

# LA GRIPE PORCINA: UNA ENFERMEDAD CLÁSICA CON CARÁCTER ZONÓTICO Y EMERGENTE

M<sup>a</sup> ÁNGELES MARTÍN DEL BURGO, BLANCA CHINCHILLA RODRÍGUEZ Y GUSTAVO DEL REAL SOLDEVILLA\*

## INTRODUCCIÓN

La Gripe o Influenza Porcina es una de las enfermedades infecciosas respiratorias más comunes que afectan al cerdo. Se encuentra muy extendida por todo el mundo y, en la mayoría de los países, tiene carácter endémico.

En España, el virus de la Influenza Porcina constituye uno de los patógenos primarios más relevantes y tiene un fuerte impacto en la industria porcina, una de las principales de Europa. La enfermedad genera importantes pérdidas económicas, principalmente debidas al retraso en el crecimiento de los animales infectados y, ocasionalmente, a abortos.

La Influenza Porcina, además, tiene una gran importancia desde el punto de vista de la salud pública: en las últimas décadas se han descrito casos de infección en el hombre por virus Influenza porcinos con síntomas similares a una infección gripal por virus humanos y que, en algunos casos, tuvieron un desenlace fatal. Es muy interesante el hecho de que la gripe en el cerdo es muy similar en cuanto a patogenia, sintomatología, curso de la infección, etc. a la gripe humana por lo que constituye un excelente modelo animal para estudios experimentales sobre la enfermedad.

El cerdo es susceptible de ser infectado por virus Influenza de otras especies, así se ha postulado su importancia como hospedador intermediario tanto para la adap-

---

\* Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Trabajo galardonado con el "XI Premio Francisco Fernández López" del Colegio Oficial de Veterinarios de Almería.

tación de cepas aviarias a hospedadores mamíferos como coctelera en el cual tras la infección con virus diferentes se genere un nuevo virus con potencial pandémico.

La nueva cepa H1N1 que se ha extendido actualmente en la población humana y que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha calificado recientemente como pandémica, se ha originado por reagrupamientos génicos de virus preexistentes siendo la hemaglutinina y la neuraminidasa, proteínas más relacionadas con la virulencia e inmunidad protectora, de origen porcino.

La Influenza Porcina es una enfermedad extremadamente contagiosa, transmitida por contacto directo a través de aerosoles (muy infectivos) eliminados por los animales enfermos. La morbilidad es prácticamente del 100%. Tras la infección, el cerdo sufre un cuadro clínico muy similar al de la gripe humana con síntomas de tipo respiratorio, fiebre y de curso autolimitado, resolviéndose en 2-4 días. La severidad de la infección depende de factores tales como son: la edad del animal, la cepa viral, las condiciones medioambientales y las infecciones secundarias asociadas.

Existen claras diferencias geográficas entre los diferentes subtipos que afectan al cerdo entre Europa, Asia y América. En España la situación es bastante desconocida lo que hace necesario un estudio epizootiológico tanto de la prevalencia de la infección como de las cepas circulantes y un estudio profundo tanto genético como de diferencias en su patogenia. Por lo tanto, la vigilancia epizootiológica de la Influenza Porcina, tal y como aconsejan la OMS y la OIE, es fundamental debido a la enorme variabilidad antigénica de los virus Influenza, lo que conlleva la aparición de cepas diferentes así como de nuevos subtipos, y a las implicaciones derivadas en cuanto al diagnóstico y al diseño de vacunas eficaces.

En este trabajo se exponen los resultados obtenidos en el estudio de la enfermedad en España con respecto a su prevalencia y a las características genéticas, antigénicas y patogénicas de los subtipos virales circulantes en la actualidad. Las conclusiones alcanzadas en este trabajo están siendo importantes para la comprensión del carácter zoonótico de esta infección, tal y como lo atestigua la citación de datos genéticos de cepas virales caracterizadas en este estudio en publicaciones internacionales relacionadas con la gripe pandémica actual. Además, los datos epizootiológicos obtenidos son fundamentales para la valoración de la eficacia de las vacunas actuales y para la eventual reformulación de las mismas.

Por último, la información sobre los determinantes patogénicos de los virus puede contribuir a un mayor conocimiento de la patogenia de la infección y, como

consecuencia, al desarrollo de nuevas armas terapéuticas frente a la enfermedad, no sólo porcina, sino también humana.

## ETIOLOGÍA

El agente causal de la gripe porcina son virus Influenza tipo A pertenecientes a la Familia *Orthomyxoviridae*. Los virus Influenza presentan una envuelta lipídica externa, derivada de la membrana celular, que les hace muy susceptibles a la acción de determinados detergentes y desinfectantes (**Diseases of swine, 2006**). Por debajo de la membrana se encuentra una capa constituida por la proteína matriz (M1), soporte estructural de la partícula, y en su interior un conjunto de ribonucleoproteínas (vRNPs) que constituyen el genoma del virus. En función de la nucleoproteína (NP) y de la proteína M se clasifican en Influenza tipo A, B y C. Bajo un prisma veterinario, los virus Influenza tipo A se consideran más relevantes que los B o C, dado que infectan a un amplio rango de hospedadores incluyendo a las personas, los cerdos, los caballos, los mamíferos marinos y las aves.

Son virus de genoma segmentado constituido por 8 segmentos de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa. La secuencia completa del genoma contiene aproximadamente 13600 nucleótidos. Cada segmento de RNA está asociado a la polimerasa viral, complejo de tres subunidades distintas (PB1, PB2 y PA), mediante interacción con los extremos del RNA y está protegido por asociación a monómeros de la nucleoproteína.

En la superficie del virión, e insertadas en su membrana, se encuentran dos glicoproteínas, que dan lugar a proyecciones de dos tipos: **hemaglutinina** (HA) y **neuraminidasa** (NA). La HA, una vez activada enzimáticamente por proteasas del hospedador, es la responsable de la unión del virus a sus receptores celulares de ácido siálico y de la fusión de la envoltura viral con la membrana citoplasmática de la célula diana, procesos que determinarán la penetración de la nucleocápside en el interior celular. La NA participa, gracias a su actividad sialidasa, en la liberación de las nuevas partículas virales a partir de la célula diana al impedir su agregación en la superficie celular, además de facilitar la difusión de los viriones a través de la mucina del epitelio respiratorio (**Matrosovich, 2004**).

La HA induce la producción de anticuerpos que neutralizan la infectividad viral, al impedir su unión a los receptores celulares, esto es de gran importancia en la inmunidad protectora frente a la gripe. Si bien los anticuerpos frente a la NA no

neutralizan la infectividad del virus, éstos poseen un importante papel en la reducción de la difusión viral en el epitelio respiratorio aunque no previenen la infección.

Otras dos proteínas virales son la M2, que constituye un canal iónico dependiente de pH, y la proteína no estructural NS2, relacionada con la exportación nuclear de las RNPs (O'Neill y col., 1998).

Durante la infección van a aparecer otras dos proteínas virales no presentes en el virión: la proteína no estructural NS1, que une RNA de doble cadena, modula la replicación viral y está relacionada con el bloqueo de respuesta celular mediada por interferón (García-Sastre, 2001); y la proteína PB1-F2, relacionada con apoptosis o muerte celular programada como consecuencia de la infección (Chen, 2001) fundamentalmente de células inmunes del hospedador (macrófagos), lo que se relaciona con la pérdida de efectividad de la respuesta inmune contribuyendo así a la patogenicidad (Zamarin y col., 2005).

Los virus Influenza tipo A se clasifican en subtipos en base a la estructura antigénica de la HA y la NA. Se han descrito un total de 16 HA y 9 NA para el virus de la gripe A en su reservorio natural aviar.

Existen dos mecanismos por los cuales los virus Influenza evolucionan genéticamente: por un lado, la aparición de mutaciones puntuales (*drift*) debido a una tasa de error de la polimerasa viral de  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  nt / ciclo de replicación (Parvin y col., 1986) y, por otro lado, el genoma segmentado de los virus Influenza permite el reagrupamiento génico entre cepas virales diferentes que infecten la misma célula dando lugar a un virus nuevo con segmentos de uno o de otro virus (*shift*).

Las mutaciones puntuales o *drift* se asocian principalmente a las proteínas de superficie, la HA y la NA, frente a las cuales se generan los anticuerpos neutralizantes. Por este motivo, mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas hacen posible que el virus escape de la respuesta inmune del hospedador al no ser reconocido por dichos anticuerpos.

## EPIDEMIOLOGÍA

Los cerdos son susceptibles de ser infectados por diferentes subtipos de Influenza, incluyendo Influenza humana y aviar, pero actualmente los subtipos antigénicos que normalmente afectan al cerdo son H1N1, H1N2 y H3N2. Estudios epidemiológicos resaltan la amplia distribución mundial de la infección, así como la aparición

de cambios antigénicos en las cepas circulantes (drifts) y el surgimiento de nuevos subtipos, consecuencia de reagrupamientos génicos (shifts). Además, existen claras diferencias geográficas entre los diferentes subtipos que afectan al cerdo entre Europa, Asia y América.

La Influenza Porcina se describió por primera vez en 1918 (**Koen, 1919**) asociada a brotes en granjas de cerdos de Estados Unidos (**Shope, 1964**). Estos brotes coincidieron temporalmente con la pandemia humana de influenza más grave de los tiempos modernos, que se estima fue responsable de la muerte de aproximadamente 20-50 millones de personas en todo el mundo.

El primer virus Influenza aislado, A/swine/Iowa/15/30, se aisló en cerdos de Norteamérica (**Shope, 1931**). Desde entonces, ha permanecido endémico en la población porcina norteamericana como el subtipo H1N1 "clásico" y se sabe que dicho agente se encuentra relacionado genética y antigénicamente con el subtipo causante de la pandemia humana. (**Gorman y col., 1991; Kanegae y col., 1994; Reid y col., 1999, 2000**). Además, evidencias recientes indican que los aislados iniciales de los virus del hombre y del cerdo eran de origen aviar, y estaban estrechamente relacionados (**Taubenberger y col., 1997, 2000**).

En cualquier caso, este virus H1N1 clásico continuó siendo la causa predominante de influenza en los cerdos de los EE.UU., permaneciendo muy conservado hasta la década de los noventa (**Chambers y col., 1991; Hinshaw y col., 1978; Olsen y col., 2000**). A partir de entonces la evolución génica fue mucho más rápida, apareciendo constantemente nuevos subtipos H3N2, H1N2 y H1N1, consecuencia de reordenamientos génicos ente cepas porcinas, humanas y aviares (**Zhou y col., 1999, Choi y col 2002, Karasin y col., 2002, Webby y col., 2004, Vincent y col.,2006**).

Antes de 1975 había pocos casos documentados de gripe porcina fuera de los EE.UU. En Europa no hubo prácticamente evidencias de gripe porcina hasta el año 1976, cuando la enfermedad surgió en granjas del norte de Italia (**Nardelli y col., 1978**). Desde su entrada en Europa en 1970, el virus H1N1 clásico se distribuyó gradualmente por todo el continente; sin embargo, a partir de los últimos años de la década de los 70 desapareció y fue reemplazado por un nuevo virus H1N1 de origen aviar, actualmente circulante (**Abusugra y col. 1987; Barigazzi y col., 2003**).

El subtipo H3N2, virus humano que originó la pandemia de 1968, fue aislado en cerdos en Europa a principios de los años 70 (**Kundin 1970; Tumova y col. 1976; Ottis y col. 1982**) pero hasta 1984 no se asoció directamente con brotes de enfermedad respiratoria porcina (**Haesebrouck y col. 1985**). Actualmente los H3N2 dominantes

en Europa son de origen aviar-humano (**Castrucci y col., 1993**), sustituyendo al tipo humano de los años 70-80. La HA y NA son de origen humano de cepas circulantes H3N2 y los 6 genes internos de H1N1 “tipo aviar”.

A partir de los años 90 empezó a circular un nuevo subtipo en Europa, el H1N2. Los primeros aislados fueron en Gran Bretaña en 1994 (**Brown y col., 1995, 1998**) y desde entonces se ha extendido por el resto de Europa (**Gourreau, y col. 1994**), aumentando en los últimos años su prevalencia. La HA del H1N2 está estrechamente relacionada con cepas humanas de los años 80, la NA parece proceder de cepas circulantes porcinas H3N2 y los genes internos son de origen aviar.

## INFLUENZA PORCINA Y ZONOSIS

La importancia del cerdo en la ecología y evolución de los virus Influenza se basa en su susceptibilidad de ser infectado por virus de Influenza aviar y humana (**Kida y col. 1994**). Este hecho se relaciona con la presencia en su epitelio traqueal de receptores para cepas tanto humanas como aviares (**Ito y col., 1998**). Así, se cree que los cerdos podrían tener un papel importante en la transmisión interespecífica de virus Influenza, dado que, por un lado, pueden actuar como hospedadores intermediarios en la adaptación de virus aviares a los mamíferos (**Campitelli y col., 1997**) (**Kida y col., 1994**) y, además, ser infectados por virus de especies distintas pudiendo dar lugar a un nuevo virus por un mecanismo de reagrupamiento génico.

Virus aviares han sido aislados en cerdos (**Karasin y col, 2000**), y virus de cerdo han sido aislados en aves (**Choi y col. 2004**). En los recientes casos de infección de humanos por cepas aviares H5N1 de alta patogenicidad, anticuerpos frente al virus o el propio virus ha sido aislado de cerdos asintomáticos en Asia (**Choi y col. 2005, Li y col., 2004**), y también han sido aislados de cerdos virus de Influenza Equina H3N8 (**Tu y col., 2009**) e incluso cepas humanas, hechos que reflejan el posible papel del cerdo como hospedador intermediario, al que ya nos hemos referido con anterioridad.

Por otra parte, en las últimas décadas se han descrito casos esporádicos de infección en humanos por virus de IP provocando cuadros respiratorios, y de forma ocasional, hospitalizaciones y muerte (**Kendal y col., 1977, Gaydos y col., 1976, Rimmelzwaan y col., 2000, Gregory y col., 2003**). También han sido detectados anticuerpos frente a cepas porcinas en trabajadores de granjas (**Gray y col. 2007**). Recientemente, en España se ha descrito un caso de transmisión de virus porcino H1N1 a una persona en Aragón (**Adiego y col., 2009**).

En Abril del 2009, un virus H1N1 no descrito anteriormente ni en humanos ni en ganado porcino, fue aislado en humanos en México y EEUU, y, en pocas semanas, se extendió por todo el mundo, con transmisión de humano a humano. Este nuevo virus tiene su origen en un triple reagrupamiento génico (**Smith y col., 2009**) entre cepas porcinas H1N1 “tipo aviar” circulantes en Europa, cepas porcinas *clásicas* H1N1 circulantes en EEUU y cepas resultantes de reagrupamientos génicos entre cepas aviares y humanas.

## PATOGENIA

La replicación del Virus de la Influenza Porcina queda generalmente restringida al aparato respiratorio del cerdo, considerándose el pulmón como el principal órgano diana. También se han visto afectadas las células de la mucosa nasal, tonsilas, tráquea y linfónodos traqueobronquiales (**Lanza y col., 1992; Brown y col., 1993; Heinen y col., 2000**).

El virus accede vía nasofaríngea y penetra en el epitelio respiratorio, donde causa inflamación y necrosis de las células que tapizan los bronquios y bronquiolos.

En el pulmón, el efecto citopático sobre los neumocitos alveolares tipo II altera la producción de surfactante. Esto dificulta la fagocitosis por los macrófagos alveolares. El exudado inflamatorio en la vías respiratorias menores puede bloquearlas, dando lugar a atelectasia, enfisema y neumonía broncointersticial. En la mayor parte de los casos el daño epitelial es reparado, y las lesiones remiten en 5-7 días.

En la patogenia intervienen factores dependientes del hospedador, como es la presencia de anticuerpos, y factores del propio virus que hacen que la virulencia o patogenicidad varíe de unas cepas a otras, como son: la actividad apoptótica de la proteína PB1-F2 en macrófagos, lo que además va a favorecer la aparición de infecciones secundarias (**Coleman y col., 2007**), o la proteína NS1, responsable de la inactivación de la respuesta inmune innata bloqueando la respuesta antiviral de IFN $\alpha$ /B (**Salvatore y col., 2002**). Otra forma de escapar de la respuesta inmune es a través de fenómenos de evolución génica por mutaciones puntuales de la HA y de la NA, evadiendo así el reconocimiento por los anticuerpos del hospedador.

## CUADRO CLÍNICO

Tras un período de incubación de aproximadamente 1-3 días, el virus induce la aparición de un cuadro respiratorio agudo que cursa con síntomas tales como fiebre,

disnea, tos, estornudos, descarga nasal, anorexia, pérdida de peso, letargia y conjuntivitis (Van Reeth 2000; Yoon y col., 2004). También se han descrito abortos debido a la fiebre (Yoon y col., 2004). El curso de la enfermedad es autolimitado y se resuelve en pocos días. La transmisión se produce a través del contacto con el virus presente en secreciones y aerosoles eliminados por toses y estornudos de animales infectados.

