001$) en los sueros de animales inmunizados con la vacuna A (Cuadro 3). Estos resultados indican que para el caso particular del subtipo de influenza AH1N1, es necesario aplicar una segunda inmunización de la vacuna A en los animales para lograr niveles de seropositividad de hasta un 95 %.

De manera contrastante, en los animales a los cuáles se les aplicó la vacuna B no se detectó seroconversión en ninguno de los tiempos post-vacunación; y debido a que los títulos de IHA detectados en el tiempo 4 fueron únicamente de 1:10 a 1:40 no se consideró seropositividad (Cuadro 3).

Cuadro 2. Número de animales vacunados seropositivos contra virus de influenza A porcina

Aplicación	Tiempos	Vacuna A		Vacuna B
		H1N1	H3N2	H3N2
Primera dosis	T0	0/50	24/50	26/50
	T1	2/50	3/50	0/48
	T2	37/50	0/50	0/48
	T3	10/44	1/44	1/48
Segunda dosis	T4	42/44	2/44	18/42

T0=tiempo cero (antes de vacunar); T1, T2, T3 y T4= 20, 50, 150 y 170 días post-vacunación, respectivamente. Número de animales seropositivos con títulos de anticuerpos en IHA $\geq 1:80$ /Número de animales muestreados.

Virus de Influenza H3N2. De acuerdo a los resultados y a diferencia del análisis con el virus AH1N1, para ambos grupos de animales se detectó una alta seropositividad contra el virus AH3N2 en los sueros colectados en el T0, es decir antes de la aplicación de la primera dosis de vacuna. En ambos grupos de cerdas se determinaron títulos de anticuerpos cerca del 50 % de los animales (Cuadro 2).

La presencia de estos anticuerpos desapareció totalmente a los 50 días post-vacunación. Es así, que en ningún grupo de cerdas se logró detectar seroconversión post-vacunación, ni seropositividad. Sin embargo, únicamente cuando se aplicó la segunda dosis de vacuna y hasta los 170 días post-vacunación se logró detectar seroconversión en el 42% de los animales inmunizados con la vacuna B, con títulos de IHA a partir de 1:80 y hasta 1:640. Por el contrario, para la vacuna A solo el 5% de los animales seroconvirtió después de la segunda dosis de la vacuna con títulos de 1:80 (Cuadro 3).

El análisis comparativo de medias de las muestras recolectadas, con respecto a los valores observados en el cuadro 3, se determinó que el valor $p < 0.0001$ computado es menor que el nivel de significación $\alpha = 0.05$, lo que nos indican diferencias significativas entre los tiempos post-vacunación entre cada vacuna (A y B).

Cuadro 3. Análisis de varianza comparativo en los títulos de anticuerpos antes y después de la inmunización de las cerdas con la vacuna A y B, contra el antígeno H1N1 y H3N2 del virus de influenza A porcina.

		Vacuna A					Vacuna B				
	Variable	Observaciones	Mín	Máx	*Media	* σ	Observaciones	Mínimo	Máximo	*Media	* σ
H1N1	T 0	50	0	0	0	0	50	0	0	0	0
	T 1	50	0	80	7	16	48	0	0	0	0
	T 2	50	0	640	341	275	48	0	10	0	1
	T 3	44	0	320	48	64	42	0	0	0	0
	T 4	44	0	1280	400	341	42	0	80	6	15
H3N2	T 0	50	10	320	75	68	50	20	160	55	37
	T 1	50	10	80	27	16	48	0	20	7	7
	T 2	50	0	20	11	6	48	0	40	7	10
	T 3	44	0	80	10	14	42	0	80	5	13
	T 4	44	0	80	20	15	42	0	640	142	206

T0=tiempo cero (antes de vacunar); T1, T2, T3 y T4= 20, 50, 150 y 170 días post-vacunación; observaciones = corresponde al número de animales muestreados; Mín, corresponde a los valores mínimos observados en los títulos de IHA; Máx, correspondiente a los valores máximos observados en IHA; Media = es la media estadística de observaciones en cada grupo de animales para los tiempos de vacunación; σ = es la desviación estándar de cada grupo en los diferentes tiempos de vacunación. * Datos calculados para estimar el valor de P.

3.2 Eficacia de las vacunas en la generación de anticuerpos neutralizantes

Con la finalidad de determinar la eficacia de neutralización de los anticuerpos detectados en suero, se llevaron a cabo ensayos de microneutralización. A partir de los resultados de IHA, del grupo de animales de la vacuna A se seleccionaron aleatoriamente diez sueros del tiempo T2 y diez sueros del tiempo T4 (50 y 170 días post-vacunación, respectivamente) con título de anticuerpos $\geq 1:40$ hasta $1:640$, así mismo se incluyó el suero seropositivo detectado en el tiempo 1 (20 días post-vacunación) con título de $1:80$. El título de anticuerpos neutralizantes se estableció como la última dilución donde se observó neutralización del virus. Se consideró como positivos aquellos sueros donde el valor de OD que determina la presencia de la proteína viral NP, fue menor al valor estimado entre la diferencia del control viral y el control celular; lo que sugiere la presencia de anticuerpos capaces de evitar la replicación viral.

