



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Análisis genómico del virus de Influenza A aviar y
porcino circulantes en Perú para el desarrollo de
proteínas candidatas vacunales**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Medicina
Veterinaria

AUTOR

Gina Ruth CASTRO SANGUINETTI

ASESOR

Ph. D. Vikram NAGARDAS VAKHARIA

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

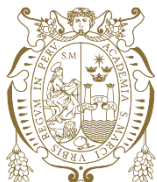
Referencia bibliográfica

Castro G. Análisis genómico del virus de Influenza A aviar y porcino circulantes en Perú para el desarrollo de proteínas candidatas vacunales [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2024.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Gina Ruth Castro Sanguinetti
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	42121918
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8380-700X
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Vikram Nagardas Vakharia
Tipo de documento de identidad	Pasaporte
Número de documento de identidad	US / A10079349
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-0955-3010
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Abelardo Lenin Maturrano Hernández
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	15725076
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Gloria Consuelo Ramírez Nieto
Tipo de documento	Cédula de identidad
Número de documento de identidad	CO / 51649140
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	María Eliana Icochea D'Arrigo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09161133

Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Luis Ramiro Luna Espinoza
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41958220
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.2.4. Desarrollo de Productos Biológicos A.1.3.1. Salud Pública A.1.3.2. Sanidad Agropecuaria
Grupo de investigación	Grupo de Investigación en Aves - GINAVES
Agencia de financiamiento	Perú. Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (PROCIENCIA). Concurso de Incorporación de Investigadores. Contrato N° 02-2019-FONDECYT-BM-INC-INV. Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Proyectos de Investigación para Grupos de Investigación. A22080871-PCONFIGI.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Patología Aviar, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Calle: Av. Circunvalación Cdra. 28 Latitud: -12.08075 Longitud: -76.987252
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019 - 2023
URL de disciplinas OCDE	Salud pública, Salud ambiental https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.05 Biotecnología relacionada con la salud https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.01



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN MEDICINA VETERINARIA**

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 10:00 horas del día lunes 27 de mayo del 2024, el Jurado de Tesis, presidido por el Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández y conformado por los siguientes miembros docentes: Dr. Luis Ramiro Luna Espinoza, Dra. María Eliana Icochea D'Arrigo, Ph.D. Gloria Consuelo Ramírez Nieto y Ph.D. Vikram Nagardas Vakharian (asesor), se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis titulada:

“Análisis genómico del virus de Influenza A aviar y porcino circulantes en Perú para el desarrollo de proteínas candidatas vacunales”, presentado por la magister:

GINA RUTH CASTRO SANGUINETTI

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Doctor en Medicina Veterinaria y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **MUY BUENO, (18) DIECIOCHO**

A continuación, el Jurado por intermedio de su Presidente recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del Grado Académico de Doctor en Medicina Veterinaria, a la magíster Gina Ruth Castro Sanguinetti.

Siendo las 12:15 horas del día lunes 27 de mayo de 2024, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández (P.P.D.E.)
Presidente

Dr. Luis Ramiro Luna Espinoza (P.A.D.E.)
Miembro

Dra. María Eliana Icochea D'Arrigo (P.P.D.E.)
Miembro

Ph.D. Gloria Consuelo Ramírez Nieto
Miembro

Ph.D. Vikram Nagardas Vakharia
Miembro Asesor

Dr. Cesar Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado





Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado



CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, VIKRAM NAGARDAS VAKHARIA en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Directoral N° 075-UPG-FMV-2022 de la tesis, cuyo título es **Análisis genómico del virus de Influenza A aviar y porcino circulantes en Perú para el desarrollo de proteínas candidatas vacunales**, presentado por la magister Gina Ruth Castro Sanguinetti para optar el grado académico de Doctor en Medicina Veterinaria, CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 5% de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

Firma del Asesor

Documento de Identidad: A10079349

Nombres y apellidos del asesor: VIKRAM NAGARDAS VAKHARIA





DEDICATORIA

A mi abuela Yolanda, quien siempre me mostró su cariño y fue la persona que más me acercó a Dios, siendo modelo del amor incondicional a la familia.

A mis padres Gina y Manuel, quienes siempre me han apoyado y alentado incluso en los momentos más complicados. Han sido pilar fundamental para alcanzar este objetivo profesional.

A Juan, por su estímulo constante, su apoyo y siempre inspirarme a ser cada día mejor.

A mi hermano Manuel y a toda mi familia, por acompañarme dándome su cariño y respaldo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por las oportunidades que ha puesto en mi camino.

A mi asesor de tesis, el Dr. Vikram Vakharia, por compartir sus conocimientos, por su invaluable apoyo y paciencia para el desarrollo y culminación de este trabajo.

A la Dra. Eliana Icochea por su constante enseñanza, su confianza, así como su enorme apoyo y motivación para seguir adelante en la ejecución del trabajo.

A la Dra. Rosa González por el gran esfuerzo puesto en el desarrollo del estudio, así como por el gran apoyo para finalizar la tesis, por su amistad y sus consejos.

Al Dr. Juan More por compartir sus conocimientos, su respaldo y paciencia en el desarrollo de este estudio, así como por alentarme constantemente y darme la fortaleza para culminar el trabajo de tesis.

Al Dr. Paulo Marques-Simas y al Dr. Juan Rondón por su valiosa contribución y tiempo puestos en el desarrollo del estudio.

A la Dra. Gloria Ramírez, Dra. Eliana Icochea, Dr. Lenin Maturrano y Dr. Luis Luna, miembros del jurado, por las recomendaciones y sugerencias en la elaboración del manuscrito.

A Alonso Callupe, Ana Paola Apaza, Yoselin Vásquez, Katherine Vargas y al Sr. Helio Gómez, por ser parte importante en el desarrollo de este estudio, pero sobre todo por su invaluable amistad y soporte.