La morbilidad es elevada y la mortalidad generalmente baja. La presencia de infecciones secundarias asociadas (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasterella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* y *Streptococcus suis* y agentes virales como el virus del Síndrome Reprodutor y Respiratorio porcino (PRRS)) puede exacerbar los signos clínicos.

## LESIONES

La severidad de las mismas, así como el desarrollo de la enfermedad, dependen directamente de la cepa viral, de la cantidad de virus que alcanza las vías respiratorias profundas y de la consecuente liberación de mediadores de la inflamación, principalmente IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL1 e IL6 (Van Reeth y col., 1999, 2000, 2006).

Los virus Influenza inicialmente infectan el epitelio de las vías aéreas y la lesión predominante que producen es una *bronconeumonía intersticial* (Yoon y col., 2004; Richt y col., 2003; Born y col., 1998), asociada a un aumento en el tamaño de los nódulos linfáticos regionales (*Diseases of swine*, 9<sup>a</sup> edición). Macroscópicamente, las zonas afectadas del pulmón están claramente demarcadas, atelectásicas o consolidadas, y se encuentran distribuidas por todo el órgano pero siendo más extensas ventralmente.

Microscópicamente, en los casos de influenza porcina no complicada, puede observarse una degeneración diseminada y necrosis del epitelio respiratorio bronquial y bronquiolar con la consecuente descamación celular (Haesebrouck y col., 1985; Haesebrouck 1986). Debido a esto, las luces de los bronquios, bronquiolos y alvéolos se encuentran repletas de un exudado que contiene células descamadas, neutrófilos y, posteriormente, macrófagos. Estos neutrófilos también contribuyen al daño pulmonar mediante la liberación de enzimas propias. Además, existe una hiperemia variable con dilatación de los capilares y la subsecuente aparición de un infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario a nivel perivascular y peribronquiolar (Van Reeth y col., 1998; Richt y col., 2003). Extensas áreas de atelectasia y enfisema alveolar y neumonía intersticial acompañan a estas lesiones (Shope, 1931; Urman y



col. 1958; Witte y col., 1981). En casos graves, también se pueden apreciar congestión y un acusado edema de todo el pulmón.

## DIAGNÓSTICO

El **diagnóstico clínico** de una infección por virus Influenza sólo puede realizarse de forma presuntiva dado que los signos no son patognomónicos de la enfermedad, siendo necesario hacer un diagnóstico diferencial con la variedad de cuadros respiratorios que afectan al ganado porcino. Por lo tanto, un **diagnóstico definitivo** sólo es posible a través del aislamiento vírico o la detección de ácido nucleico, proteínas virales y anticuerpos específicos en el laboratorio.

Para una mejor identificación del agente es preferible la recogida de muestras en las primeras 24-48 h tras el inicio del cuadro clínico. El virus puede ser detectado a partir de muestras de tejido pulmonar y de hisopos nasales. El aislamiento viral se realiza en cultivos celulares (línea celular MDCK) o bien en huevos embrionados de pollo de 10 días de edad. Los virus aislados pueden ser subtipados mediante PCRs específicas y por secuenciación de los genes de la HA y NA o por test de Inhibición de la HA y de Inhibición de la NA con sueros subtipo-específicos.

Para la detección de antígenos del virus se emplean, principalmente, dos técnicas: la inmunofluorescencia directa (IFD) sobre tejido fresco y la inmunohistoquímica (IHQ) sobre tejido fijado.

El principal test serológico para la detección de anticuerpos es la Inhibición de la Hemaglutinación, que requiere de la obtención de muestras de suero pareadas (tomadas al principio y al final del brote) con el fin de demostrar un aumento del título de anticuerpos específicos.

Otras pruebas que pueden utilizarse para la detección de anticuerpos en suero son la seroneutralización, el ELISA (*Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay*), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la inmunodifusión en gel de agar.

También se puede detectar la presencia viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que tiene la ventaja de diferenciar subtipos directamente sobre muestras clínicas o sobre aislados (*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE*).

## PREVENCIÓN Y CONTROL

La principal medida de prevención se basa en impedir la entrada del virus en la explotación mediante un plan de bioseguridad basado en: limitar el acceso de personas y vehículos ajenos a la granja, la limpieza y desinfección exhaustiva de los camiones de transporte y la cuarentena de cualquier animal nuevo que vaya a entrar en la misma para evitar la introducción de portadores. Debido a la transmisión del virus entre diferentes especies las medidas deben ir destinadas a minimizar el contacto entre el hombre y el cerdo, así como evitar el contacto con aves.

En Europa, se dispone de vacunas inactivadas frente al virus de la Influenza Porcina que contienen las cepas H1N1 y H3N2. Las vacunas deben contener los subtipos y cepas circulantes para garantizar una adecuada protección (*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE*).

La evolución génica de los virus Influenza requiere la valoración constante de la eficacia de las vacunas frente a nuevos subtipos como es el caso del H1N2 porcino, así como frente a los subtipos previamente circulantes que, por fenómenos de drift, pueden derivar antigénicamente haciendo que las vacunas no protejan de forma adecuada al hospedador. **(De Jong y col., 1999, 2001)**.

## OBJETIVOS

1. Estudio de la prevalencia de la Influenza Porcina en España.
2. Análisis genético de aislados recientes españoles.
3. Estudio de reactividad cruzada entre subtipos virales.
4. Estudio de patogenicidad viral en ratón.
5. Estudio de patogenicidad viral en cerdo.

## RESULTADOS

### 1. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA INFLUENZA PORCINA (IP) EN ESPAÑA

Considerando la cabaña porcina española, se analizaron 1503 sueros procedentes de 167 granjas de engorde distribuidas por toda España (nivel de confianza estadística del 95%) por el test de Inhibición de la Hemoaglutinación frente a virus de los tres

subtipos circulantes en España. Este test se basa en la actividad hemoaglutinante de la HA sobre glóbulos rojos de gallina, de modo que la presencia de anticuerpos neutralizantes de la HA en el suero de animales seropositivos inhibe dicha actividad hemoaglutinante.

Los sueros fueron tratados con RDE (receptor destroying enzyme) procedente de *Vibrio cholerae* para inactivar moléculas inhibitoras no específicas y adsorbidos con una dilución de glóbulos rojos de gallina al 50% para eliminar aglutininas inespecíficas. (*WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OIE)*).

Los resultados (Tabla 1) mostraron la amplia distribución de la infección en España: el 82.7% de las granjas presentaron anticuerpos frente a uno o varios subtipos.

El subtipo más frecuente fue el H1N1 detectándose anticuerpos en el 70% de las granjas analizadas, el 57% de las granjas fueron seropositivas a H3N2, y el 55% a H1N2. Solamente el 17% de las granjas fueron seronegativas.

Las infecciones mixtas constituyeron un elevado porcentaje, un 79% de las granjas positivas presentaron anticuerpos frente dos o tres subtipos, de ellas un 42% de las granjas fueron positivas a los tres subtipos.

**Tabla 1: Epidemiología de IP en España**

Subtipo	Granjas	%
H1N1	16	9,58
H1N2	5	2,99
H3N2	8	4,79
H1N1 + H1N2	21	12,57
H1N1 + H3N2	22	13,17
H1N2 + H3N2	8	4,79
H1N1 + H1N2 + H3N2	58	34,73
<b>Granjas positivas</b>	<b>138</b>	<b>82,65</b>
<b>Granjas Negativas</b>	<b>29</b>	<b>17,37</b>
<b>TOTAL</b>	<b>167</b>	<b>100</b>

## 2. ENSAYO DE REACTIVIDAD CRUZADA POR INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (IHA)

Con el fin de conocer el grado de similitud antigénica entre los tres subtipos virales aislados en España, se enfrentaron sueros de cerdos positivos frente a un subtipo a cepas de campo correspondientes a los tres subtipos. Así, se observó que los anticuerpos frente a la HA eran subtipo-específicos, careciendo de reactividad

cruzada heterosubtípica incluso en el caso de anticuerpos frente a la HA1 de subtipos diferentes, como es el caso de H1N1 y H1N2 (Tabla 2).

Se utilizaron sueros de referencia frente a cepas H1N2 A/Swine/410440/Scotland/1993.

El título de anticuerpos del suero se determinó como la última dilución del suero que produce inhibición de la hemoaglutinación enfrentándose a una dilución viral de 4 unidades hemoaglutinantes, considerando una unidad hemoaglutinante como la mayor dilución del virus que produce una completa hemoaglutinación.

Tabla 2: Reactividad cruzada por IHA							
Antisuero		Título de anticuerpos frente a virus					
		H1N1 51316	H1N1 53207	H1N2 40564	H1N2 Scotl.	H3N2 54008	H3N2 54226
H1N1	Suero 1	320	40	<10	<10	<10	<10
	Suero 2	320	80	<10	<10	<10	<10
H1N2	Suero 1	<10	<10	160	40	<10	<10
	Suero 2	<10	<10	80	20	<10	<10
	Suero Scotland	<10	<10	20	360	<10	<10
H3N2	Suero 1	<10	<10	<10	<10	320	320
	Suero 2	<10	<10	<10	<10	640	640

### 3. ENSAYO DE REACTIVIDAD CRUZADA POR INHIBICIÓN DE LA NEURAMINIDASA (INA)

Se estudió la similitud antigénica de las neuraminidasas de los tres subtipos virales. Para ello, se realizaron ensayos de INA (WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance) con diferentes diluciones de sueros frente a cada uno de los subtipos de Influenza Porcina. La presencia de anticuerpos subtipoespecíficos frente a la NA neutraliza la actividad sialidasa del virus.

Los resultados muestran la reactividad cruzada entre NA2 de los subtipos H1N2 y H3N2: sueros positivos H1N2 neutralizan tanto virus H1N2 como H3N2 y viceversa (Figura 1).

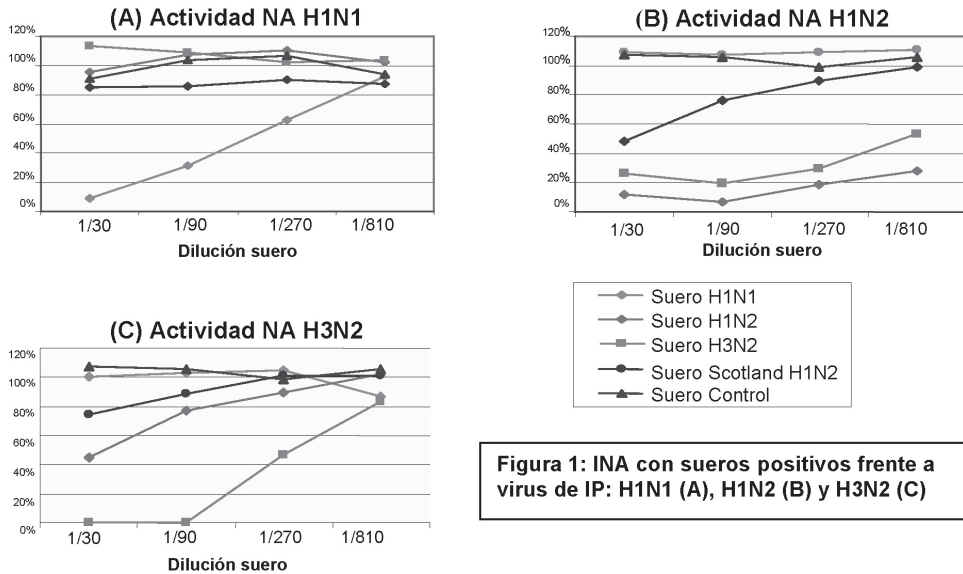
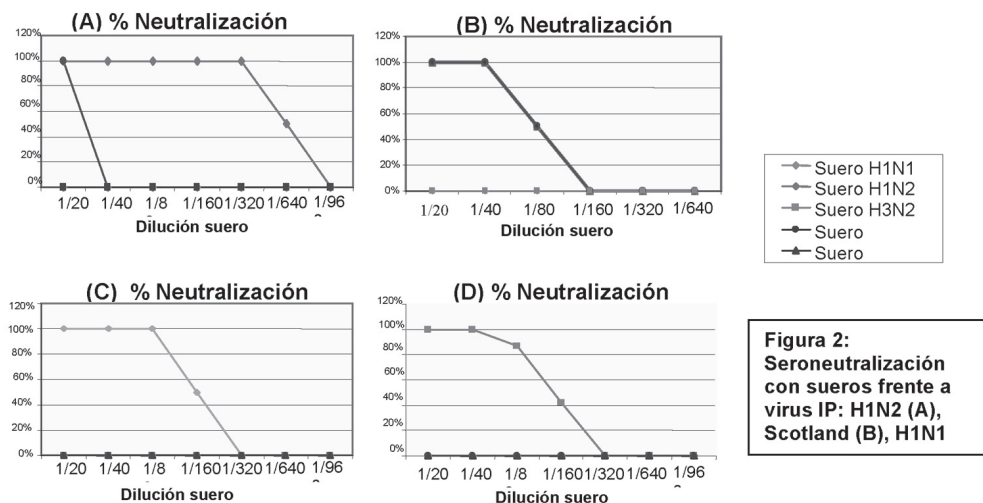


Figura 1: INA con sueros positivos frente a virus de IP: H1N1 (A), H1N2 (B) y H3N2 (C)

#### 4. ENSAYO DE REACTIVIDAD CRUZADA POR SERONEUTRALIZACIÓN

Para el estudio de la existencia de protección cruzada entre los antisueros específicos de cada subtipo, se realizaron ensayos de seroneutralización.

Se realizaron diluciones seriadas de los sueros y se enfrentaron a 100 TCID<sub>50</sub> de cada uno de los subtipos de Influenza Porcina. Tras incubar durante 2 horas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>, se transfirió 100 µl de la mezcla virus-suero a cada pocillo de una placa de microtitulación con células MDCK confluentes incubando 2h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, tras lo cual se eliminó el inóculo y se añadió medio DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle’s Médium con 4.5g/l glucosa, 25mM de HEPES, 100U/ml de penicilina, 100 µgr/ml de estreptomycin, 0.2% de Albúmina sérica bovina fracción V (BSA), 2mM de L•Glutamina) con tripsina a una concentración de 2 µg/ml. Se mantuvieron 3•4 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> observando diariamente el efecto citopático para calcular la dilución de suero que por unión específica de los anticuerpos bloquea el efecto citopático del virus.



Los resultados muestran ausencia de reactividad cruzada y de protección de los anticuerpos frente a virus heterólogos (Figura 2). Además, se observó una pérdida de reactividad entre el aislado reciente H1N2 y el virus de referencia H1N2 Scotland (aislado en 1994) tanto en los ensayos de IHA como en seroneutralización en células, lo que indicaría una deriva antigénica producto de la evolución del virus a lo largo del tiempo y una consecuente pérdida de reconocimiento antigénico por los anticuerpos frente a la HA.

## 5. SECUENCIACIÓN DE AISLADOS VIRALES DE CAMPO

Se secuenció el genoma completo de 7 cepas de campo aisladas recientemente en España. Los análisis filogenéticos de las secuencias fueron realizados usando el programa MEGA version 3.1 (Kumar, Tamura, Nei 2004) y los árboles filogenéticos se realizaron por el método Neighbor-Joining con un bootstrap de 5000 replicados.

Los números de acceso a GenBank de las cepas secuenciadas son:

- CY009380-9387 (A/Swine/Spain/33601/2001 (H3N2))
- CY009372-9379 (A/Swine/Spain/39139/2002 (H3N2))
- CY009892-9899 (A/Swine/Spain/50047/2003 (H1N1))
- CY010564-10571 (A/swine/Spain/54008/2004 (H3N2))
- CY010572-10579 (A/swine/Spain/51915/2003 (H1N1))

- CY010580-010587 (A/swine/Spain/53207/2004 (H1N1))

*National Center for Biotechnology Information (•CBI). Influenza Virus Resource. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/>*

El análisis filogenético de la HA y la NA (Figuras 3 y 5) del virus H1N2 A/Swine/40564/Spain/2003 confirma la elevada homología de la HA con aislados humanos de los años 80 y la relación de la NA con cepas circulantes porcinas H3N2 indicando, tal y como estaba descrito para otros aislados H1N2 europeos, que el origen del H1N2 fue un reagrupamiento génico entre cepas humanas H1N1 y cepas porcinas H3N2. La homología de la HA de la cepa H1N2 respecto a la HA de las cepas H1N1 porcinas es del 73%, mientras que la NA del H1N2 con las cepas H3N2 españolas secuenciadas es del 83-84%.

En el análisis filogenético de la HA1, se observa la elevada homología de la HA de las cepas H1N1 asociadas a brotes humanos en 2009 con cepas H1N1 porcinas tipo clásico que llevan circulando en los últimos 80 años en cerdos de Norteamérica, lo que sugiere un origen porcino de las mismas. Sin embargo, la caracterización genética de la NA las relaciona más con cepas H1N1 porcinas circulantes en Europa, cuyo origen es tipo aviar (Figuras 3 y 4).

Se muestran en azul las cepas H1N1 de la pandemia 2009 y en rojo las cepas españolas porcinas, así como un caso en Aragón de un aislado de virus porcino H1N1 en una mujer en el 2008.