Los resultados observados en el ensayo de microneutralización indican la presencia de anticuerpos neutralizantes en los sueros de animales inmunizados con la vacuna A contra el virus H1N1 porcino. Se determinó que el título de anticuerpos neutralizantes fue de $1:40$ hasta $1:640$ en el 80 % de los sueros analizados (Cuadro 4); así mismo, se pudo observar que en algunos de los sueros, los títulos de anticuerpos detectados por IHA corresponden a los mismos títulos de anticuerpos neutralizantes. Lo anterior sólo se detectó para los sueros a los 170 días post-vacunación, así como en el suero con título $1:80$ del T1 (20 días post-vacunación), ya que los anticuerpos detectados por IHA a los 50 días post-vacunación (T2) no indican ser anticuerpos neutralizantes. Debido a los resultados negativos que se obtuvieron del ensayo de IHA para el grupo de animales de la vacuna B con respecto al virus H1N1 no se determinó la presencia de anticuerpos neutralizantes en este grupo de estudio.

Para descartar si los títulos de anticuerpos que se detectaron por IHA en el T0 correspondían a anticuerpos neutralizantes contra el antígeno H3N2 se seleccionaron de manera aleatoria diez sueros de cerdas de la vacuna A y diez sueros de cerdas de la vacuna B (Cuadro 4). Los resultados mostraron que los anticuerpos detectados en el T0 (previo a la vacunación) para ambos grupos de estudio, no son capaces de neutralizar al virus, con

valores de OD ≥ 0.8 correspondiente al valor del control viral. Por lo tanto, estos resultados indican que los títulos de anticuerpos detectados en las cerdas previo a la vacunación posiblemente sean de origen materno. Por el contrario, al analizar los sueros del T4 (170 días post-vacunación), después de la segunda aplicación de la dosis de vacuna, se observó neutralización viral aunque los títulos de anticuerpos neutralizantes para este subtipo de virus fueron únicamente de 1:10 en el 70% de los sueros analizados (Cuadro 4).

Cuadro 4. Título de anticuerpos neutralizantes con las vacuna A y B contra el virus de Influenza A porcina detectados en el tiempo 4 (170 días post-vacunación).

H1N1				H3N2			
Vacuna	Sueros	Título IHA	Título AN	Vacuna	Sueros	Título IHA	Título AN
A	1	160	160	A	1	80	10
	2	160	40		2	80	10
	3	160	0	B	3	80	0
	4	640	0		4	320	0
	5	160	40		5	40	10
	6	160	640		6	320	10
	7	80	320		7	640	0
	8	320	80		8	160	10
	9	160	80		9	320	10
	10	80*	320*		10	160	10

*Sueros correspondientes al tiempo T1 (20 días post-vacunación); IHA= Inhibición de la hemaglutinación; AN= Anticuerpos neutralizantes.

3. 3 Tipificación del virus de influenza por RT-PCR punto final

Con la finalidad de identificar el tipo de virus de influenza circulante en la población animal del área de estudio, se realizó la toma de muestras biológicas de animales que presentaron signos y síntomas respiratorios. La identificación se llevó a cabo en una biopsia de pulmón post-mortem la cual fue dividida en tres secciones, así como muestras de suero y exudado nasal de un total de 7 animales que presentaron signos de enfermedad respiratoria y problemas de aborto.

Como primer tamizaje se amplificó por RT-PCR un producto de PCR correspondiente al gen M en las tres muestras de tejido pulmonar y en tres muestras de sueros de cerdas con problemas de abortos (Fig. 2). Del mismo modo se observan en los carriles 5 y 7, de la figura 2, bandas de 2,300 pb que corresponderían al gen PB2 que sugieren la presencia de bases conservadas entre los genes del virus de influenza A. Posteriormente, se obtuvo un producto de PCR correspondiente al gen de la HA en los ocho exudados nasales, una muestra de pulmón y en muestras de suero. Estos resultados indicaron la presencia del virus de influenza A en la granja.

Como resultado de lo anterior se realizó la inoculación de las muestras biológicas en cultivo celular con la finalidad de aislar al virus presente y poder llevar a cabo una mejor caracterización del mismo. Debido a que no se obtuvieron resultados positivos de hemaglutinación en ninguna de las cosechas, se realizó la determinación por RT-PCR, en donde se logró amplificar un producto de PCR correspondiente al gen HA (Fig. 2). Sin embargo, después de numerosos intentos en cultivo celular no se logró aislar al virus de influenza.



