

RESPUESTA HUMORAL POSTERIOR A LA INMUNIZACIÓN CON UN BIOLÓGICO EXPERIMENTAL CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA EN MODELO MURINO.

José Francisco Rivera-Benítez^{1*}, Jazmín De la Luz Armendáriz², Marta Macías García³, Manuel Zapata-Moreno⁴, Jorge Galindo Barboza⁴

¹Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP. ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. ³Investigadora independiente. ⁴Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, FMVZ, UNAM.

*Autor para correspondencia: rivera.francisco@inifap.gob.mx

Palabras clave: Influenza, biológico, anticuerpos.

Introducción

La influenza es una enfermedad respiratoria aguda emergente y reemergente que afecta una gama amplia de aves y mamíferos. Los virus de influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*, con base en la variabilidad antigénica de la nucleoproteína se dividen en cuatro generos: *Alphainfluenzavirus* (AIV), *Betainfluenzavirus* (BIV), *Gammainfluenzavirus* (GIV) and *Deltainfluenzavirus* (DIV). Las características genéticas (ARN segmentado) del AIV permiten eventos de reordenamiento cuando dos o más virus infectan una sola célula. Estos eventos no son raros en la naturaleza y es considerado un mecanismo para la generación de virus con potencial pandémico en la población humana, particularmente cuando se presentan estas coinfecciones en una especie altamente susceptible, como el cerdo. Desde el año 1998, se han aislado virus de la influenza H3N2 triplemente reordenantes que contienen genes de linaje humano, porcino clásico y aviar en cerdos de Estados Unidos. A inicios de la década de 2000 se ubicaron cepas de influenza porcina H1N1 clásica recombinados con las cepas H3N2, dando como resultado el subtipo H1N2 que contenía genes de linajes de virus de influenza humana, porcina clásica y aviar [1]. En el año 2012 se reportó una cepa del subtipo H1N2 en Ontario, que contenía la HA1 homóloga (99%) a la cepa A(H1N1)pdm09 [A/México/ InDRE4487/09] de México. Este mismo subtipo se reportó en México en el año 2013 y 2014. En un estudio realizado en 2019 se identificó que los linajes de vIP circulantes en México eran antigénicamente distintos a los circulantes en EEUU, con base en esos hallazgos se planteó que era poco probable que las vacunas estadounidenses brindaran protección contra estos virus y sería necesario desarrollar nuevas vacunas dirigidas específicamente a estas diversas cepas mexicanas [2]. Actualmente, se comercializa una vacuna inactivada con los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2, sin embargo, las cepas del biológico comercial son, en algunos casos de más de 20 años de antigüedad. Debido a que esta infección es una zoonosis y por lo tanto de importancia en la salud pública, debe considerarse la actualización frecuente de las cepas vacunales empleadas en los biológicos que se aplican de forma rutinaria en las granjas porcinas de una región. El objetivo del estudio fue aislar, formular y evaluar un biológico experimental (de cada subtipo: H1N1, H1N2 y H3N2) con cepas del vIP aisladas en México, con enfoque al estado de Jalisco.

Materiales y métodos

Cepas: las cepas empleadas en el presente estudio fueron aisladas de casos clínicos en cerdos con signos respiratorios, para los subtipos H1N1 (Jal/2013), H1N2 (Gto/2014) y H3N2 (Jal/2013). Para el caso de la cepa identificada como H3N2 Jal (2022), se aisló de una granja sin signos asociados (muestreo realizado por el GEVE del estado de Jalisco, en colaboración con la URPJ). Cada muestra empleada (pulmón, hisopado nasal o fluido oral), fue procesada con procedimientos estandarizados para ser inoculada en embrión de pollo de 9 días, mediante la aplicación en la cavidad alantoidea, se inocularon 3 embriones por cada muestra. Posterior a los 3 días, se cosechó el líquido alantoideo y se realizaron tres pases seriados. La última cosecha fue titulada y se inocularon cultivos de la línea celular MDCK empleando TPCK, se realizaron tres pases seriados. La cosecha final fue titulada y procesada para purificación e inactivación viral. **Formulación del biológico:** con la producción en lote de la cepa H3N2 Jal y las cepas H1N1, H1N2 y H3N2 se consiguió la masa antigénica suficiente para formular un biológico experimental. En este procedimiento se preparó por separado cada biológico (formulación monovalente). Cada formulación