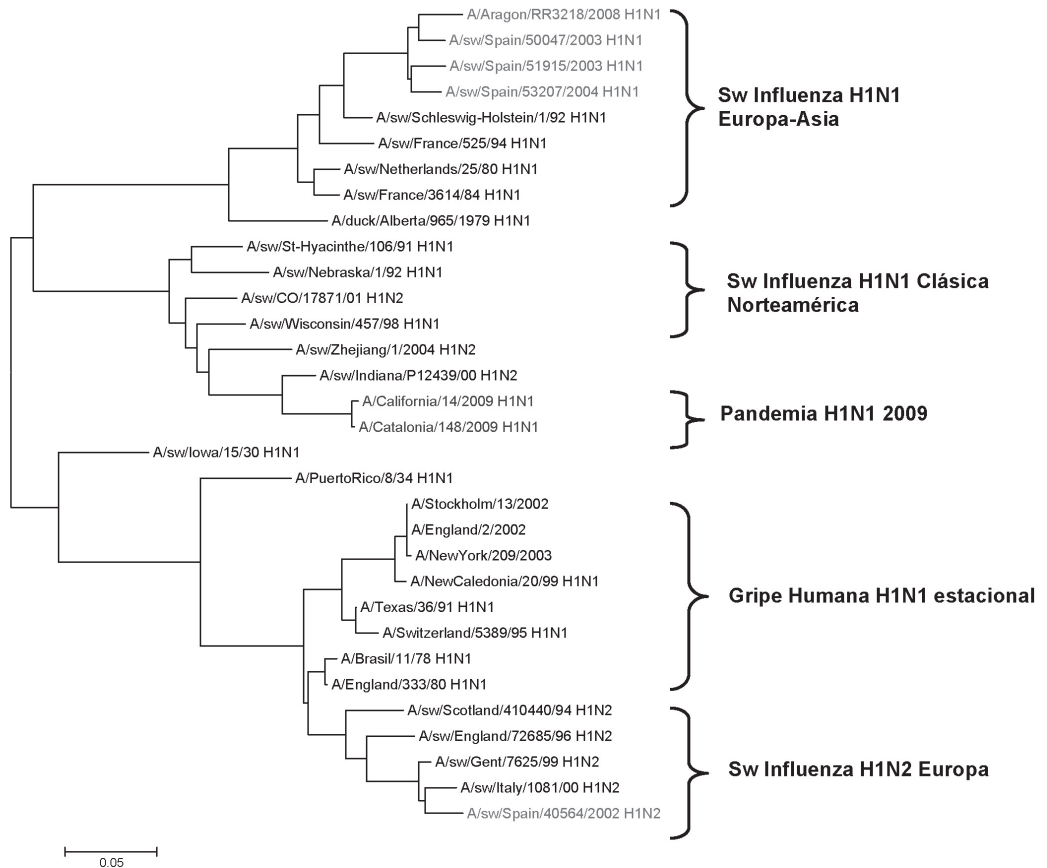


Figura 3: Árbol filogenético de la secuencia de nucleótidos de HA1



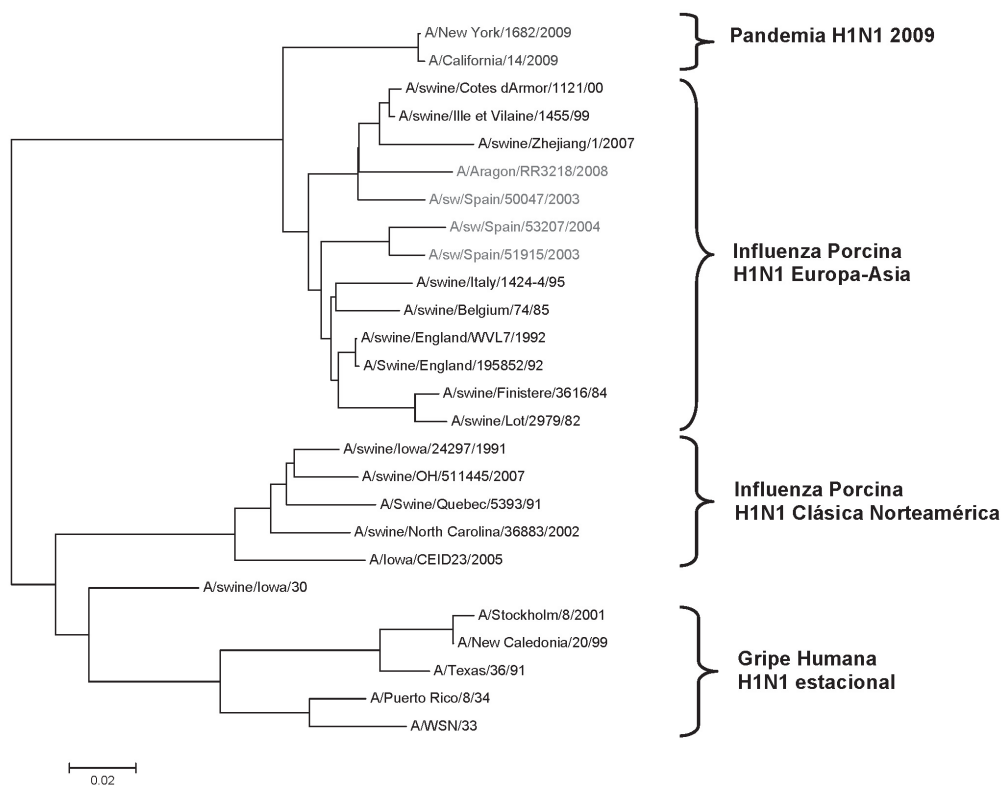
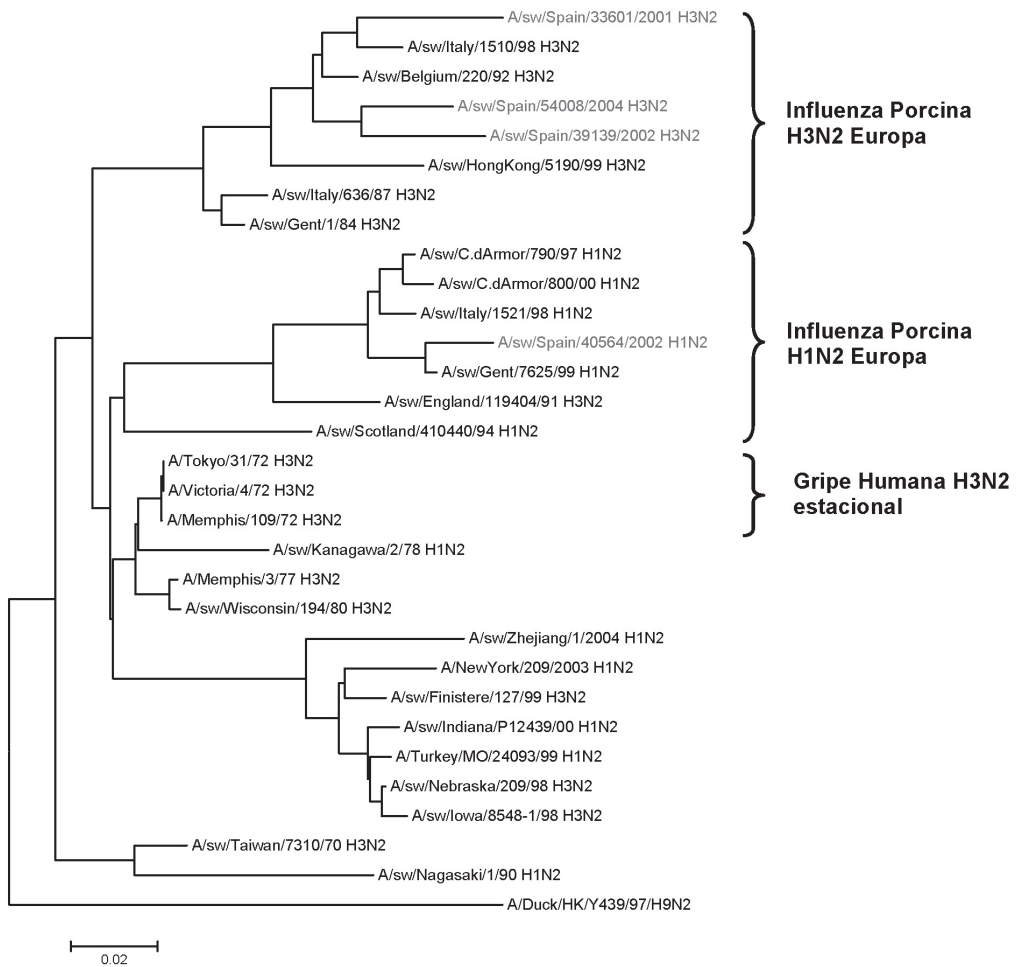


Figura 4: Árbol filogenético de la secuencia de nucleótidos de NA1

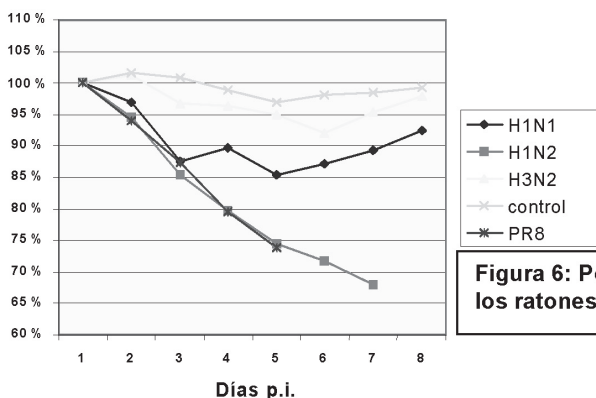


**Figura 5: Árbol filogenético de la secuencia de nucleótidos de NA2**

## 6. INFECCIÓN DE RATONES BALB/C CON VIRUS DE INFLUENZA PORCINA.

Para los experimentos de inoculación de virus Influenza porcinos en ratones se utilizaron ratones hembra de raza Balb/c de 8 semanas de edad. Todos los experimentos de infección experimental se llevaron a cabo en condiciones de alta seguridad biológica BSL3.

En un primer experimento, se hicieron 5 grupos de ratones (8 ratones/grupo) y cada grupo fue inoculado con 105ufp de cada uno de los subtipos de Influenza Porcina: H1N1, H1N2 y H3N2. Un cuarto grupo fue inoculado con 103 ufp de virus A/Puerto Rico/8/34, cepa adaptada al ratón, y el quinto se utilizó como control. Se observó pérdida de peso en todos los animales infectados entre el 2º y 5º día postinfección (Figura 6). Los animales inoculados con H1N2 murieron como consecuencia de la infección, el resto se recuperaron entre el 6º y 7º día.



**Figura 6: Porcentaje de pérdida de peso de los ratones inoculados con Influenza porcina**

Se hizo necropsia de 3 ratones de cada grupo a las 24, 48, 72 y 96 h, cogiendo los pulmones y la tráquea para la extracción de RNA y la RT•PCR (Figura 7) y la titulación viral (Figura 8).

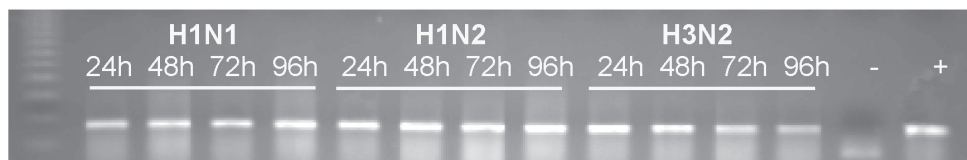
La extracción de RNA de las muestras recogidas se realizó con un método comercial basado en columnas de sílice: Viral RNA Isolation Nucleospin, de Macherey-Nagel, partiendo de 150  $\mu$ l de muestra y resuspendiendo el RNA obtenido tras la extracción en 50  $\mu$ l de agua estéril y libre de RNAsas. A partir del RNA extraído se detectó la presencia del virus por RT-PCR amplificando una región muy conservada de 100 pb del gen de la matriz. La reacción se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ l con el kit de Qiagen de OneStep RT-PCR a una concentración de 400  $\mu$ M de cada dNTP,

0.6  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 1  $\mu$ l de Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix y 5U/ reacción de Rnase Inhibitor. El protocolo de RT-PCR llevado a cabo es el siguiente: retrotranscripción durante 30 minutos a 50° C, desnaturalización a 95° C 15 minutos y 40 ciclos con un primer tiempo de desnaturalización de 30 segundos, anillamiento 30 segundos a 59° C y un paso de elongación de 30 segundos a 72° C, el proceso tuvo un paso último de 72° C durante 7 minutos.

El producto amplificado se corrió en un gel de agarosa al 3% y fue visualizado con bromuro de etidio en un transiluminador de luz UV.

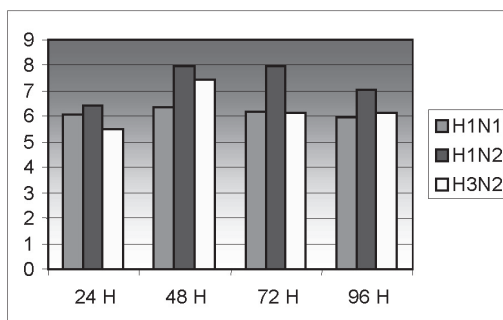
La secuencia de los oligonucleótidos utilizados es la siguiente:

- M-25: 5' AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG 3'
- M-124: 5' TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG 3'



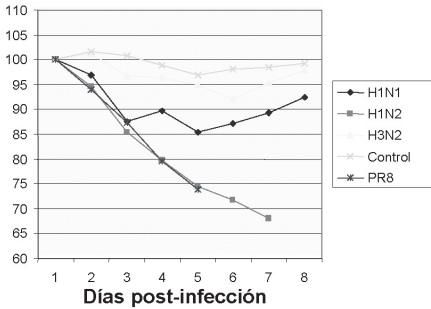
**Figura 7:** RT-PCR de macerado de pulmón tras la infección con IP a diferentes tiempos p.i.

Los resultados de titulación viral en pulmón (Figura 8), muestran que el H1N2 alcanza mayor replicación en tejido pulmonar que el H1N1 y que el H3N2, lo que se corresponde con una mayor patogenicidad en ratón. Además, los títulos mayores se alcanzaron entre las 48-72 h postinfección.



**Figura 8:** Título viral por TCID<sub>50</sub>/100 mg (log) de pulmones de ratón inoculados con 10<sup>5</sup> ufp de cada subtipos de IP a diferentes tiempos postinfección

En un segundo experimento, ratones preinfectados con H1N1 y H3N2 fueron desafiados con 105 ufp de H1N2, los resultados se muestran en la Figura 9: la exposición previa frente a otro subtipo, induce una respuesta protectora parcial frente a la infección con virus H1N2 reflejada en una menos pérdida de peso y mortalidad . La protección no es debida a los anticuerpos frente a la HA ya que no se detectaron anticuerpos reactivos frente a la HA de H1N2 por IHA en el suero de ratones preinfectados con H1N1 y H3N2 (Tabla 3), además la protección parece ser más eficaz cuando la infección previa es con virus H3N2, esto podría deberse a los anticuerpos crosreactivos frente a la NA.

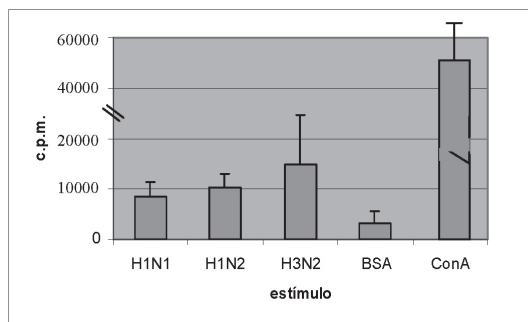


Subtipo	H1N1	H3N2
H1N1	>1280	<10
H1N2	<10	<10
H3N2	<10	>1280

Tabla 3: IHA de ratones preinfectados con H1N1 y H3N2

Figura 9: Porcentaje de pérdida de peso tras inoculación con el virus H1N2 de ratones preinfectados con H1N1 y H3N2

Las proteínas internas de las cepas porcinas tienen una elevada homología, éstas, principalmente la NP y la M están relacionadas con una respuesta inmune de tipo celular que no da lugar a una respuesta inmune protectora, pero podría estar relacionada con la protección inducida por la infección previa con H1N1. En experimentos de linfoproliferación (Figura 10) con esplenocitos de los ratones preinmunizados con H3N2 y desafiados con H1N2 no se observaron diferencias claras tras la estimulación con los tres subtipos lo que indicaría la homología de la inmunidad celular entre los tres subtipos.



**Figura 10: Linfoproliferación de esplenocitos de ratones infectados con H3N2 y estimulados con antígeno viral de los tres subtipos.**

## 7. INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE CERDOS CON VIRUS DE INFLUENZA PORCINA

Se llevó a cabo la infección experimental, bajo condiciones de alta seguridad biológica, de 36 cerdas, de raza Landrace y 6 semanas de edad, con tres subtipos del Virus de la Influenza Porcina (*H1n1*, *H1n2* y *H3n2*) aislados en España.

Los animales, seronegativos frente al virus de la gripe y libres también de otros agentes infecciosos (virus del Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino y *Mycoplasma spp*), fueron mantenidos en cuarentena y sometidos a un tratamiento con antibióticos de amplio espectro.