Figura 2. Amplificación por RT-PCR en punto final de los gen M y HA del virus de influenza A. Bandas correspondientes al el gen M (1027 pb) de 3 secciones de pulmón (carril 1-3) de un cerdo de tres semanas de edad y 5 muestras de suero (carril 4 – 8) de cerdas mayores de 26 semanas de edad; bandas correspondientes al amplificado del gen HA (1778 pb) a partir de muestras de pulmón pos-mortem de cerdo (carril 9); muestras de exudado nasal (carriles 11-19) de 9 cerdas y muestra de suero (carril 20) de una cerda. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb y el carril 10 corresponde al control positivo.

3.4. Subtipificación del virus de influenza por RT-PCR en tiempo real

Una vez identificada la presencia del virus de influenza A en la granja, se procedió con la subtipificación por RT-PCR en tiempo real para determinar el subtipo del virus. Sorprendentemente, los resultados del ensayo no solo confirmaron los resultados del RT-PCR en punto final, sino que identificaron que el virus presente en los animales de la granja correspondía al virus de influenza A (H1N1) pdm09 de humanos (Fig. 3). Se confirmó el tipo de virus influenza A con la detección del gen M, así como el origen porcino americano clásico con la detección del gen NP, y finalmente la presencia del virus pandémico humano con la amplificación del gen HA. Estos resultados se obtuvieron del análisis de diferentes muestras como fueron las cosechas obtenidas de cultivo celular de exudados nasales y sueros (Fig. 3A, 3B), o directamente de las muestras clínicas en las cuáles se amplificó específicamente el gen HA del virus A(H1N1)pdm09 humano (Fig. 3C).

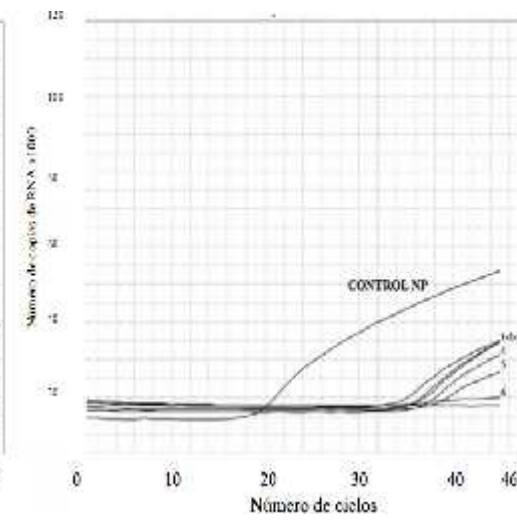
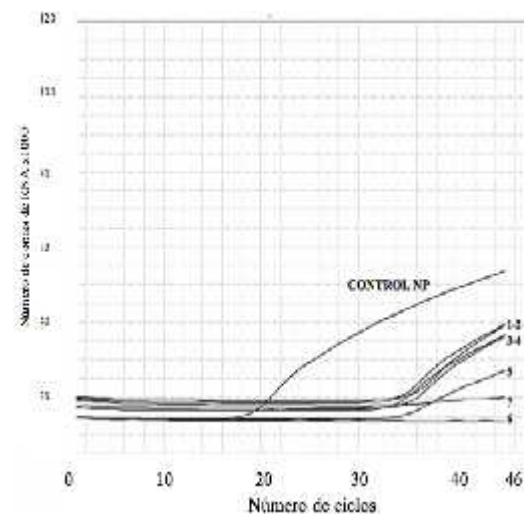
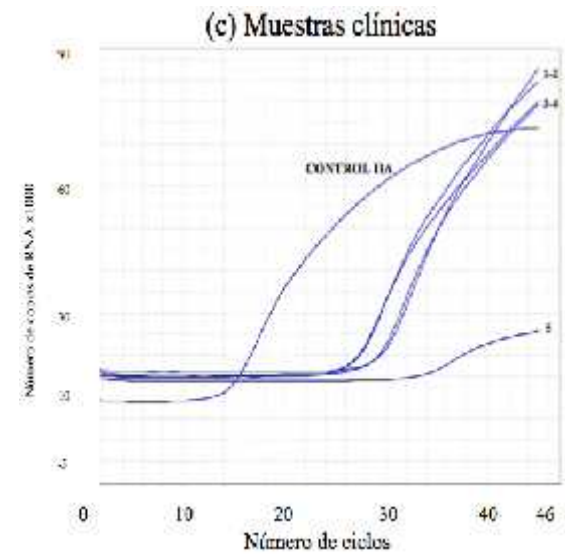
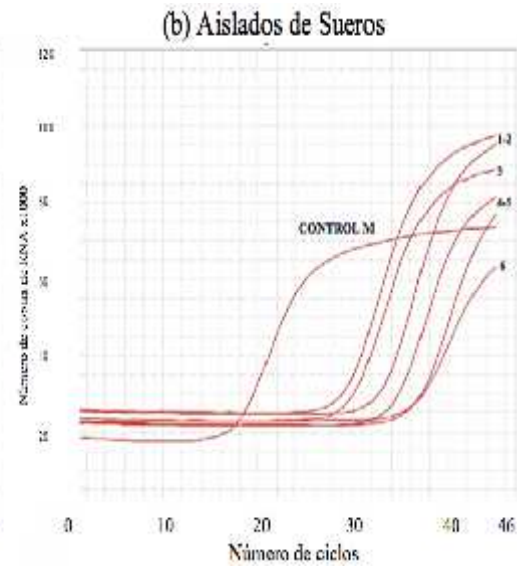
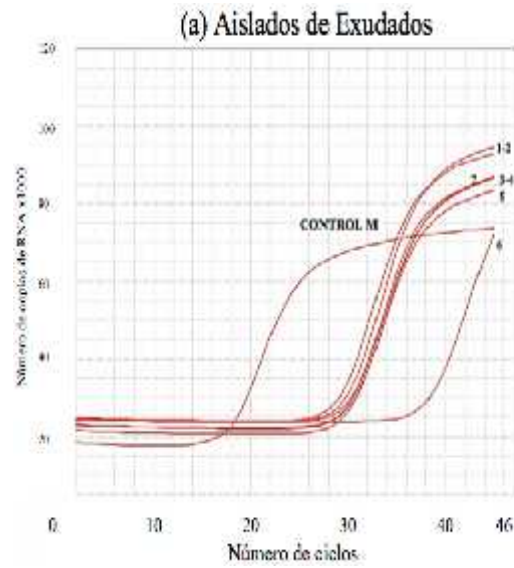