antigénica se inactivó químicamente con BEI, una vez realizado el procedimiento se validó la inactivación mediante inoculación en embrión de pollo, realizando tres pases seriados, los cuales resultaron negativos a la prueba de HA y RT-PCR en tiempo real, este mismo ARN fue empleado para verificar la identidad de cada cepa y la ausencia de otros agentes virales comunes en cerdos o como contaminantes adventicios (PRRS, PCV2, RVP y DVB), constatando negatividad en todos los casos. Los virus inactivados se homogenizaron con el adyuvante Montanide ISA 206 VG. La formulación se mantuvo en refrigeración y se tomó una alícuota para verificar la ausencia de contaminación bacteriana, se realizó un sembrado en agar sangre y agar Mac Conkey, obteniendo resultados negativos. **Modelo experimental:** se realizaron dos grupos de evaluación, en el primero aplicaron IM dos dosis del biológico experimental monovalente (0.1ml) con un intervalo de 21 días a grupos de 8 ratones Balb-C de 30 días de edad mantenidos bajo condiciones controladas (la prueba en esta especie es una de las fases de evaluación previas a la especie blanco). Se mantuvo un grupo de ratones sin inmunizar como testigo (n=14). Se analizó clínicamente a los ratones, los cuales no presentaron reacción posterior a la aplicación y se colectaron muestras sanguíneas para ser evaluadas mediante la prueba de IHA a los días cero, 14, 21, 28 y 35. Posterior a 14 días de haber recibido la segunda dosis, se concluyó la evaluación (Figura 1A). En el segundo grupo se evaluó a dosis única del biológico (IM 0.1ml). Se emplearon 21 ratones Balb-C para cada subgrupo, en el primero se evaluó H1N2 y en el segundo H3N2 Jal (Figura 1B), se contó con su respectivo grupo testigo.

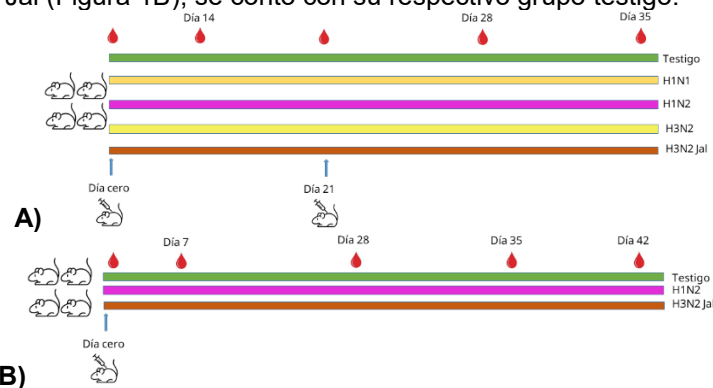


Figura 1. Modelo experimental empleado en la evaluación del biológico contra influenza porcina. A) modelo de aplicación de dos dosis. B) modelo de aplicación de una dosis.

Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH): la evaluación de la respuesta humoral se llevó a cabo por medio de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH) empleando lotes virales previamente realizados. La prueba de IH se realizó con diluciones dobles seriadas del suero comenzando 1:40 y finalizando en la dilución 1: 5,120, se emplearon ocho unidades hemoaglutinantes de cada cepa viral. Los sueros se consideraron como suero positivo a la presencia de anticuerpos específicos en contra del subtipo viral analizado, en todos aquellos pozos en donde se observó sedimentación de glóbulos rojos y los sueros negativos serán aquellos pozos en los que se identificó hemoaglutinación. El punto de corte fue a partir de la dilución 1:80 y hasta 1:5,120, las cuales fueron consideradas como positivas.

Resultados

Los ratones del grupo testigo no generaron anticuerpos contra ningún subtipo analizado en los dos grupos analizados. Grupo 1 (dos dosis): en el grupo de ratones inmunizados con el biológico experimental con la cepa H1N1, se identificó seroconversión al día 28 (6.32-7.32 log₂), manteniendo título a los 35 días post aplicación (6.32-8.32 log₂). En el grupo H1N2 (cepa de referencia), se identificó seroconversión al día 14 (7.32 log₂), en uno de dos individuos analizados. Los dos ratones analizados al día 21 no registraron anticuerpos. Al día 28 y 35 se registraron valores de 6.32-9.32 y 9.32-10.32 log₂, respectivamente. En estos dos grupos no se registró reacción cruzada en la prueba de IHA con ninguno de los subtipos analizados. Para los grupos con las cepas H3N2 de referencia y de reciente aislamiento, se presentó reacción cruzada, en el caso de la reacción homóloga, el grupo inmunizado con el subtipo H3N2 de referencia, se registró seroconversión en un ratón (6.32 log₂), posteriormente al día 28 (7.32 log₂) y día 35 (7.32-7.32 log₂). En el grupo inmunizado con la cepa H3N2 Jal, se registraron títulos a partir de los 21 días post aplicación, incrementando el título de 6.32-8.32 a 11.32 log₂ (Figura 2A). Grupo 2 (1 dosis): Se evaluó la formulación monovalente H1N2 y H3N2 Jal, la seroconversión fue específica para cada subtipo, en ninguno de los sueros analizados se detectaron anticuerpos contra H1N1. La respuesta promedio para H1N2 se mantuvo

en 8.32 log₂, a partir de los 28 días. Para H3N2 se registraron valores similares. En ambos casos se identificaron valores inferiores, comparativamente con el grupo de ratones con dos aplicaciones.