Se realizaron 3 experimentos independientes, uno para cada subtipo viral, con 12 cerdos por grupo (10 inoculados y 2 controles), y se inoculó a cada animal, por vía intratraqueal,  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de placa (UFP) en 1 ml de PBS de los siguientes virus: A/Swine/Spain/50047/2003 (*H1N1*), A/swine/Spain/40564/2002 (*H1N2*) y A/swine/Spain/54008/2004 (*H3N2*), aislados en cerdos de explotaciones ganaderas españolas y caracterizados antigénica y genéticamente en nuestro laboratorio.

A las 24, 72 horas y 8º día postinfección se sacrificaron dos cerdos y se realizó la necropsia completa tomando muestras de: cornete, tráquea craneal, media y caudal, todos los lóbulos pulmonares, tonsila y nódulos linfoides retrofaríngeo y mediastínico.

Las muestras se fijaron en formol y fueron incluidas en parafina sintética a modo de bloque. Los cortes histológicos, obtenidos a 4-5  $\mu\text{m}$  de grosor, se desparafinaron en xilol, se hidrataron en una serie decreciente de alcoholes y agua, y a continuación se realizaron: la tinción de Hematoxilina-Eosina convencional, el ácido peryódico

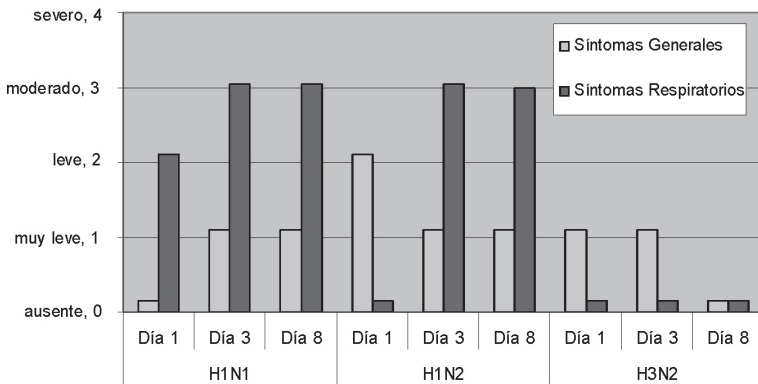
de Schiff (PAS), el tricrómico de Masson y una técnica inmunohistoquímica para determinar la presencia viral en los tejidos estudiados mediante la detección de la nucleoproteína del virus Influenza empleando un anticuerpo primario policlonal, obtenido en conejo, frente a la misma. Finalmente, se deshidrataron primero en una serie creciente de alcoholes, después se bañaron en xilol y se montaron con DPX®.

Diariamente se registró la temperatura rectal y el peso de todos los cerdos del experimento y se valoraron los signos clínicos generales (pérdida de peso, apatía, anorexia, etc.) así como los síntomas respiratorios (disnea, taquipnea, descarga nasal y conjuntivitis).

Además, se valoró macroscópicamente el porcentaje de neumonía de todos los lóbulos pulmonares así como el aumento de tamaño de los linfonódulos asociados al tracto respiratorio.

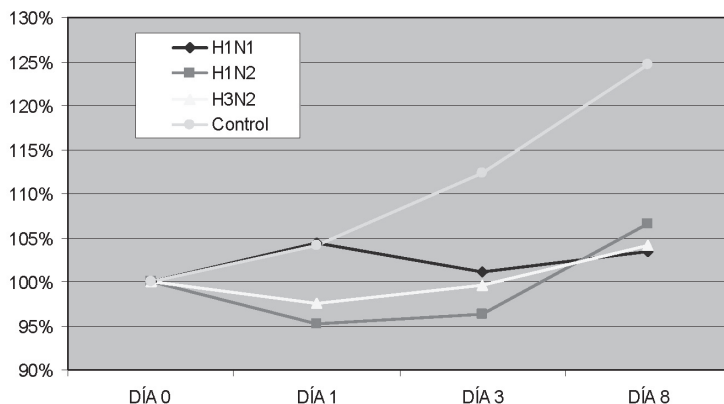
### 7.1 Estudio clínico

El comienzo de la infección fue de carácter agudo, apareciendo los primeros síntomas desde las 24 horas postinoculación. Los signos clínicos mostrados por los animales infectados fueron: anorexia, apatía, disnea leve, en ocasiones respiración abdominal, estornudos y descarga nasal; todos ellos de tipo muy leve a moderado, afectando principalmente a los animales inoculados con H1N1 y H1N2 (Figura 11).



**Figura 11.** Gravedad y evolución en el tiempo de los síntomas generales y respiratorios de los animales infectados de forma experimental con distintos subtipos del Virus de la Influenza Porcina.

Todos los animales sufrieron un retraso en el crecimiento con pérdida de hasta un 5% de peso respecto a los cerdos control, recuperándose entre las 72 horas y el 6° día postinfección (Figura 12).

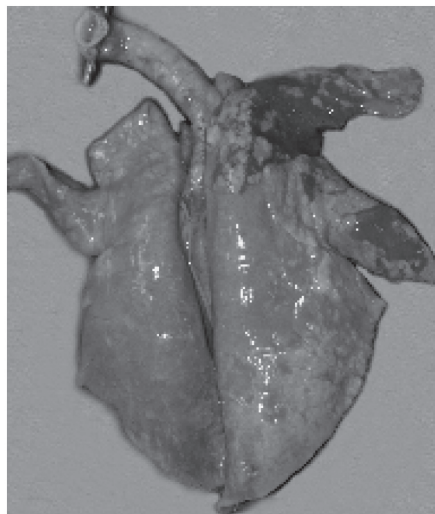


**Figura 12.** Porcentaje de pérdida de peso, respecto de los cerdos control, en animales infectados de forma experimental con distintos subtipos del Virus de la Influenza Porcina.

## 7.2 Estudio macroscópico

En general, los tres subtipos del virus de la Influenza Porcina (H1N1, H1N2 y H3N2) mostraron un **mismo patrón de lesiones macroscópicas pulmonares**. Se observó una mayor afectación de los lóbulos craneales pulmonares respecto de los caudales, siendo mayor la extensión de las lesiones con el tiempo (encontrándose más neumonía al octavo día de infección) (Figura 15).

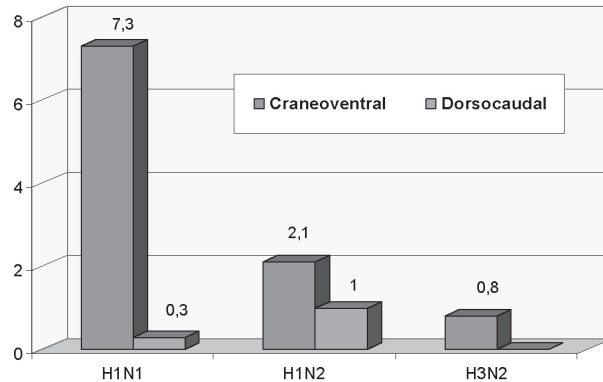
Como hallazgo principal en los animales se evidenció una consolidación pulmonar, fundamentalmente en localización **craneoventral** del pulmón (Figura 13).



**Figura 13.** Bronconeumonía por H1N1 a las 72 horas post-infección.

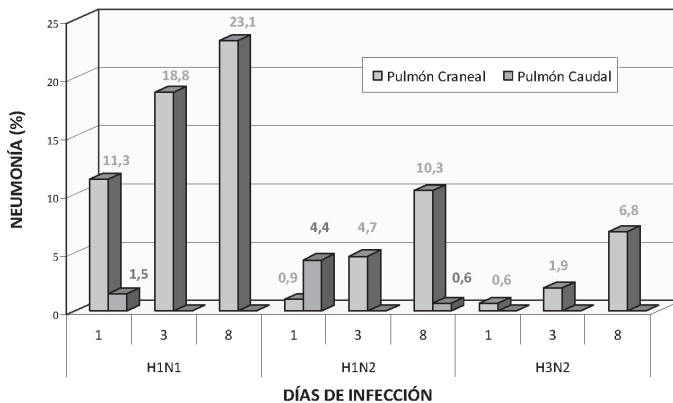


El subtipo que mayores alteraciones macroscópicas produjo fue el H1N1, mientras que los animales inoculados con H1N2 y H3N2 presentaron porcentajes de bronconeumonía intermedios o menores que H1N1 respectivamente (Figura 14).



**Figura 14.** *Afectación del pulmón craneal y caudal (%) respecto del total en función del subtipo viral inoculado.*

No obstante, cabe destacar la elevada afectación pulmonar a nivel dorsocaudal en la infección por H1N2 (Figura 14). Así, los animales infectados por H1N2 presentaron una bronconeumonía muy extensa a día 1 en comparación con H1N1, que incluso superaba a la afectación pulmonar observada a nivel craneoventral (Figura 15).



**Figura 15.** *Porcentaje de parénquima pulmonar con neumonía en función del subtipo viral (H1N1, H1N2, H3N2) y del día de infección (días 1, 3 y 8).*

Las lesiones se caracterizaron por ser más congestivas y prominentes (bronconeumonía catarral) en los primeros días de infección (Figura 16), mientras que más firmes, oscuras y deprimidas (bronconeumonía supurativa subaguda) al cronificarse con el tiempo (Figura 17).

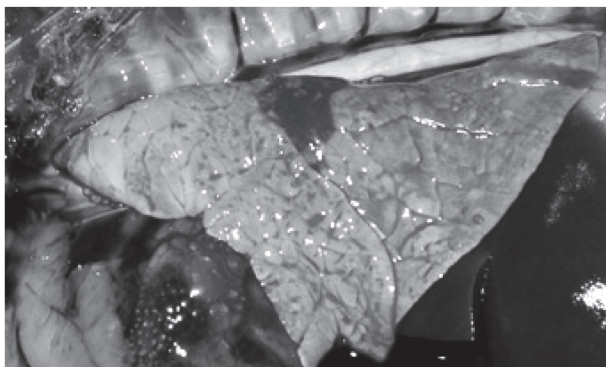


Figura 16. Bronconeumonía catarral por H1N2 a las 24 horas post infección (lesiones congestivas y prominentes).

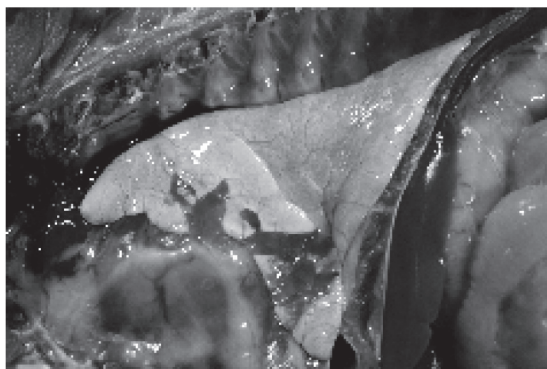


Figura 17. Bronconeumonía supurativa subaguda por H1N1 al 6º día post infección (lesiones oscuras, deprimidas y de consistencia firme).

En cuanto a los nódulos linfoides regionales, concretamente los linfonódulos retrofaríngeo y mediastínico, éstos presentaban linfadenomegalia como lesión macroscópica principal (Figura 18).

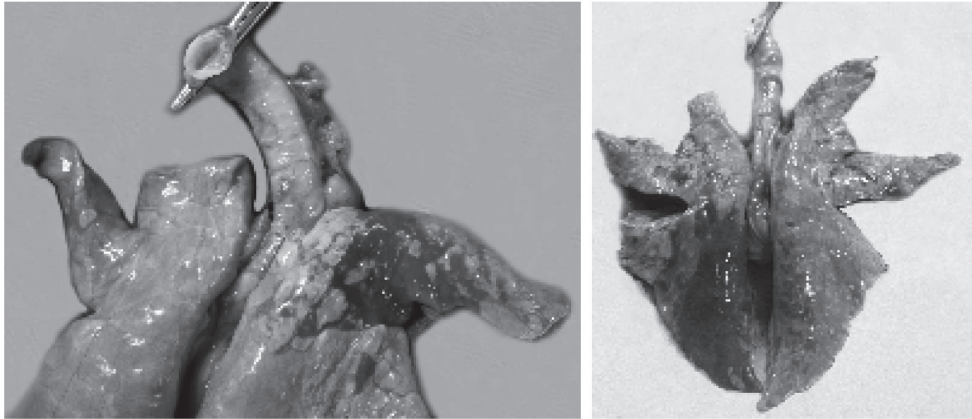
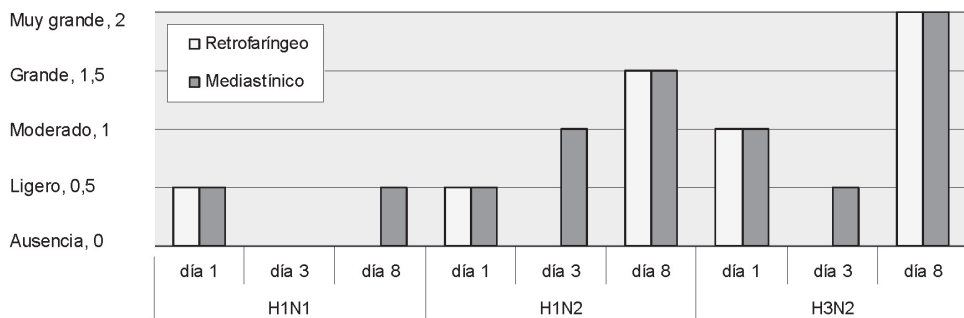


Figura 18. Linfadenomegalia de los nódulos linfoides asociados al aparato respiratorio (linfonódulos bronquial y mediastínico).

El linfonódulo mediastínico se encontraba aumentado de tamaño en todos los animales del estudio durante toda la infección, a excepción del subtipo H1N1 a día 3 postinfección. Sin embargo, en el nódulo linfoide retrofaríngeo sólo se halló un aumento de tamaño en los días 1 y 8 postinfección (únicamente a día 1 en el caso del subtipo H1N1), dado que experimentó una involución a su tamaño normal durante el tercer día de infección en todos los subtipos. Además, esta regresión en el tamaño a día 3 postinfección fue observada en ambos linfonódulos para todos los subtipos (salvo en el nódulo linfoide mediastínico de animales infectados con H1N2) (Figura 19).



**Figura 19.** Aumento de tamaño de los nódulos linfoides retrofaríngeo y mediastínico en función del subtipo inoculado (H1N1, H1N2 y H3N2) y del día de infección (1, 3 y 8).

### 7.3 Estudio histopatológico

En general, todos los subtipos provocaron una traqueítis descamativa, que fue muy leve en el caso del subtipo H3N2, leve en H1N1 y moderada en H1N2 (Figura 20).

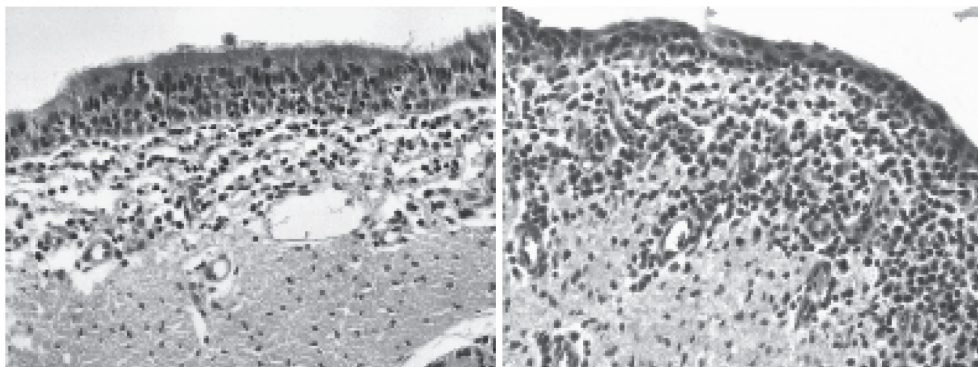
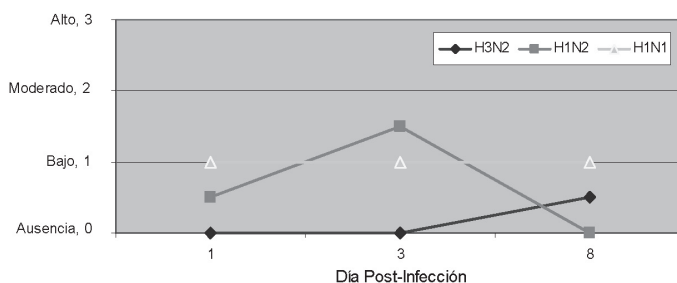


Figura 20. Traqueítis descamativa leve por H1N1 (izda) y moderada por H1N2 (dcha) a las 24 horas post-infección. Técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E), 20x.

Los tres subtipos se caracterizaron por la presencia de edema ligero y **un infiltrado inflamatorio predominantemente de células redondas** (linfocitos, macrófagos y células plasmáticas).

A diferencia del H3N2, los subtipos **H1N1 y H1N2 resultaron ser más lesivos** dado que provocaron amplias zonas de erosión y úlcera a nivel del epitelio traqueal (Figura 21).