Figura 3. Amplificación por RT-PCR en tiempo real de los genes M y NP de aislados virales en células MDCK y del gen HA de muestras clínicas. (a) Figura de curvas de amplificación de los genes M (líneas rojas) y NP (líneas negras), donde los números del 1-6 corresponden a muestras de exudado de 6 cerdas con problemas de aborto y el número 7 corresponde a la muestra de tejido pulmonar. (b) Figura de curvas de amplificación de los genes M (líneas rojas) y NP (líneas negras), de muestras de suero de 6 cerdas con problemas de aborto. (c) Figura de curvas de amplificación del gen HA, donde los números del 1-3 corresponden a muestras de exudado nasal de cerdas con problemas de aborto; y los números 4 y 5 corresponde al aislado viral en células MDCK y muestra clínica de pulmón de cerdo, respectivamente. Los controles positivos de los amplificadores están representados en cada figura. El eje *X* corresponde a los ciclos de amplificación, y el eje *Y* a los valores de Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU) transformado por default en Δ RN.

4. DISCUSIÓN

El uso de vacunas con virus inactivados, que contengan cepas de origen diferente a la cepa circulante, podría afectar la eficiencia de las vacunas en la producción de anticuerpos capaces de reconocer y generar una respuesta inmune eficaz frente a infecciones causadas por el virus de influenza, siendo un factor limitante en la economía de los productores.

En este estudio se evaluó la eficacia de dos vacunas, A y B, en la inducción de anticuerpos neutralizantes contra cepas del virus de influenza A H1N1 y A H3N2. En general, los resultados demostraron diferencia significativa entre los títulos de anticuerpos antes y después de la aplicación de las vacunas. Del mismo modo se observó que se requiere de una segunda dosis para obtener una protección mayor al 90 % entre la población de animales. Sin embargo los títulos de anticuerpos detectados antes de la aplicación de las vacunas, contra el virus H3N2, decrecieron o desaparecieron después de las 26 semanas de edad, lo que disminuyó la eficacia de las vacunas en las primeras semanas de la aplicación, siendo mayor el título de anticuerpos en la semana 28 de edad (Sandbulte, et al., 2014).

Debido a la alta variabilidad en el virus de influenza y la poca eficiencia de los esquemas tradicionales de vacunación, en la actualidad en los sistemas de producción regionales se está manejando la vacunación con virus autógenos. Es así que para evaluar de manera adecuada la eficacia de la vacuna sería recomendado utilizar esas mismas cepas

virales en las pruebas de laboratorio y determinar la eficacia de la respuesta inmune frente a virus homólogos.

De acuerdo a la información proporcionada por los proveedores, la vacuna A está constituida por cepas aisladas en el estado de Yucatán y la vacuna B por cepas nacionales. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos, en donde el 42 % de los animales a los cuáles se les aplicó la vacuna A mostraron seroconversión para el subtipo H1N1, mientras que el grupo de animales de la vacuna B no mostró seroconversión contra el mismo subtipo de virus, lo que sugiere ausencia de protección contra virus homólogos.