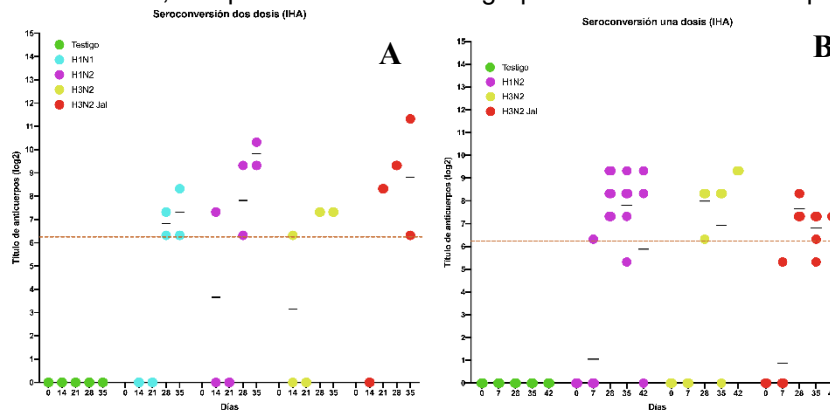


Figura 2. Respuesta humoral (evaluada por IH) posterior a la aplicación del biológico experimental contra influenza porcina. A) evaluación en modelo murino con dos dosis del biológico. B) evaluación en modelo murino con una dosis del biológico. El punto de corte de la prueba de IHA fue 6.32 log₂.

Discusión

La aplicación de una o dos dosis de la formulación experimental generó una respuesta humoral detectable en los ratones. El título de anticuerpos aumentó en el grupo de dos dosis, lo que resalta la importancia del esquema de inmunización completo. El modelo animal empleado abre las puertas a su prueba en la especie blanco, similar a lo comentado por Soares et al (2025) [3], que señala que estos animales se utilizan ampliamente como modelo preclínico para estudios sobre el desarrollo de vacunas y terapias antivirales contra el virus de la influenza. El aumento de la vigilancia del virus de influenza porcina en México, involucrando a las uniones de porcicultores (p.e.: URPJ), ha sido crucial para evaluar la circulación de los diferentes subtipos, la posible efectividad de las vacunas comerciales y para impulsar el desarrollo de nuevos biológicos. Un punto importante a desarrollar es el trabajo más extenso que permita la detección temprana de cepas emergentes y mejores indicadores sobre el aumento de la prevalencia de nuevas cepas [4]. La actualización de las cepas vacunales, en términos de tiempo y de ubicación geográfica permitirá tener tecnologías útiles. La efectividad de la vacuna de influenza estacional en humanos, varía de un año a otro, oscilando entre el 0 % y el 60 %. Uno de los principales factores que influyen es la compatibilidad de los subtipos de HA en la vacuna con los clados de las cepas circulantes actuales o previstas. Si la cepa de la vacuna no se asemeja mucho al virus circulante, la respuesta inmunitaria puede ser más débil, lo que resulta en una menor protección [5]. Esto pone de manifiesto el desarrollar tecnología mexicana y actualizada para la generación de vacunas locales que ofrezcan resultados favorables para la porcicultura.

Conclusiones

Se identificó seroconversión con la formulación experimental, se continuará con modelos de inmunización en la especie blanco y pruebas de potencia. Con la información generada se continúan con proyectos que buscan desarrollar biológicos adaptados a las necesidades regionales, en este caso el estado de Jalisco.

Fuente financiadora

Proyecto Recursos Fiscales INIFAP. SIGI No. 7285536076.

Referencias bibliográficas

1. Karasin AI, et al. J Clin Microbiol 44. <https://doi.org/10.1128/jcm.44.3.1123-1126.2006>
2. Nelson, M. I., et al., Emerging infectious diseases, 25(4), 691–700. <https://doi.org/10.3201/eid2504.180779>
3. Fraiha, A. L. S., et al., Vaccine, 45, 126638. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.126638>
4. Myburgh, L., et al., Vaccine, 59, 127281. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2025.127281>
5. Myburgh, L., et al., Vaccine, 59, 127281. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2025.127281>