**Figura 21.** Grado de erosión y ulceración de la mucosa traqueal en función del subtipo viral y del tiempo.

Sin embargo, el subtipo **H1N2 produjo lesiones ligeramente más graves a nivel traqueal que el H1N1**, pero éstas afectaron a menor número de animales; mientras

que el **H1N1 provocó lesiones algo menos graves** pero constantes en todos los animales del grupo.

A nivel de los cornetes, se observó una rinitis de tipo descamativo de grado variable. Estadísticamente se comprobó que H1N1 producía lesiones significativas de mayor grado agudas que H3N2 ( $p = 0,001$ ) y crónicas que H1N2 ( $p = 0,007$ ). Entre las lesiones halladas, destacaron la erosión o úlcera y la hiperplasia del epitelio (Figura 22). En la infección por H1N1 sobresalía la erosión (grado moderado), en H3N2 la hiperplasia (moderada) y en H1N2 ambos parámetros se encontraron en un grado ligero. Además se vio, independientemente del subtipo valorado, un predominio de células redondas en el infiltrado inflamatorio.

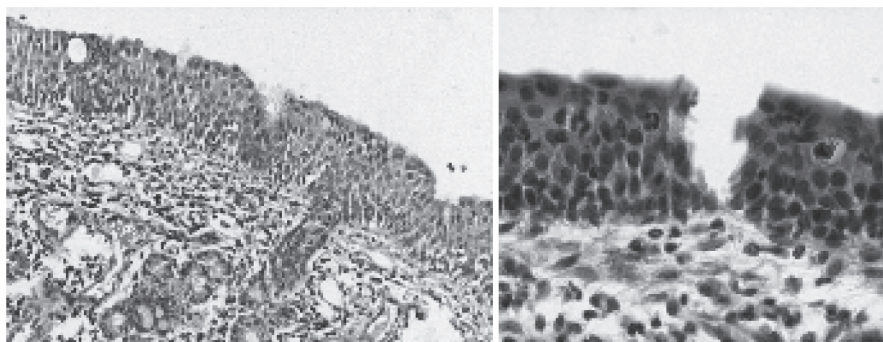


Figura 22. Zonas de hiperplasia (izda, 10 X), erosión y úlcera (dcha, 40 X) de la mucosa de los cornetes de animales inoculados con H1N1 y sacrificados durante la fase aguda de la infección. Técnica de H-E.

A nivel del **tracto respiratorio inferior** se encontraron también diferencias histopatológicas entre los distintos subtipos, pero de carácter sutil. En el caso del subtipo H1N2 los animales presentaron una **alveolitis descamativa leve** tanto en pulmón craneal como caudal, pero de mayor grado que en los subtipos H1N1 y H3N2, donde resultó ser muy leve. En relación con el curso de la infección, en los tres subtipos el grado de descamación resultó ser mayor al 8° día en pulmón craneal. Caudalmente el subtipo H1N2 presentó mayor descamación a día 1 (Figura 23).

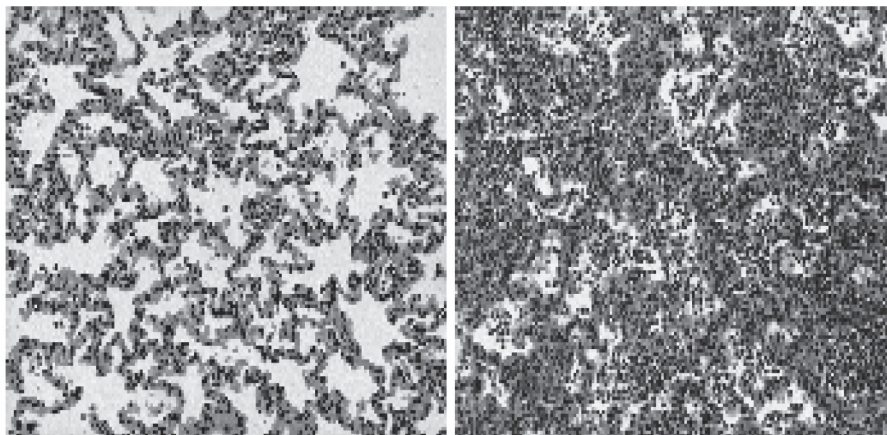


Figura 23. Alveolitis descamativa leve a nivel craneal (izda) y moderada a nivel caudal (dcha) del pulmón en la infección por H1N2 a las 24 h. Técnica de H-E, 10 X.

En general, todos los animales mostraron un infiltrado inflamatorio, predominantemente de linfocitos y macrófagos, que fue considerablemente mayor a nivel craneal del pulmón que caudalmente. El grado de inflamación se valoró a tres niveles y se comparó entre los tres subtipos. A nivel **pericanalicular** (Figura 24) este infiltrado fue significativamente mayor ( $p = 0,008$ ) en el pulmón caudal para H1N2 que H1N1, mientras que cranealmente no se encontraron diferencias entre subtipos.

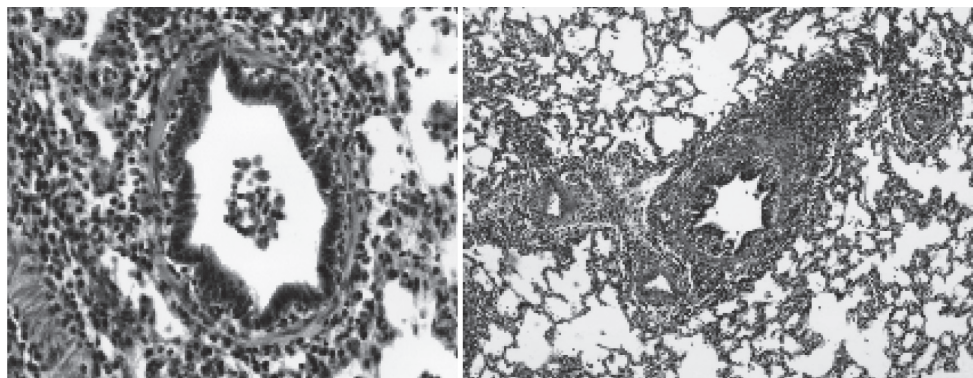


Figura 24. Inflamación crónica pericanalicular por H1N2 (izda, 20 X) y perivascular por H1N1 (dcha, 10 X). Técnica de H-E.

A nivel **perivascular e interalveolar** (Figura 25), el infiltrado de células inflamatorias redondas fue muy similar en pulmón craneal y caudal respectivamente independientemente del subtipo inoculado y del día de infección.

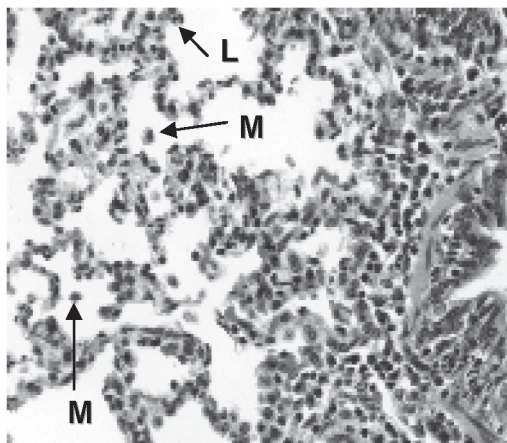


Figura 25. Macrófagos (M) y linfocitos (L) a nivel interalveolar en la infección por el subtipo H1N1. Técnica de H-E, 20 X.

Al determinar la fibrosis pulmonar, se vieron valores similares para H1N1 y H1N2, tanto en zona craneal como caudal, y superiores a los encontrados en H3N2. El **grado de fibrosis intralveolar** (Figura 26) fue mayor para el subtipo H1N1 en todo el pulmón, observándose principalmente hacia el final de la infección. En H1N2 el grado de fibrosis fue inferior que en H1N1, pero sólo a nivel craneal pulmonar, dado que caudalmente se encontraron valores similares. Por otro lado, los animales inoculados con H3N2 no mostraron fibrosis del parénquima pulmonar en ningún momento.

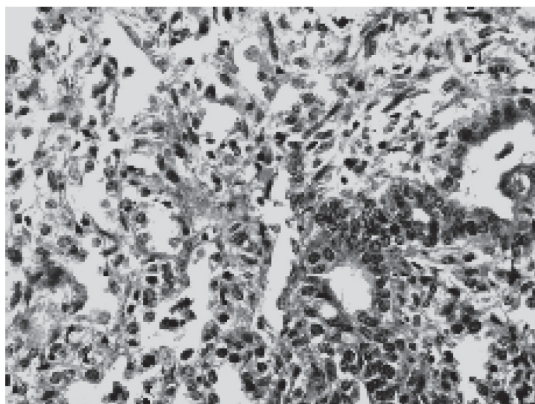


Figura 26. Fibrosis intralveolar por H1N2 en pulmón central. Tricrómico de Masson, 20 X.

A nivel **septal o interalveolar** (Figura 27) se evidenció un grado leve de fibrosis, pero las diferencias encontradas fueron mínimas.

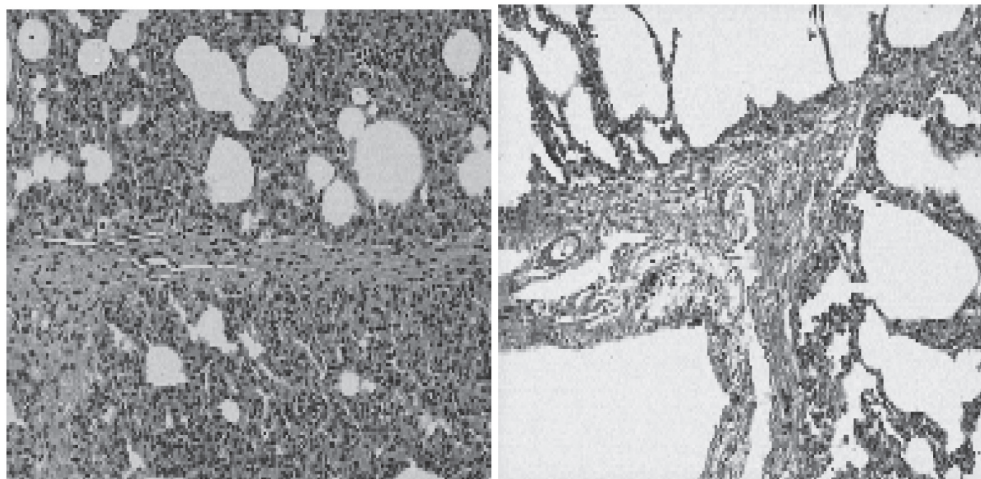


Figura 27. Fibrosis septal por H1N1 en pulmón craneal. Técnica de H-E (izda) y Tricrómico de Masson (dcha), 10 X.

A nivel de los **órganos linfoides** también se encontraron hallazgos histopatológicos de gran interés en la infección por virus Influenza. Los linfonódulos regionales, retrofaríngeo y mediastínico, presentaron lesiones microscópicas de grado variable en función del subtipo viral. En general, los folículos linfoides se encontraban muy activados en los tres subtipos. En los nódulos linfáticos infectados por H1N1 y H1N2 se observó una depleción linfoide (Figura 28) de grado leve a moderado durante toda la infección, siendo ligeramente mayor para H1N1 que para H1N2 (excepto para H1N2 a nivel mediastínico, donde se observó únicamente hacia la fase aguda de la misma).

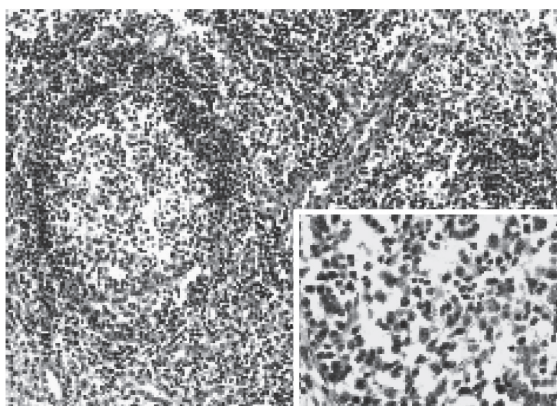


Figura 28. Depleción linfoide del nódulo mediastínico por H1N1. Técnica de H-E, 10 X (izda) y 40 X (dcha).



Además de la depleción, el subtipo H1N1 mostró una moderada histiocitosis sinusal (Figura 29) en el nódulo mediastínico, presente a lo largo de toda la infección, y hemosiderosis de grado medio también durante la misma. Sin embargo, el subtipo H3N2 causó una depleción muy leve en ambos linfonódulos hacia la fase crónica de la infección y se caracterizó por la presencia de edema moderado constante y una moderada proliferación de histiocitos en localización retrofaríngea, sobre todo hacia la fase final del estudio. El subtipo H1N2 presentó valores intermedios entre los otros virus para parámetros tales como el edema a nivel retrofaríngeo, la hemosiderosis, la histiocitosis sinusal y la depleción linfoide anteriormente citada.

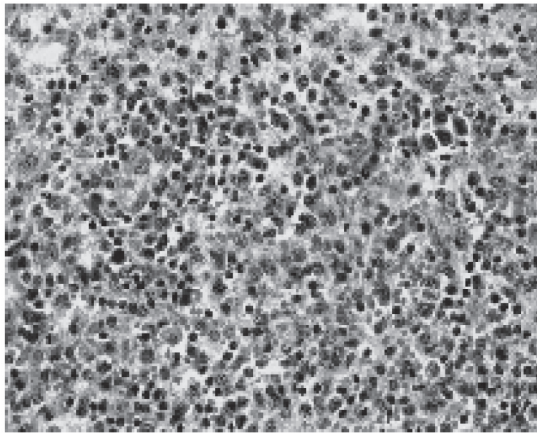


Figura 29. Histiocitosis sinusal del linfonódulo mediastínico por H3N2.  
Técnica de H-E, 20 X .

La tonsila se encontraba muy reactiva en todos los animales durante toda la infección. Se observó una importante depleción linfoide, pero de bajo grado, como consecuencia de la infección por los virus H1N1 y H3N2 (muy bajo en H1N2).

Todos los animales del experimento mostraron una hiperplasia de la zona cortical del timo durante todo el estudio, a excepción de aquellos inoculados con el virus H1N1. En estos últimos, se observó una atrofia de la zona medular durante la fase aguda de la infección.

#### 7.4. Estudio inmunohistoquímico

Los tres subtipos virales infectaron el **tracto respiratorio superior** de los animales durante la fase aguda de la infección. Las células diana principales fueron las del

**epitelio respiratorio** (Figura 30), aunque también se infectaron, pero en menor grado, los **linfocitos** (Figura 31) que acudieron al lugar de infección como mediadores de la respuesta inflamatoria. La mayor presencia viral se observó en las células epiteliales y linfocitos de la tráquea de los animales infectados con H3N2 y H1N2 respectivamente, y en las células epiteliales, linfocitos y macrófagos de los cornetes nasales de los animales inoculados con H1N2. La presencia de H1N1 en tráquea fue reducida, afectando sólo a unas pocas células epiteliales y no se detectaron antígenos virales en los cornetes de animales infectados con H1N1 y H3N2.

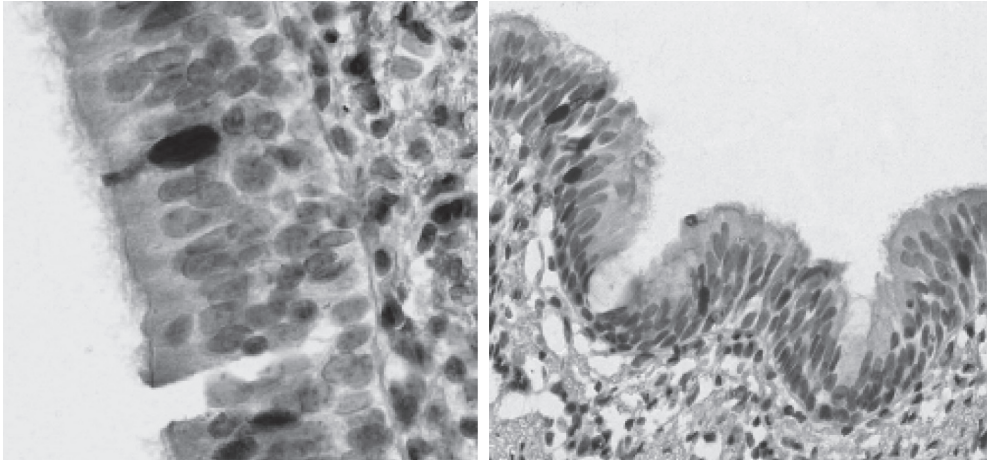


Figura 30. Detección inmunohistoquímica del subtipo H3N2 del virus de la Influenza Porcina en células epiteliales de la tráquea de animales sacrificados a las 24 horas post-infección

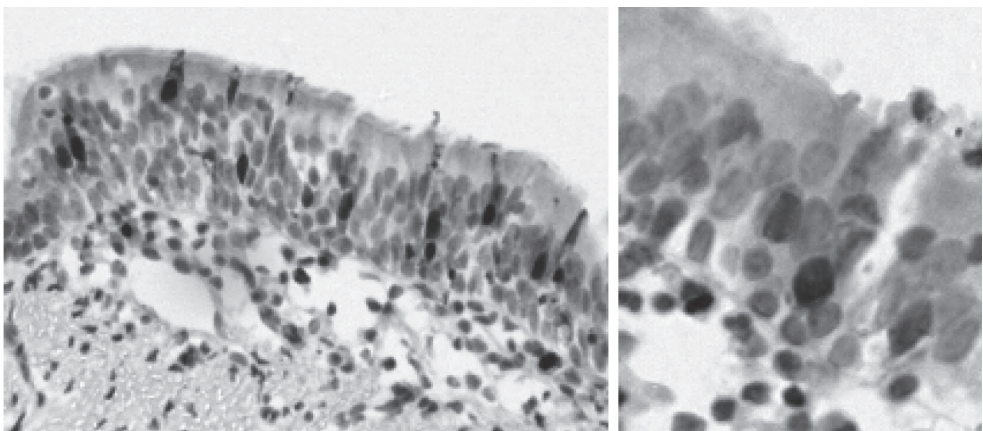


Figura 31. Detección inmunohistoquímica del subtipo H1N1 en células epiteliales bronquiolares, linfocitos y macrófagos del LCD del pulmón de animales sacrificados a las 24 horas post-infección

Además de la tráquea y los cornetes, también se vio afectado el tracto respiratorio inferior de los animales. El epitelio respiratorio pulmonar (bronquio, bronquiolo y alveolo) resultó ser también una de las dianas principales para la replicación viral. Se observó presencia viral en células epiteliales, linfocitos y macrófagos tanto del lóbulo craneal derecho (LCD) como del lóbulo caudal izquierdo (LCdI) del pulmón, aunque con diferencias entre los distintos subtipos.