La recombinación homóloga da lugar a la evolución entre los virus de influenza A, generando cambios en el potencial de virulencia y favoreciendo el tropismo viral. La homología entre los subtipos presentes en las vacunas y los subtipos del virus circulante entre las poblaciones de cerdos, favorece la eficacia en la protección generada por las vacunas contra el virus de influenza A porcino, debido a las similitudes entre las proteínas de los subtipos virales (Cheng-Qiang, et al., 2008).

Los anticuerpos frente al virus de influenza porcina son detectables en suero a partir de los siete días posinfección, aunque el momento óptimo de detección es a las 2-3 semanas después de la exposición con virus de influenza, que es el momento en el que se produce el pico en los títulos de anticuerpos. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que los anticuerpos detectados al T0 post-vacunación pudieran deberse a contacto con virus silvestre circulante entre los animales de la granja (Larsen et al., 2000).

Sin embargo para el virus H3N2 la eficacia no fue la esperada, ya que se detectaron títulos de anticuerpos contra este subtipo desde el T0 en ambos grupos de animales, afectando significativamente la eficacia de la vacuna. Estos anticuerpos pudieran ser de origen materno ya que los animales de estudio fueron muestreados por primera vez cuando sólo tenían 4 semanas de edad. Estudios previos sugieren que los niveles de inmunidad pasiva descienden entre las 6 y 7 semanas de edad, e incluso se ha demostrado la duración de anticuerpos maternos en los lechones de hasta 3 o 4 meses, dependiendo de los títulos de anticuerpos presentes en la madre durante el periodo de parto y lactancia (Loeffen, et al., 2009).

En este estudio se observó que los anticuerpos presentes antes de vacunar disminuyeron a valores totalmente negativos después de los 4 meses de edad. Y sólo después de la eliminación de la inmunidad materna se detectaron anticuerpos generados por la vacuna al observar seroconversión después de los 6 meses de edad. También observamos que esta seroconversión sólo se detectó en los sueros de los animales inmunizados con la vacuna B.

Estos resultados sugieren que en los animales inmunizados con la vacuna A la respuesta de anticuerpos estuvo dirigida principalmente al virus H1N1. Desafortunadamente, la poca información disponible acerca de la cepas específicas contenidas en cada una de las vacunas, así como de la concentración de cada uno de los virus, limitan el análisis de los resultados.

Estudios previos han reportado evidencia de interferencia de anticuerpos maternos presentes en lechones en la protección contra infección contra cepas del virus de influenza A H3N2 porcino, en cerdos inmunizados con vacunas de virus inactivados (Kitikoon, et al., 2006; Sandbulte, et al., 2014). Por lo tanto, los resultados obtenidos de este estudio sugieren que de presentarse un brote de influenza AH3N2 en la granja de cerdos, ninguna de las vacunas probadas sería capaz de proteger a los animales de la infección de este virus. Los resultados sugieren que la presencia de inmunidad de origen materno puede afectar la eficacia de las vacunas.

Para evaluar la eficacia de los anticuerpos presentes antes y después de la vacunación se llevaron a cabo ensayos de microneutralización. Los resultados de este estudio mostraron que los anticuerpos de origen materno no son capaces de neutralizar la replicación *in-vitro* del virus.

Desde el punto de vista inmunológico, se ha observado que lechones con anticuerpos de origen materno, que han tenido contacto con agentes virales y han presentado signos de enfermedad respiratoria asociada con el virus de influenza pueden recuperarse y mantener niveles de anticuerpos hasta por seis meses. Sin embargo, los anticuerpos presentes en el calostro proveniente de las marranas no protegen a los lechones contra una infección por el virus de influenza (Sandbulte, et al., 2015).

El mecanismo de neutralización viral se lleva a cabo por la afinidad entre los epítopes de los anticuerpos y los antígenos de superficie presente en los virus, de tal manera que interfieran con la unión del virus a la célula hospedera (Knossow, et al., 2002).

Los resultados observados en la neutralización viral *in-vitro* de este trabajo, indican una respuesta inmune mediada por anticuerpos neutralizantes después de la segunda dosis de vacuna, para el virus de influenza AH1N1 porcina. Lo que sugiere un mayor tiempo y un incremento en el título en la generación de anticuerpos específicos contra cepas homólogas del virus. Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura en la protección mediada por anticuerpos neutralizantes que interfieren con la replicación viral disminuyendo el riesgo de infección (Ricklin, et al., 2016).

El título de anticuerpos presentes en el suero determinará la eficiencia de la respuesta inmune mediada por anticuerpos neutralizantes, ya que se ha reportado que la eficacia de los anticuerpos neutralizantes es directamente proporcional a los anticuerpos presentes en suero. De esta manera es necesario mayor número de anticuerpos dirigidos a los antígenos de superficie viral para generar una respuesta inmune eficiente (Ricklin, et al., 2016).