El subtipo **H1N1 siguió el patrón clásico de infección**, detectándose presencia viral en el LCD a día 1 postinfección y en el LCdI a días 3 y 8 postinfección, pero en menor medida (Figuras 32 y 33).

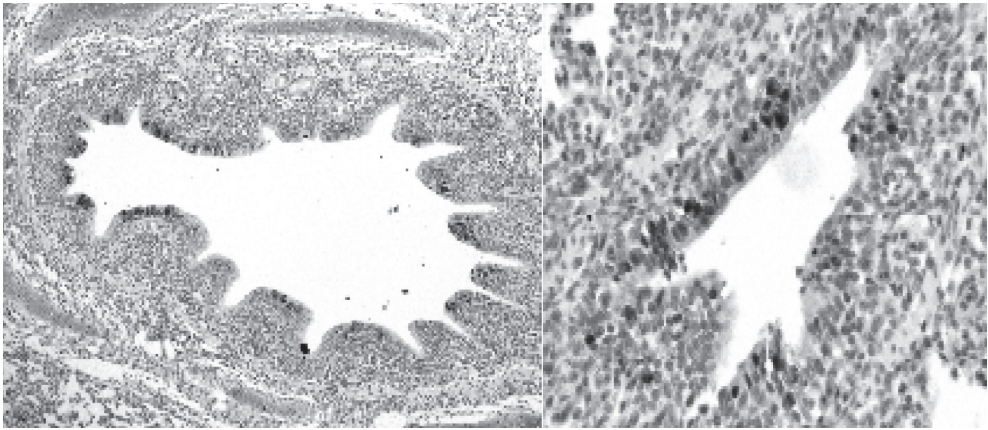


Figura 32. Detección inmunohistoquímica del H1N1 en células epiteliales bronquiolares y bronquiolares, linfocitos y macrófagos del LCD del pulmón de animales sacrificados a las 24 horas post-infección.

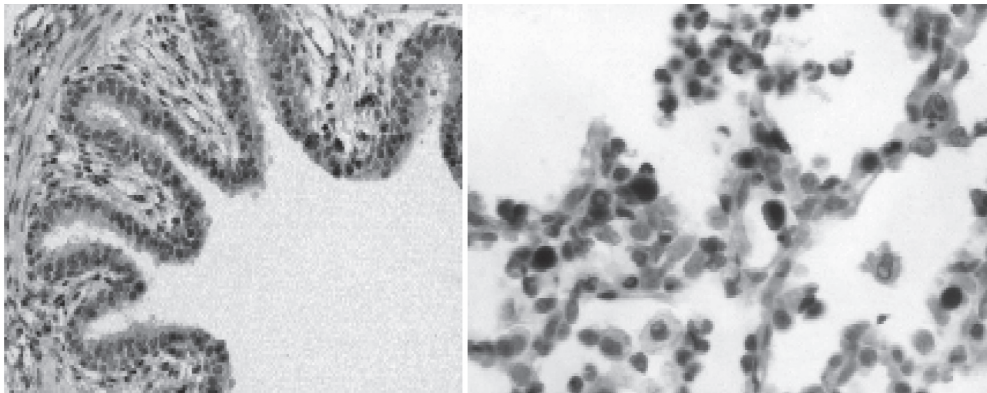


Figura 33. Detección inmunohistoquímica del H1N1 en células epiteliales bronquiolares y bronquiolares del LCdI, del pulmón de animales sacrificados al tercer y octavo día post-infección

El subtipo **H1N2** estuvo presente tanto en pulmón craneal como caudal a días **1 y 3 post-infección**, permaneciendo puntualmente en macrófagos del parénquima pulmonar del lóbulo craneal derecho al 8° día post infección y desapareciendo por completo del lóbulo caudal izquierdo ese mismo día (Figura 34).

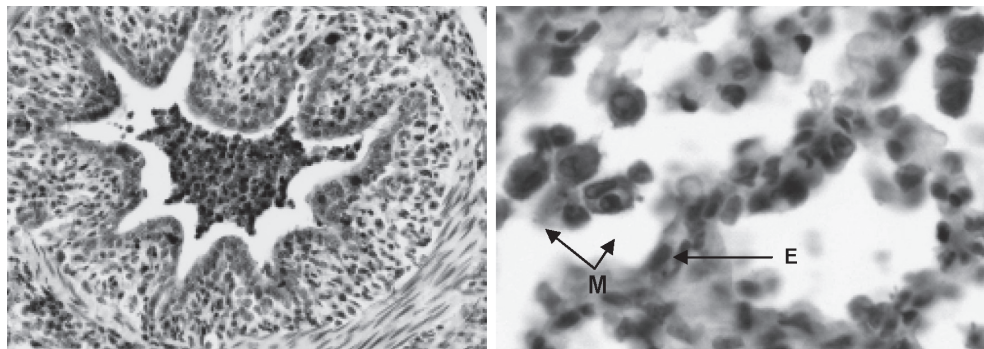


Figura 34. Detección inmunohistoquímica de H1N2 en células epiteliales, linfocitos y macrófagos del pulmón caudal (LCdI) de animales sacrificados 24 horas post-infección (Izda 20 X, dcha 40 X).

A diferencia de estos subtipos, el subtipo H3N2 (Figura 35) se mantuvo en niveles importantes, tanto en pulmón craneal como caudal, hasta el 8° día postinfección, apareciendo en el lóbulo caudal izquierdo hacia el tercer día post-infección.

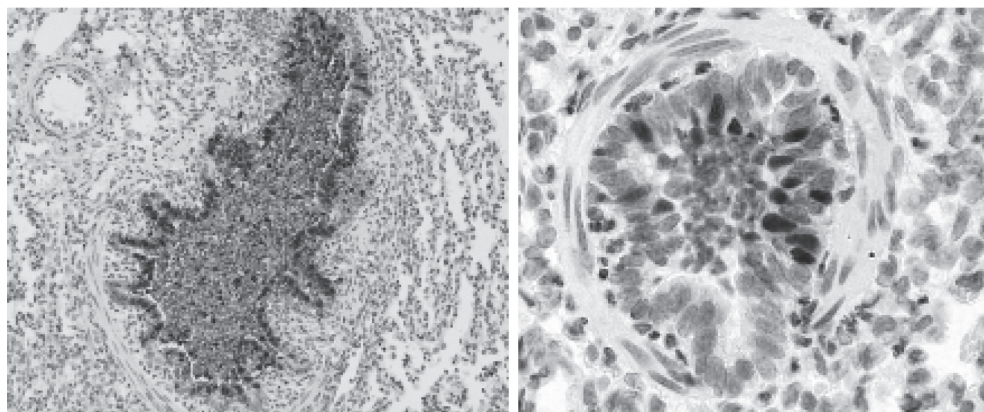


Figura 35. Detección inmunohistoquímica de H3N2 en células epiteliales, linfocitos y macrófagos del pulmón craneal (LCD) de animales sacrificados 24 horas post-infección (Izda 10 X, dcha 40 X).

En cuanto al tejido linfoide, cabe destacar que **no se detectó presencia viral en el linfonódulo mediastínico y la tonsila en el caso del subtipo H1N1**, pero sí en los subtipos restantes. Ambos subtipos, H1N2 y H3N2, estaban presentes en bajo grado en las células epiteliales de la tonsila a las 24 horas de infección, desapareciendo por completo a lo largo de la misma (Figura 36).

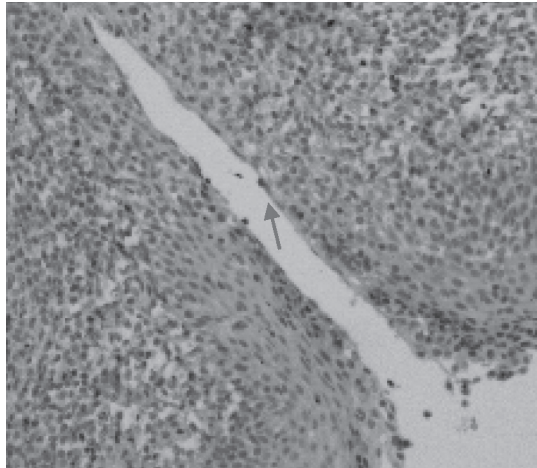


Figura 36. Detección inmunohistoquímica de H1N2 en células epiteliales de la tonsila a las 24 horas post-infección 10 X.

Sin embargo, la presencia viral en el nódulo linfoide mediastínico fue detectable desde las 24 y 72 horas postinfección para el H3N2 y H1N2 respectivamente, manteniéndose durante todo el transcurso de la misma (Figura 37).

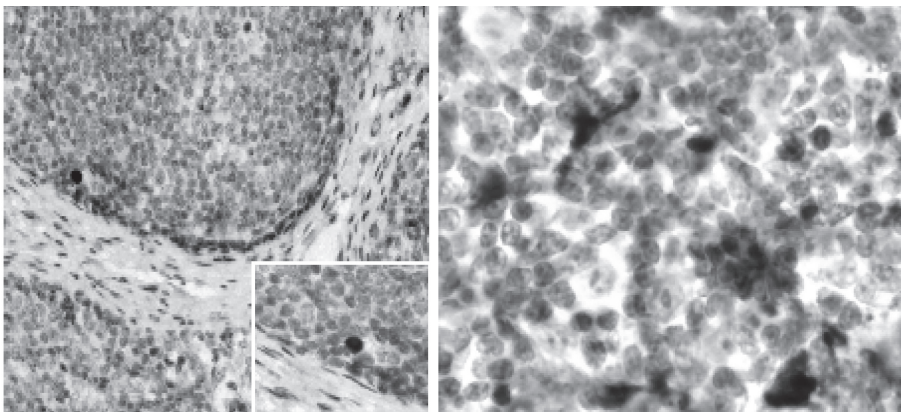
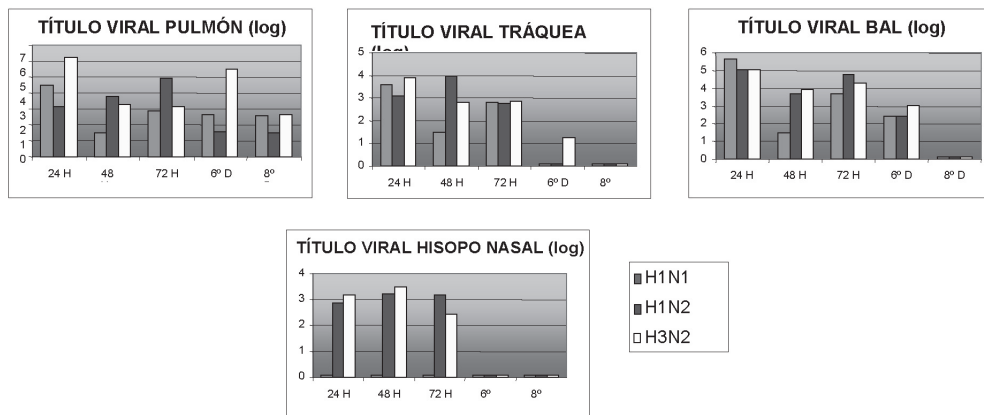
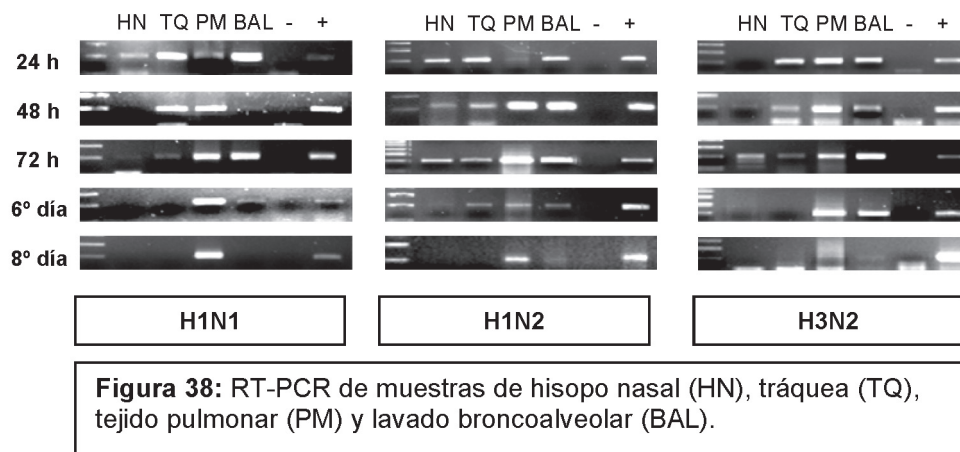


Figura 37. Detección inmunohistoquímica de H1N2 (izda) y H3N2 (dcha) en linfocitos y células dendríticas del nódulo linfoide mediastínico al tercer día post-infección. 40 X.

Para estudiar la presencia de virus en distintas localizaciones del tracto respiratorio se realizaron RT-PCR. En la figura 39 se muestra los resultados de RT•PCR en muestras de tejido pulmonar, tráquea, hisopo nasal y lavado broncoalveolar (BAL). Las muestras que resultaron ser positivas en la RT•PCR se inocularon en células para titulación viral por TCID<sub>50</sub>/100 miligramos (Figura 38).



**Figura 39:** Titulación viral por TCID<sub>50</sub>/100 miligramos de tejido de tráquea y pulmón y por TCID<sub>50</sub>/mililitro de hisopo nasal, y lavado broncoalveolar (BAL).

Los subtipos H3N2 y H1N2 mostraron una gran eliminación vía nasal con elevados títulos en secreciones nasales, lo que les hace altamente transmisibles, por el contrario el H1N1 no se detectó a lo largo del experimento en hisopo nasal mostrando mayor replicación en tráquea y pulmón. En la infección por los tres virus se alcanzaron elevados títulos en pulmón entre las 24•72 horas detectándose incluso a día 8 postinfección.

## DISCUSIÓN

### 1. PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR INFLUENZA PORCINA

El estudio epidemiológico realizado ha mostrado la alta prevalencia de la Influenza porcina en España: el 83% de los sueros analizados por IHA fueron positivos a uno o más subtipos. Por otra parte, la elevada incidencia de dobles y triples infecciones (79% de las granjas positivas) indica una alta tasa de coinfecciones con distintos subtipos lo cual pone de manifiesto la falta de protección cruzada entre ellos. Es interesante indicar que el estudio se ha realizado en cerdos de engorde cuyo ciclo de vida es sólo de alrededor de un año. La existencia de múltiples coinfecciones tiene gran importancia desde el punto de vista epidemiológico ya que se incrementa la posibilidad de generación de nuevas cepas virales por combinación de las existentes.

La prevalencia en España se corresponde con la de otros países europeos como Bélgica, donde un estudio de 1998, mostró que el 100% de las granjas muestreadas eran seropositivas (**Van Reeth 2003**).

### 2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL AISLADO H1N2 A/SWINE/40564/SPAIN/2003

Aunque se han reportado aislados H1N2 principalmente en Norteamérica y Asia, originadas por reagrupamiento génico entre cepas porcinas clásicas H1N1 y cepas porcinas H3N2, el análisis filogenético de la HA y la NA del virus H1N2 A/Swine/40564/Spain/2003 confirma la elevada homología de su HA con aislados humanos H1N1 de los años 80 y la relación de la NA con cepas circulantes porcinas H3N2 coincidiendo con el origen filogenético de la mayoría de aislados H1N2 europeos circulantes actualmente. Aparte del virus H1N2, hemos determinado la secuencia del genoma completo de otros aislados españoles de los subtipos H1N1 y H3N2 que están siendo utilizados en los estudios filogenéticos del virus pandémico H1N1 de 2009 en

cuya composición se encuentran segmentos génicos de virus porcinos de procedencia euroasiática (**Garten R.J. y col., 2009**).