Larsen, et al., (2000), reportó la presencia de anticuerpos contra la HA del virus de influenza porcina en el tracto respiratorio de lechones de 4-5 días después de una infección con virus porcino y se detectó títulos de anticuerpos en suero después de 7 días. También se han detectado en sangre títulos de anticuerpos específicos que se mantienen durante toda la vida de lechones (Waffarn, et al., 2011). Una protección mediada por anticuerpos neutralizantes sugiere un mayor tiempo de exposición del sistema inmune frente al antígeno de superficie viral. Es por eso que una segunda exposición al virus generará una mayor cantidad de anticuerpos presentes en suero inducidos por células B previamente sensibilizadas que generen anticuerpos específicos para el antígeno (Ricklin, et al., 2016).

Los resultados observados en la RT-PCR sugieren la presencia de virus de influenza A H1N1 de origen pandémico humano, así como de virus de origen porcino clásico, a partir de muestras de exudado, suero y tejido pulmonar de cerdos de producción. Lo que confirma la amplia diversidad genética en el segmento HA relacionada con virus de influenza H1 y

H3 de origen porcino americano clásico y H1N1 de origen pandémico, reportado en estudios previos en poblaciones de cerdos de México y Chile (Nelson, et al., 2015).

Se reportó una cepa H1N1 en cerdos de Yucatán con segmentos de origen pandémico humano, virus pre-pandémico y derivados del triple rearreglante, lo que sugiere que la evolución de las cepas virales se observa con mayor frecuencia debido al movimiento constante de cerdos vivos entre regiones de América central, México y otros países del mundo (Mena, et al., 2016; Nelson, et al., 2015).

Se realizaron ensayos preliminares para la detección de una respuesta cruzada contra cepas de laboratorio del virus de influenza A H1N1 pandémico donde no se detectaron títulos de anticuerpos en IHA. Así mismo se llevaron a cabo aislamientos virales a partir de muestras de tejido animal y exudado nasal en embriones de pollo libres de patógenos de 10 días de edad y en cultivo celular. Sin embargo en los ensayos de hemaglutinación, así como RT-PCR no se detectó la presencia de partículas virales a partir de RNA extraído de los pases 0, 1, 2 y 3 en cultivo de células MDCK infectadas con muestras positivas y de material extraído de embriones infectados.

La presencia de dos linajes diferentes de virus de influenza en México que están relacionados con virus de América del Norte (H1N1 y H3 de origen clásico americano) también demuestra la importancia de la migración de cerdos canadienses a México dando lugar a la circulación de virus de origen americano clásico y pandémico humano entre las poblaciones de cerdos en granjas de producción. Las cerdas y los lechones destetados pueden ser reservorios para la circulación del virus de influenza (Loeffen, et al., 2009).

Estudios serológicos previos, realizados en granjas del Norte y Sur de la ciudad de México del 2000 al 2009, demostraron la prevalencia en títulos de anticuerpos contra los virus H1N1 pandémico en un 17.8%, H1N1 humano en un 1.3%, H3N2 en un 24.2% y H1N1 porcino en un 74%, de la población de cerdos de granjas (Saavedra, et al., 2012). Lo que sugiere la circulación de cepas recombinantes en granjas de producción de México. La serología detecta el nivel de anticuerpos frente a la exposición de los individuos al antígeno; sin embargo, los antígenos contenidos en las vacunas que actualmente se aplican, a las poblaciones de cerdos de producción, no incluyen cepas de origen humano ni de origen pandémico, lo que sugiere que los anticuerpos detectados son debido a la exposición

de los animales con virus silvestre que se encuentran circulando entre las granjas de cerdos (Loeffen, et al., 2009).

Así mismo Mena, et al., (2016) reportó 58 secuencias de virus de influenza A en cerdos de granjas de México, de las cuales 6 secuencias fueron identificadas en Yucatán con segmentos recombinantes de H3N2 humano, triple-rearreglante H3N2 porcino, H1N1 pandémico humano y H1N1 porcino Eurásico, con independencia evolutiva al introducirse por contacto de cerdos con humanos portadores de cepas recombinantes de origen porcino americano y eurásico. Esto confirma los resultados obtenidos en las muestras de cerdos con problemas respiratorios incluidos en este trabajo.

Lo reportado en la literatura previa y lo observado en este trabajo, sugiere la circulación de cepas de virus de origen pandémico y americano en granjas del estado de Yucatán. Una secuenciación de genes completos del RNA extraído de las muestras serológicas, de tejido y exudado de animales con afecciones respiratorias podrían generar información de las características génicas y evolutivas de las cepas circulantes en poblaciones de cerdos del estado, de tal manera que se podría evitar la aparición de cepas nuevas con carácter pandémico que pudieran estar más adaptadas a hospederos humanos y mejorar la transmisión entre las especies. Esta información permitirá conocer la importancia de la inclusión de cepas pandémicas en la generación de vacunas.