### 3. REACTIVIDAD CRUZADA

Los ensayos de Inhibición de la Hemaglutinación, Inhibición de la Neuraminidasa y de Seroneutralización mostraron que no existe reactividad cruzada entre anticuerpos frente a la HA de virus heterólogos así como entre virus homólogos como es el caso de los subtipos porcinos H1N1 y H1N2. Esto pone de manifiesto su origen filogenético diferente como se ha comentado anteriormente. Por otra parte, las NAs de H1N2 y H3N2 sí mostraron reactividad cruzada relacionándolo igualmente con su origen filogenético. Esta reactividad cruzada entre anticuerpos frente a la NA es de gran importancia dado que, aunque la respuesta inmune protectora está constituida por anticuerpos frente a la HA, estudios recientes en ratón han mostrado que la respuesta inmune frente a la NA puede dar lugar a un cierto grado de protección heterosubtípica (**Sylte, 2007**) con lo que tiene implicaciones en la protección conferida al hospedador preinmunizado con una cepa e infectado posteriormente con otra de NA similar.

Las vacunas actuales frente a gripe porcina sólo incluyen los subtipos H1N1 y H3N2 y no consideran ni la evolución antigénica de estos subtipos ni la aparición más reciente del H1N2. En la población humana las vacunas frente a la gripe son revisadas anualmente debido a la alta variabilidad antigénica de las cepas circulantes y a la aparición de nuevos subtipos como el H1N1 de origen porcino que se ha extendido mundialmente y frente al cual las vacunas existentes no son eficaces. Una de las razones de esa elevada variabilidad antigénica en la gripe humana es la presión inmune a la que se ve sometida el virus, esta presión no es tan manifiesta en la población porcina, la vacunación no es una práctica habitual y el cerdo es un animal de producción de ciclo corto con lo que la evolución del virus en el hospedador es más limitada. Hemos visto por los ensayos de reactividad cruzada que ésta es escasa entre subtipos lo que hace necesario estudiar la eficacia de las vacunas frente a las cepas circulantes actualmente y valorar la incorporación del subtipo H1N2.

### 4. PATOGENICIDAD EN RATÓN

Los resultados obtenidos en la infección experimental con virus de Influenza porcina en ratón mostraron que el subtipo H1N2 fue el más patógeno provocando la



muerte de los ratones infectados. Tras la infección con H1N2 los títulos alcanzados fueron mayores que tras la infección con los otros subtipos lo que se correspondería con una mayor virulencia.

El ratón es un buen modelo para estudiar la infección por virus Influenza porcina así como la inmunidad generada ante la infección con virus heterólogos en ratones preinmunizados valorando la calidad de esta protección en la respuesta tanto humoral como celular. Los anticuerpos frente a la HA son los que neutralizan la infectividad viral, los anticuerpos frente a la NA podrían dar cierta protección frente a la infección entre cepas de NA similar, en experimentos *in vitro* vimos que la reactividad cruzada entre anticuerpos frente a la HA es nula entre virus heterólogos y que existe una reactividad cruzada entre anticuerpos frente a la NA de H1N2 y H3N2 que podría otorgar una cierta protección cruzada, que aunque no impide la infección, sí podría, en cierto modo controlarla. Por otra parte no se observaron diferencias en la inmunidad celular entre los tres subtipos

## 5. PATOGENICIDAD EN CERDO

Los resultados obtenidos han mostrado que los tres subtipos del Virus de la Influenza Porcina (H1N1, H1N2 y H3N2) fueron capaces de inducir en los animales del estudio síntomas y lesiones compatibles con una infección por el virus de la gripe (**Thacker 2001, Landolt 2003, Jung 2005 y Sreta 2009**).

Todos los cerdos sufrieron un retraso en el crecimiento con pérdidas de peso de hasta el 5%, recuperándose entre las 72 horas y el sexto día post-infección, esto se corresponde con lo que sucede en el campo: tras la infección por virus Influenza se produce un retraso en el crecimiento de los animales lo que se traduce en importantes pérdidas económicas.

En nuestro estudio se afectaron en mayor grado los animales inoculados con los subtipos H1N1 y H1N2 que con H3N2, aunque los títulos virales alcanzados en tracto respiratorio fueron similares entre los tres subtipos las lesiones fueron más severas en los animales inoculados con H1N2 y no aparecieron lesiones macroscópicas reseñables en los cerdos inoculados con H3N2.

**A nivel macroscópico** se observó una mayor afectación craneoventral del pulmón, correspondiente con una **bronconeumonía intersticial** más extensa en el caso de los subtipos H1N1 y H1N2 en comparación con H3N2. Estos resultados coinciden con lo descrito por Sreta y col. en 2009, los cuales encontraron mayor lesión pulmonar

en los cerdos infectados con H1N1 respecto a los inoculados con H3N2. Sin embargo, en nuestro estudio pudimos apreciar una **mayor afectación dorsocaudal** del pulmón desde el primer día de infección, anteriormente no documentada en la bibliografía, en los animales inoculados con el subtipo H1N2.

A nivel del tracto respiratorio no se encontraron diferencias en cuanto al tipo de lesiones histológicas observadas en función del subtipo inoculado, pero sí en cuanto a la severidad de las mismas, siendo más lesivos los subtipos H1N2 y H1N1 que el subtipo H3N2, en los que sobresalían la erosión y la úlcera sobre la hiperplasia epitelial.

El estudio inmunohistoquímico demostró el tropismo específico de los tres subtipos del Virus de la Influenza Porcina por el **epitelio respiratorio**. También se observó una inmunotinción positiva en células mononucleares: **linfocitos y macrófagos**. La mayor presencia viral detectada a nivel del tracto respiratorio superior se correspondió con el subtipo H1N2 (seguido del H3N2), encontrándose incluso a nivel de los cornetes nasales de los animales hasta el tercer día de infección, ésto se corresponde con mayores títulos virales alcanzados en hisopo nasal y tráquea en los animales inoculados con H1N2 y H3N2, lo que indicaría una mayor transmisibilidad frente al subtipo H1N1. En general, en los cerdos inoculados con el subtipo H3N2 se observó el mayor grado de presencia viral en relación con el tiempo de infección.

Por otra parte, la mayor presencia viral en pulmón tras la inoculación con H3N2 no se corresponde con una mayor gravedad de las lesiones, este hecho unido a la mayor linfadenopatía asociada a las lesiones por H3N2 y a una depleción linfoide más marcada en los subtipos H1N1 y H1N2, indica que en la patogenia de la infección influyen tanto factores del propio virus, como factores del hospedador, concretamente relacionados con la respuesta inmune. Tal y como está descrito en gripe humana, la gravedad de las lesiones se encuentra muy asociada a una exacerbada respuesta inflamatoria del hospedador, por tanto, para comprender el curso y la severidad de la infección gripal, es necesario estudiar, no sólo los factores de virulencia del virus, sino también los mecanismos de respuesta inmune e inflamatoria del hospedador.

## CONCLUSIONES

1. Mediante el análisis de 1500 sueros por IHA se ha mostrado la elevada prevalencia de Influenza porcina en la cabaña porcina en España: 83% de los sueros analizados fueron positivos a uno o más subtipos

2. Existe una alta tasa de coinfecciones por diferentes subtipos lo que indicaría una ausencia de protección cruzada frente a infecciones posteriores por subtipos diferentes
3. El análisis filogenético de la HA y NA del virus H1N2 A/Swine/40564/Spain/2003 muestra la elevada homología de su HA con aislados humanos H1N1 de los años 80 y la relación de la NA con cepas circulantes porcinas H3N2, como ocurre con la mayoría de los aislados H1N2 europeos.
4. Los datos de secuencias genéticas de los virus descritos en este estudio fueron depositados en las bases de datos internacionales y han servido para determinar la genealogía del virus H1N1 humano responsable de la pandemia actual: la NA de las cepas porcinas H1N1 españolas tiene una elevada homología con la cepa H1N1 humana, lo que indica el origen porcino de la misma.
5. No existe reactividad cruzada entre anticuerpos frente a la HA de virus heterólogos ni entre virus homólogos como el caso de H1N1 y H1N2.
6. Los subtipos H1N2 y H3N2 sí mostraron reactividad cruzada en los ensayos de Inhibición de la Neuraminidasa lo que confirma su origen filogenético común.
7. El subtipo más patógeno en ratón fue el H1N2 provocando la muerte de los ratones infectados y alcanzando mayores títulos en tejido pulmonar.
8. Existe una cierta protección cruzada en el modelo ratón entre los subtipos H1N2 y H3N2 que podría estar relacionada con los anticuerpos generados frente a la NA viral
9. En cerdos los títulos virales alcanzados en el tracto respiratorio fueron similares en los tres subtipos aunque los animales infectados con H1N2 presentaron lesiones histopatológicas más severas en pulmón y tráquea que los animales inoculados con H3N2 lo que podría relacionarse con una diferente respuesta inflamatoria del hospedador.
10. La detección viral en el tracto respiratorio y el tejido linfoide asociado de animales infectados de forma experimental con virus Influenza resultó ser variable en función del subtipo inoculado y del tiempo de infección.
11. A nivel del tracto respiratorio superior (tráquea y cornetes), el subtipo H1N2 provocó las lesiones histopatológicas más severas (descamación), hecho posiblemente relacionado con la acción directa del mismo, al ser detectado en un

grado alto en las células epiteliales y linfocitos del mismo; y, por otro lado, con la respuesta inflamatoria desencadenada en el hospedador.

12. A nivel pulmonar se observó una alta presencia viral en los cerdos inoculados con el subtipo H3N2. Sin embargo, las lesiones histopatológicas encontradas fueron menos graves que las descritas para los subtipos H1N2 y H1N1 respectivamente y de carácter reversible (ausencia de fibrosis intralveolar).
13. El subtipo H1N2 provocó lesiones respiratorias importantes en pulmón caudal desde el primer día de infección, hallazgo que pone de manifiesto la potencial virulencia del subtipo.
14. La presencia viral en nódulos linfáticos y tonsila, junto con las alteraciones histológicas observadas (depleción linfoide e histiocitosis sinusal), ponen de manifiesto, una vez más, el importante y equilibrado papel que juega la respuesta inmune en el desarrollo de lesión y la necesidad de estudiarla en profundidad.
15. Estas diferencias en la severidad del cuadro clínico y de las lesiones, podrían deberse a una diferente respuesta inflamatoria del hospedador como se ha puesto de manifiesto en la gripe humana.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abusugra IA, Linné T, Klingeborn B. The provenance of the Swedish swine influenza H1N1 virus of 1983. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1987 Oct;34(8):566-72
2. Adiego Sancho; B, Omeñaca Terés, M., Martínez Cuenca, S., Rodrigo Val1., P, Sánchez Villanueva, P., Casas, I., Pozo, F., Pérez Breña, P. Human case of swine Influenza A (H1N1), Aragón, Spain, November 2008. *Eurosurveillance*. 2009; Vol . 14 · Issue 7.
3. Barigazzi G., Donatelli, I. Swine Influenza in Italy. *Vet. Res. Communicat*. 2003; 27 (Suppl 1): 93-99.
4. Brown IH, Manvell RJ, Alexander DJ, Chakraverty P, Hinshaw VS, Webster RG. Swine influenza outbreaks in England due to a new H1N1 virus. *Vet Rec*. 1993 May 1;132(18):461-2
5. Brown I.H. 2004. Los Virus A de la Influenza en los cerdos de Europa. En: *Enfermedades Víricas Emergentes del Cerdo* (edición española). Morilla A, Yoon KJ y Zimmerman J.J. (eds). Gráfica IN-Multiméica S.A., Barcelona (España), pags. 37-46.
6. Brown IH, Done SH, Spencer YI, Cooley WA, Harris PA, Alexander DJ. Pathogenicity of a swine influenza H1N1 virus antigenically distinguishable from classical and European strains. *Vet Rec*. 1993 Jun 12; 132 (24): 598-602
7. Brown, I.H., Chakraverty, P., Harris, P.A., Alexander, D.J. Disease outbreaks in pigs in Great Britain due to an Influenza A virus of H1N2 subtype. *Vet Rec* 1995; 136: 328-9
8. Brown, I. H., Harris, P. A., McCauley, J. W. Alexander, D.J. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. *Journal of General Virology*. 1998; 79: 2947-2955.
9. Brown, I.H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary Microbiology*. 2000;74: 29-46.

10. Campitelli, L., Donatelli, I., Foni, E., Castrucci, M.R., Fabiani, C., Kawaoka, Y., Krauss, S., Webster, R.G. Continued Evolution of H1N1 and H3N2 Influenza Viruses in pigs in Italy. *Virology*. 1997; 232: 310-318.
11. Castrucci, M., Donatelli, I., Sidoli, L., Barigazzi, G., Kawaoka, Y., Webster, R. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in italian pigs. *Virology*. 1993; 193: 503-506.
12. Chambers TM, Hinshaw VS, Kawaoka Y, Easterday BC, Webster RG. Influenza viral infection of swine in the United States 1988-1989. *Arch Virol*. 1991; 116 (1-4): 261-5.
13. Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickl, J., Palese, P., Henklein, P., Bennis, J.R., Yewdell, J.W. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Medicine*. 2001; 7(12): 1306•1312.
14. Choi, Y.K., Goyal, S.M., Joo, H.S. Phylogenetic analysis of H1N2 isolates of Influenza A virus from pigs in the United States. *Virus Research*. 2002; 87: 173-179.
15. Choi, Y.K., Lee, J.H., Erickson, G., Goyal, S.M., Joo, H.S., Webster, R.G., Webby, R.J. H3N2 Influenza Virus Transmission from Swine to Turkeys, United States. *Emerging Infectious Diseases*. 2004; 10 (12): 2156-2160.
16. Choi, Y.K., Nguyen, T.D., Ozaki, H., Webby, R.J., Puthavathana, P., Buranathal, C., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Hanh, N.T. Ma, S.K., Hui, P.Y., Guan, Y., Peiris, J.S., Webster, R.G. Studies of H5N1 Influenza Virus Infection of Pigs by Using Viruses Isolated in Vietnam and Thailand in 2004. *Journal of Virology*. 2005; 79 (16): 10821-10825.
17. Coleman, J.R. The PB1-F2 protein of Influenza A virus: increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages. *Virology Journal*. 2007; 4:9.
18. Dea S., Bilodeau R., Sauvageau R., Montpetit C., Martineau G.P. Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest*. 1992; 4:380-392.
19. De Jong, J.C., van Nieuwstadt, A.P., Kimman, T.G., Loeffen, W.L. Bestebroer, T.M., Bijlsma, K. Verweij, C., Osterhaus, A.D., Claas, E.C. Antigenic drift in swine influenza H3 haemagglutinins with implications for vaccination policy. *Vaccine*. 1999; 17: 1321-1328.
20. De Jong, J.C., Heinen, P.P., Loeffen, W.L., van Nieuwstadt, A.P., Claas, E.C.J., Bestebroer, T.M., Bijlsma, K., Verweij, C., Osterhaus, A.D., Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R.A.M., Kimman, T.G. Antigenic and molecular heterogeneity in recent swine influenza A (H1N1) virus isolates with possible implications for vaccination policy. *Vaccine*. 2001; 19: 4452-4464.
21. Drolet, R., Larochelle, R., Morin, M., Delisle, D., Magar, R. Detection Rates of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Swine Influenza Virus in Porcine Proliferative and Necrotizing Pneumonia. *Vet. Pathol*. 2003; 40: 143-148.
22. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, Sessions WM, Xu X, Skepner E, Deyde V, Okomo-Adhiambo M, Gubareva L, Barnes J, Smith CB, Emery SL, Hillman MJ, Rivailler P, Smagala J, de Graaf M, Burke DF, Fouchier RA, Pappas C, Alpuche-Aranda CM, López-Gatell H, Olivera H, López I, Myers CA, Faix D, Blair PJ, Yu C, Keene KM, Dotson PD Jr, Boxrud D, Sambol AR, Abid SH, St George K, Bannerman T, Moore AL, Stringer DJ, Blevins P, Demmler-Harrison GJ, Ginsberg M, Kriner P, Waterman S, Smole S, Guevara HF, Belongia EA, Clark PA, Beatrice ST, Donis R, Katz J, Finelli L, Bridges CB, Shaw M, Jernigan DB, Uyeki TM, Smith DJ, Klimov AI, Cox NJ. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009 Jul 10;325(5937):197-201.
23. García-Sastre, A. Inhibition of Interferon-Mediated Antiviral Responses by Influenza A Viruses and Other Negative-Strand RNA Viruses. *Virology*. 2001; 269: 375-384.
24. Gaydos, J.C., Top, Jr, F.H., Hodder, R.A., Russell, P.K. Swine Influenza A Outbreak, Fort Dix, New Jersey, 1976. *Emerging Infectious Diseases*. 2006; 12(1): 23-28.
25. Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, Donatelli I, Guo YJ, Webster RG. Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *J Virol*. 1991 Jul;65(7): 3704-14

26. Gourreau, J.M., Kaiser, C., Valette, M., Douglas, A.R., Labie, J., Aymard, M. Isolation of two H1N2 Influenza viruses from swine in France. *Archives of Virology*.1994; 135: 365-382.
27. Grau-Roma, Llorenç, Segalés, J. Detection of porcine reproductive and respiratory síndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's syndrome in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Vet. Microbiology*. 2007; 119 (2-4): 144-151
28. Gray GC, McCarthy T, Capuano AW, Setterquist SF, Olsen CW, Alavanja MC. Swine workers and swine influenza virus infections. *Emerg Infect Dis*. 2007 Dec; 13 (12): 1871-8
29. Gregory, V., Bennett, M., Thomas, Y., Kaiser, J.L., Matter, W.H., Hay, A., Lin, Y. P. Human infection by a swine influenza A (H1N1) virus in Switzerland. *Arch Virology*. 2003; 148: 793-802.
30. Hinshaw VS, Bean WJ Jr, Webster RG, Easterday BC. The prevalence of influenza viruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man and swine. *Virology*. 1978 Jan; 84 (1): 51-62.
31. Haesebrouck F, Biron P, Pensaert MB, Leunen J. Epizootics of respiratory tract disease in swine in Belgium due to H3N2 influenza virus and experimental reproduction of disease. *Am J Vet Res*. 1985 Sep; 46 (9): 1926-8.
32. Haesebrouck F, Pensaert MB. Effect of intratracheal challenge of fattening pigs previously immunised with an inactivated influenza H1N1 vaccine. *Vet Microbiol*. 1986 Mar;11(3):239-49
33. Heinen PP, van Nieuwstadt AP, Pol JM, de Boer-Luijtze EA, van Oirschot JT, Bianchi AT. Systemic and mucosal isotype-specific antibody responses in pigs to experimental influenza virus infection. *Viral Immunol*. 2000;13(2):237-8
34. Heinen, P.P., de Boer-Luijtze E.A., Bianchi, A.T.J. Respiratory and systemic humoral and cellular immune responses of pigs to a heterosubtypic Influenza A virus infection. *Journal of General Virology*. 2001; 82: 2697-2707.
35. Heinen, P.P., Van Nieuwstadt, A.P., De Boer-Luijtze, E.A., Bianchi, A.T. Analysis of the quality of protection induced by a porcine influenza A vaccine to challenge with an H3N2 virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 82: 39-56
36. Ito, T., Nelson, J., Couceiro, S.S., Kelm, S., Baum, L.G., Krauss, S., Castrucci, M.R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J.C., Webster, R.G., Kawaoka, Y. Molecular Basis for the Generation in Pigs of Influenza A Viruses with Pandemic Potential. *Journal of Virology*. 1998; 72 (9): 7367-7373.
37. Ito, T., Kawaoka, Y. Host range barrier of influenza A viruses. *Veterinary Microb*. 2000; 74: 71-75.
38. Jewell N.A., Vaghefi N., Mertz S.E., Akter P., Stokes Peebles Jr. R., Bakaletz L.O., Durbin R.K., Flaño E., and Durbin J.E. Differential Type I Interferon Induction by Respiratory Syncytial Virus and Influenza A Virus In Vivo *J Virol*. 2007 Sep; 81 (18): 9790-800.
39. Joo H. M., He Y., and Sangster M. Y. Broad dispersion and lung localization of virus-specific memory B cells induced by influenza pneumonia. *PNAS*. 2008; 105(9): 3485-3490
40. Jung, K., Ha, Y., Chae, C. Pathogenesis of swine Influenza virus subtype H1N2 infections in pigs. *J. Comp. Path*. 2005; 132: 179-184.
41. Jung, T., Choi, C. Chae, C. Localization of Swine Influenza Virus in Naturally Infected Pigs. *Vet. Pathology*. 2002; 39: 10-16.
42. Kanegae Y, Sugita S, Shortridge KF, Yoshioka Y, Nerome K. Origin and evolutionary pathways of the H1 hemagglutinin gene of avian, swine and human influenza viruses: cocirculation of two distinct lineages of swine virus. *Arch Virol*. 1994; 13 4(1-2): 17-28
43. Karasin, A., Landgraf, J., Swenson, S., Erickson, G., Goyal, S., Woodruff, M., Scherba, G., Anderson, G., Olsen C. W. Genetic characterization of H1N2 Influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40 (3): 1073-1079.
44. Karasin, A.I., Brown, I.H., Carman, S., Olsen, C.W. Isolation and Characterization of H4N6 Avian Influenza Viruses from Pigs with Pneumonia in Canada. *Journal of Virology*. 2000; 74(19): 9322-9327.

45. Karasin, A.I., Schutten, M.M., Cooper, L.A., Smith, C.B., Subbarao, K., Anderson, G.A., Carman, S., Olsen, C. W. Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977-1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. *Virus Res.* 2000; 68: 71-85.
46. Kendal A.P., Goldfield M., Noble G.R., y col.. Identification and pulmonary antigenic analysis of swine Influenza-like viruses isolated during an Influenza outbreak at Fort Dix, New Jersey. *J. Infectious Diseases.* 1977; 136:S381-S385.
47. Kendall P. Myers, Christopher W. Olsen, Sharon F. Setterquist, Ana W. Capuano, Kelley J. Donham, Eileen L. Thacker, James A. Merchant and Gregory C. Gray. Are Swine Workers in the United States at Increased Risk of Infection with Zoonotic Influenza Virus? *Clin. Infect. Dis.* 2006; 42(1): 14-20.
48. Kida H, Ito T, Yasuda J, Shimizu Y, Itakura C, Shortridge KF, Kawaoka Y, Webster RG. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J Gen Virol.* 1994 Sep; 75 ( Pt 9): 2183-8
49. Kreijtz, J.H.C.M., Bodewes, R., Van Amerongen, G., Kuiken, T., Fouchier, R.A.M., Osterhaus, A.D., Rimmelzwaan, G.F. Primary influenza A virus infection induces cross-protective immunity against a lethal infection with a heterosubtypic virus strain in mice. *Vaccine.* 2007; 25:612-620.
50. Kundin WD. Hong Kong A-2 influenza virus infection among swine during a human epidemic in Taiwan. *Nature.* 1970 Nov 28;228(5274):857
51. Landolt, G.A., Karasin, A., Phillips, L., Olsen C.W. Comparison of the Pathogenesis of Two Genetically Different H3N2 Influenza A Viruses in Pigs. *J. of Clin. Microb.* 2003; 41 (5): 1936-1941.
52. Lani L. Vincent, Bruce H. Janke, Prem S. Paul, Patrick G. Halbur. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1997; 9:191-195.
53. Lanza I, Brown IH, Paton DJ. Pathogenicity of concurrent infection of pigs with porcine respiratory coronavirus and swine influenza virus. *Res Vet Sci.* 1992 Nov; 53 (3): 309-14
54. Larsen, D.L., Karasin, A.I., Zuckermann, F., Olsen, C.W. Systemic and mucosal responses to H1N1 influenza virus infection in pigs. *Veterinary Microbiology.* 2000; 74: 117-131.
55. Li HY, Yu KZ, Yang HL, Xin XG, Chen JY, y col.. Isolation and characterization of H5N1 and H9N2 influenza viruses from pigs in China. *Chin J Prev Vet Med.* 2004; 26: 1-6.
56. Maldonado, J., Van Reeth, K., Riera, P., Sitjà M., Saubi, N., Espuña, E., Artigas, E. Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain. *Veterinary Journal.* 2006; 172 (2): 377-381.
57. Marozin, S., Gregory, V., Cameron, K., Bennett, M., Valette, M., Aymard, M., Foni, E., Barigazzi, G., Lin, Y., Hay, A. Antigenic and genetic diversity among swine Influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. *Journal of General Virology.* 2002; 83: 735-745.
58. Matrosovich, M.N., Matrosovich, T.Y., Gray, T., Roberts, N.A., Klenk, H.D. Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *Journal of Virology.* 2004; 78 (22): 12665-12667.
59. Matrosovich, M.N., Matrosovich, T.Y., Gray, T., Roberts, N.A., Klenk, H.D. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *PNAS.* 2004; 101: 4620-4624.
60. Matrosovich, Tuzikov, A., Bovin, N., Gambaryan, A., Klimov, A., Castrucci, M.R., Donatelli, I. Kawaoka, Y. Early Alterations of the Receptor-Binding Properties of H1, H2, and H3 Avian Influenza Virus Hemagglutinins after Their Introduction into Mammals. *J. of Virology.* 2000; 74 (18): 8502-8512.
61. Nardelli L, Pascucci S, Gualandi GL, Loda P. Outbreaks of classical swine influenza in Italy in 1976. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1978 Dec; 25 (10): 853-7.

62. O'Neill, R.E., Talon J., Palese, P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteínas. *The EMBO Journal*. 1998; 17 (288-296).
63. Olsen C.W., Brown I.A., Easterday B.C., and Van Reeth K. 1999. Swine Influenza. In: *Diseases of swine* (8th edition). Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ (eds). Iowa State University Press, Ames, pp 277-290.
64. Olsen CW, Carey S, Hinshaw L, Karasin AI. Virologic and serologic surveillance for human, swine and avian influenza virus infections among pigs in the north-central United States. *Arch Virol*. 2000; 145 (7): 1399-419.
65. Olsen, C.W. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res*. 2002; 85: 199-210.
66. Olsen, C.W., Karasin, A., Erickson, G. Characterization of a swine-like reassortant H1N2 influenza virus isolated from a wild duck in the United States. *Virus Research*. 2003; 93: 115-121.
67. Olsen C.W. 2004. Aparición de Nuevas Cepas de Virus de la Influenza Porcina en Norteamérica. En: *Enfermedades Víricas Emergentes del Cerdo* (edición española). Morilla A, Yoon KJ y Zimmerman J.J. (eds). Gráfica IN-Multimédica S.A., Barcelona (España), pags. 47-54.
68. Ottis K, Sidoli L, Bachmann PA, Webster RG, Kaplan MM. Human influenza A viruses in pigs: isolation of a H3N2 strain antigenically related to A/England/42/72 and evidence for continuous circulation of human viruses in the pig population. *Arch Virol*. 1982; 73 (2): 103-8
69. Parvin JD, Moscona A, Pan WT, Leider JM, Palese P. Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. *J Virol*. 1986 Aug; 59 (2): 377-83
70. Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, Taubenberger JK. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Feb 16; 96 (4): 1651-6.
71. Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, Taubenberger JK. Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus neuraminidase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 6; 97 (12): 6785-90.
72. Richt JA, Lager KM, Janke BH, Woods RD, Webster RG, Webby RJ. Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States. *J Clin Microbiol*. 2003 Jul; 41 (7): 3198-205.
73. Rimmelzwaan, G.F., De Jong, J.C., Bestebroer, T.M., Van Loon, A.M., Claas, E.C.J., Fouchier, R.A.M., Osterhaus, A.D.M.E. Antigenic and genetic characterization of Swine Influenza A (H1N1) Viruses isolated from pneumonia patients in the Netherlands. *Virology* 2001; 282: 301-306.
74. Sabrina L. Swenson, Lani L. Vincent, Brandi M. Lute, Bruce H. Janke, Kelly F. Lechtenberg, John G. Landgraf, Beverly J. Schmitt, David R. Kinker, Janis K. McMillen. A comparison of diagnostic assays for the detection of type A swine influenza virus from nasal swabs and lungs. *J. Vet. Diagn. Invest*. 2001; 13:36-42.
75. Salvatore M, y col.: Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis. *J Virol* 2002, 76 (3): 1206-12
76. Seo S.H., Webby R., Webster R.G. No apoptotic deaths and different levels of inductions of inflammatory cytokines in alveolar macrophages infected with influenza viruses. *Virology* 2004; 329: 270-279.
77. Schrader, C., Süß, J. Molecular Epidemiology of porcine H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1982 and 2001. *Intervirology*. 2004; 47: 72-77.
78. Shope RE. The etiology of Swine Influenza. *Science*. 1931 Feb 20; 73 (1886): 214-215
79. Shope RE. The epidemiology of the origin and perpetuation of a new disease. *Perspect Biol Med*. 1964; 7: 263-78
80. Smith,G.J., Vijaykrishna,D., Bahl, J., Lycett, S.J., Worobey, M., Pybus, O.G., Ma, S.K., Cheung, Ch. L., Raghwani, J., Bhatt, S., Peiris J.S.M., Guan,Y., and Rambaut, A. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*; 2009 Jun25;459 (7250):1122-5.



81. Suzuki, Y., Ito, T., Suzuki, T., Holland, R.E., Chambers, T.M., Kiso, M., Ishida, H., Kawaoka, Y. Sialic acid species as a determinant of the host range of Influenza A viruses. *Journal of Virology*. 2000; 74 (24): 11825-11831.
82. Sylte, M.J., Hubby, B., Suárez, D.L. Influenza neuraminidase antibodies provide partial protection for chickens against high pathogenic avian influenza infection. *Vaccine*. 2007; 25 (19): 3763-3772. 268
83. Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science*. 1997 Mar 21;275(5307):1793-6.
84. Taubenberger JK, Reid AH, Fanning TG. The 1918 influenza virus: A killer comes into view. *Virology*. 2000 Sep 1;274(2):241-5. Review.
85. Thomas, P.G., Keating, R., Hulse-Post, D.J. and Doherty, P.C. Cell-mediated Protection in Influenza Infection. *Emerging Infectious Diseases*. 2006; 12 (1): 48-54.
86. Tu J, Zhou H, Jiang T, Li C, Zhang A, Guo X, Zou W, Chen H, Jin M. Isolation and molecular characterization of equine H3N8 influenza viruses from pigs in China. *Arch Virol*. 2009; 154:887-890.
87. Tumová B, Mensík J, Stumpa A, Fedová D, Pospíšil Z. Serological evidence and isolation of a virus closely related to the human A/Hong Kong/68 (H3N2) strain in swine populations in Czechoslovakia in 1969-1972. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1976
88. Urman Hk, Underdahl Nr, Young Ga. Comparative histopathology of experimental swine influenza and virus pneumonia of pigs in disease-free, antibody-devoid pigs. *Am J Vet Res*. 1958 Oct; 19 (73): 913-7.
89. Van Reeth, K., Labarque, G., Nauwynck, H., Pensaert, M. Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Research in Veterinary Science*. 1999; 67 (1): 47-52.
90. Van Reeth, K. Citokynes in the pathogenesis of Influenza. *Veterinary Microbiology*. 2000; 74:109-116.
91. Van Reeth, K., Van Gucht, S., Pensaert, M. Correlations between Lung Proinflammatory Cytokine Levels, Virus Replication, and Disease after Swine Influenza Virus Challenge of Vaccination-Immune Pigs. *Viral Immunology*. 2002; 15 (4): 583-594.
92. Van Reeth, K., Gregory, V., Hay, A., Pensaert, M. Protection against a European H1N2 swine influenza virus in pigs previously infected with H1N1 and/or H3N2 subtypes. *Vaccine*. 2003; 21:1375-1381.
93. Van Reeth, K., Van Gucht, S., Pensaert, M. Investigations of the efficacy of European H1N1-and H3N2-based swine influenza vaccines against the novel H1N2 subtype. *Vet. Record*. 2003; 153: 9-13.
94. Van Reeth, K., Brown, I., Essen, S., Pensaert, M. Genetic relationships, serological cross-reaction and cross-protection between H1N2 and other influenza A virus subtypes endemic in European pigs. *Virus Research*. 2004; 103: 115-124.
95. Van Reeth, K., Labarque, G., Pensaert, M. Serological Profiles after Consecutive Experimental Infections of Pigs with European H1N1, H3N2, and H1N2 Swine Influenza Viruses. *Viral Immunol*. 2006; 19,3:373-382
96. Van Reeth K. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet. Res*. 2007; 38: 243-260.
97. Webby, R.J., Rossow, K., Erickson, G., Sims, Y., Webster, R. Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. *Virus Research*. 2004; 103:67-73
98. Vincent AL, Lager KM, Ma W, Lekcharoensuk P, Gramer MR, Loiacono C, Richt JA. Evaluation of hemagglutinin subtype 1 swine influenza viruses from the United States. *Vet Microbiol*. 2006 Dec 20; 118 (3-4): 212-22

99. Yoon KJ. y Janke B.H. 2004. Influenza Porcina: etiología, epidemiología y diagnóstico. En: *Enfermedades Víricas Emergentes del Cerdo* (edición española). Morilla A, Yoon KJ y Zimmerman J.J. (eds). Gráfica IN-Multimédica S.A., Barcelona (España), pags. 29-36.
100. Zamarin D., García-Sastre,A., Xiao, X., Wang, R., Palese, P. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* 2005, 1(1):e4.
101. Zhou, N., Senne, D.A., Landgraf, J.S., Swenson, S.L., Erickson, G., Rossow, K., Liu, L., Yoon, K.J., Krauss, S., Webster, R.G. Genetic reassortment of avian, swine, and human Influenza A viruses in american pigs. *Journal of Virology*. 1999; 73 (10): 8851-8856.
102. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. WHO (World Health Organization) Global Influenza Programme. 103.Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE (World Organization for Animal Health) Chapter 2.8.8. Swine Influenza