Los datos obtenidos a partir de este trabajo proporcionan información preliminar de la importancia en la detección de virus en poblaciones de cerdos de producción, por lo que se sugiere continuar con estudios que permitan la amplificación de virus silvestre para su identificación de tal manera que se considere evaluar la protección mediada por anticuerpos contra cepas de origen pandémico. Vincent, et al., (2010) reportó evidencia en la eficacia de vacunas con virus homólogos inactivados en la protección contra la infección y enfermedad de influenza A H1N1 pandémico en cerdos.

En resumen podemos concluir que el uso de vacunas con cepas homologas de virus inactivados, activan la respuesta inmune mediada por anticuerpos en la protección contra el virus de influenza A porcina comparada con las vacunas de virus antigénicamente diferentes al virus contenido en dicha vacuna.

Una estrategia que podría favorecer la eficacia de las vacunas en la inducción de anticuerpos contra el virus de influenza en poblaciones de cerdos, sería la aplicación de las vacunas después de la semana 26 de edad de los animales, que es cuando desaparece la inmunidad de origen materno o se podría implementar la aplicación de las vacunas en dos dosis, una en la semana 4 de edad y otra después de la semana 26 de edad de los animales.

5. HIGHLIGHTS

- Eficacia de vacunas de virus inactivados contra virus de influenza A H1N1 porcino
- Anticuerpos de origen materno interfieren en la eficacia de las vacunas
- Anticuerpos vacúnales son capaces de neutralizar a virus de influenza A homólogos
In-vitro
- Detección de una cepa H1N1 recombinante de origen pandémico humano y porcino clásico entre la población de cerdos.

REFERENCIAS DEL ARTICULO

- Bouvier N. M., Palese, P., 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26, Supplement 4(0):D49-D53.
- Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC)., 2013. National Center for immunization and respiratory diseases. Virology, Surveillance and diagnosis Branch, influenza division. 1-8
- Chan Ho-Chi., Lin L. K., Chan You., Wang Ya-Vi., Chi Yu-Tsai., Tu L.H., Shieh Happy-K., Liu Wu-Tse, 2006. Amplification of the entire genome of influenza A virus H1N1 and H3N2 subtypes by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. (136): 38-43.
- Cheng-Qiang He, Guan-Zhu Han, Dong Wang, Wei liu, Gou-rong Li, Xi-Ping Liu, Nai-Zheng Ding, 2008. Homologous recombination evidence in human and swine influenza A viruses. *Virology*. (380): 12-20.
- Corzo C., Culhane M., Dee S., Morrison R., Torremorell M., 2013. Airbone detection and quantification of swine infuenza A virus in air sample collected inside, outside and downwind from swine barns. *Plos One*. (8): 1-7.
- Crisci E., Mussa T., Fraile L., Montoya M. Review: Influenza virus in pigs, 2013. *Mol immunol*. (55): 200-215.
- Global Influenza Surveillance Network-World Health Organization (GISN-WHO), 2011. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Library Cataloguing-in-Publication Data. En: www.who.int/influenza/gisrs_laboratory.

- Gutierrez J., 2010. *Inmunología veterinaria 2ª Edicion. Manual moderno.* México, D.F. 89-139 pp.
- Han T., Marasco W., 2011. Structural basis of influenza virus neutralization. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1217:178-190.
- Hoffman E., Stech J., Guan Y., Webster G.R., Perez D.R., 2001. Universal Primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*. 146: 2275-2286.
- Karp G., 2009. *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos.* 5ª edición. Mc Graw-Hill. México D.F. pp. 693-718.
- Kitikoon P., Nilubol D., Erickson B.J., Janke B.H., Hoover T.C., Sornen S.A., Thacker E.L., 2006. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. *Vet immunol Immunopathol.* (112): 117-128.
- Knossow M., Gaudier, M., Douglas A., Barre`re B., Bizebard, T., Barbey C., Gigant, G., Skehel J., 2002. Mechanism of Neutralization of Influenza Virus Infectivity by Antibodies. *Virology* 302: 294–298.
- Larsen D. L., karasin A., Zuckermann F., Olsen C.W., 2000. Systemic and mucosal immune responses to H1N1 influenza virus infection in pigs. *Vet. microbiol.* 74: 117-131.
- Lee HK., Tang JW., Kong DH., Koay Es., 2013. Simplified large-Scale sanger genome sequencing for influenza A/H3N2 virus. *Plos One.* (8):1-8.
- Loeffen W.L, Hunneman, W.A., 2009. Population of dynamics of swine influenza virus in farrow to finish and specialized finishing herds in the Netherlands. *Vet. Microbiol.* (137): 45-50.

- López R. G., Montalvo M., Burgara A., Hernandez J., 2014. Serological and molecular prevalence of influenza virus of farms in northwestern México. *Vet Microbiol.* (172): 323-328.
- Mena, I., Nelson, M. I., Quezada-Monroy, F., Dutta, J., Cortes-Fernández, R., Lara-Puente, J. H., García-Sastre, A., 2016. Origins of the 2009 H1N1 influenza pandemic in swine in Mexico. *eLife*, 5, e16777. <http://doi.org/10.7554/eLife.16777>
- Nelson M., Culhane MR., Rovira A, Torremorell M., Guerrero P., Norambuena J., 2015. Novel Human- like influenza A viruses circulate in swine in México and Chile. *PLOS Currents*. (1):1-20.
- Noah D., Hill, H., Hines D., White E., Wolff M., 2009. Qualification of the Hemagglutination Inhibition Assay in Support of Pandemic Influenza Vaccine Licensure. *Clinical and vaccine immunology*. 16 (4): 558-566.
- Organización mundial de la salud (OMS)., 2009. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Library Cataloguing-in-Publication Data. En: <http://apps.who.int/iris/bitstream>.
- Organización mundial de la salud (OMS, RISK ASSESSMENT), 2014. Human infections with avian influenza A(H7N9) virus. En: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface
- Pacheco J., Lugo J., Canche L., Ruiz H., 2013. Estudios multidisciplinarios de las enfermedades zoonóticas y ETVs en Yucatán. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. pp. 203-205.
- Prickett J., Zimmerman J., 2010. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Anim Health Research Reviews*. (11): 207-216.

- Rah J., Hoffman D., Harder T., Berr M., 2015. Vaccines against influenza A viruses in poultry and swine: status and future developments. *Vaccine* 33: 2414-2424.
- Saavedra M.M., Carrera A. V., Castillo J. H., Rivera B. F., Rosa E. K., Pulido C. E., Carreon N. R., Haro T. M., Rosete P. D., Cabello C., Manjarrez M. E., Sanchez B., I., Ramirez H., M., 2013. Retrospective serology survey of influenza viruses in backyard from Mexico city. *Influenza Other Respir Viruses*, 5: 827-832.
- Sandbulte M., Platt R., Roth A., Henningson J., Gibson K., Rajao D., Loving C., Vincent A., 2014. Divergent immune responses and disease outcomes in piglets immunized with inactivated and attenuated H3N2 swine influenza vaccines in the presence of maternally-derived antibodies. *J. Virol.* (464-465): 45-54.
- Sandbulte M., Spickler A., Zaabel P., Roth J., 2015. Optimal use of vaccines for control of influenza A virus in swine. *Vaccines*. (3): 22-73.
- Secretaria de salud (SSA). Subsecretaria de prevencion y promocion de la salud. Direccion general de epidemiologia., 2014. Influenza documento tecnico. En: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx>
- Stephenson I., Das R., Wood J., Katz J., 2007. Comparison of neutralizing antibody assays for detection of antibody to influenza A/H3N2 viruses: An international collaborative study. *Vaccine*. (25): 4046-4063.
- Stephenson I., Heath A., Major D., Newman R., Hoschler K., Junzi., Katz J., Weir J., Zambon M., Wood J., 2009. Reproducibility of serologic assays for influenza virus A (H5N1). *EID Journal* 15(8): 1250–1259.
- Van R. K., Labarque G., Pensaert M., 2006. Serological profiles after consecutive experimental infection of pigs with European H1N1, H3N2 and H1N2 swine influenza virus. *Viral Immunol.* (19): 373-382.

- Vincent A., Ciacchi-Zanellaa J., Lorussoa A., Gaugerc P., Zanellaa E., Kehrli Jr. M., Jankec B., Lagera K., 2010. Efficacy of inactivated swine influenza virus vaccines against the 2009 A/H1N1 influenza virus in pigs. *Vaccine*. 28 (15): 2781-2787.
- Waffarn E. E., Baumgarth N., 2011. Protective B cell responses to flu- no fluke! *J. immunol.* (186): 3823-3829.
- World Health Organization (WHO), 2015. Influenza Vaccine Response during the Start of a Pandemic. Report of a WHO Informal Consultation held in Geneva, Switzerland. Junio, 2016. En: <http://www.who.int/influenza/resources/publications/influenzavaccinereponse>.
- Wu J., Fang H., Chen J., Zhou J., Feng Z., Li C., Qiu Y., Liu Y., Lu M., Liu L., Dong S., Gao Q., Zhang X., Wang N., Yin W., Dong X., 2009. Immunogenicity, Safety, and Cross-Reactivity of an Inactivated, Adjuvanted, Prototype Pandemic Influenza (H5N1) Vaccine: A Phase II, Double-Blind, Randomized Trial. *Clinical Infectious Diseases*. (48). 1087-1095.

CONCLUSIONES GENERALES DE LA TESIS

Podemos concluir que el uso de vacunas con virus inactivados, activan la respuesta inmune mediada por anticuerpos en la protección contra el virus de influenza A porcina. Los anticuerpos detectados previó a la vacunación, interfieren en la eficacia de las vacunas.