Al programa PROCENCIA Perú y Banco Mundial por ser fuentes financiadoras del estudio (convenio N° 02-2019-FONDECYT-BM-INC-INV), así como a mi *alma mater*, la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Proyecto A22080871).

Al Instituto de Tecnología Marina y Ambiental (IMET) de la Universidad de Maryland Baltimore County por su contribución logística.

Índice de contenido

Lista de cuadros.....	vi
Lista de figuras	viii
Lista de abreviaturas	x
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Virus de Influenza A (Etiología)	3
2.1.1. Taxonomía y clasificación del virus de Influenza A	3
2.1.2. Características del virus de Influenza A	4
2.1.2.1. Morfología:	4
2.1.2.2. Genoma viral	5
2.1.2.3. Proteínas virales.....	5
2.1.3. Propiedades antigénicas.....	7
2.1.4. Ciclo de replicación viral.....	8
2.1.5. Patogenicidad viral	11
2.2. Evolución del Virus de Influenza	13
2.2.1. Mutaciones	13
2.2.2. Reordenamiento genético	14
2.2.3. Adaptación del Virus de Influenza A	14
2.3. Ecología del virus de Influenza A.....	16
2.3.1. Hospederos	16
2.3.2. Interacción Virus-Hospedero.....	17
2.3.3. Mecanismos de inmunidad innata contra el virus de Influenza A.....	18
2.3.3.1. Respuesta inmune celular innata	18
2.3.3.1.1. Producción de citoquinas y quimiocinas	20
2.3.3.1.2. Macrófagos porcinos	20
2.3.3.1.3. Macrófagos aviares.....	22
2.4. Caracterización molecular	22
2.5. Desarrollo de metodología de prevención	24
2.5.1. Vacunas de Influenza aviar.....	25
2.5.2. Vacunas de Influenza porcina.....	26
2.6. Vigilancia del virus de Influenza A en el Perú	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1. Lugar de ejecución y periodo.....	30
3.2. Material experimental	30

3.2.1. Animales y especímenes:	30
3.2.1.1. Aves	30
3.2.1.2. Porcinos	30
3.3. Diseño experimental u observacional	31
3.3.1. CAPÍTULO 1: Aislamiento cepas de Influenza A provenientes de aves y porcinos de Perú.	32
3.3.1.1. Actividades de muestreo.....	32
3.3.1.1.1. Toma de muestras aviares	32
3.3.1.1.2. Toma de muestra porcinos.....	33
3.3.1.2. Procesamiento de muestras.....	34
3.3.1.3. Aislamiento viral	35
3.3.1.3.1. Aislamiento viral mediante propagación en huevos embrionados de pollo.	35
3.3.1.3.2. Aislamiento viral mediante cultivo celular.....	36
3.3.1.4. Confirmación de detección viral.....	36
3.3.1.4.1. Ensayo inmunocromatográfico.....	37
3.3.1.4.2. Pruebas moleculares	37
3.3.2. CAPÍTULO 2: Caracterización molecular de cepas de Influenza A.....	39
3.3.2.1. Secuenciamiento de genoma completo.....	39
3.3.2.2. Subtipificación viral y análisis filogenético.....	40
3.3.2.3. Análisis de la información aminoacídica.....	41
3.3.2.4. Selección de secuencias HA	41
3.3.3. CAPÍTULO 3: Producción de proteínas candidatas vacunales	43
3.3.3.1. Producción de proteínas recombinantes	43
3.3.3.1.1. Preparación de secuencias	43
3.3.3.1.2. Digestión enzimática de secuencias clonadas	43
3.3.3.1.3. Ligación de secuencias HA en el vector de transferencia	44
3.3.3.1.4. Transformación de bacterias <i>E. coli</i> competentes	44
3.3.3.1.5. Propagación de células de insecto Sf9.....	46
3.3.3.1.6. Transfección de Baculovirus recombinante en células de insecto Sf9	46
3.3.3.1.7. Evaluación de producción de proteínas	48
3.3.3.1.8. Purificación de proteínas recombinantes.....	49
3.3.3.2. Evaluación del efecto inmunogénico de las proteínas recombinantes..	50
3.3.3.2.1. Evaluación <i>in vitro</i> de respuesta de activación celular de leucocitos porcinos.	50

3.3.3.2.2.	Evaluación de respuesta post inoculación intraperitoneal de proteína recombinante en pollos y porcinos (ensayos <i>in vivo</i>)...	53
3.3.3.2.3.	Análisis de la información.....	57
IV.	RESULTADOS.....	58
4.1.	CAPÍTULO 1: Aislamiento de cepas de Influenza A provenientes de aves y porcinos de Perú.	58
4.1.1.	Actividades de muestreo en especies aviares silvestres	58
4.1.2.	Actividades de muestreo en porcinos	60
4.1.3.	Aislamiento de cepas del virus de Influenza A	62
4.1.3.1.	Aislamiento viral de muestras aviares	62
4.1.3.2.	Aislamiento viral de muestras porcinas	64
4.2.	CAPÍTULO 2: Caracterización genética de cepas de AIV aisladas	65
4.2.1.	Subtipificación de cepas peruanas.....	65
4.2.2.	Evaluación de secuencia en zona de clivaje HA / Análisis de patogenicidad ...	67
4.2.3.	Análisis filogenético de secuencias genómicas	68
4.2.3.1.	Análisis de secuencias de Hemaglutinina viral.....	68
4.2.3.2.	Análisis de secuencias de Neuraminidasa viral	74
4.2.4.	Identificación de cambios genéticos.....	78
4.3.	CAPÍTULO 3: Producción de proteínas de Hemaglutinina recombinante.....	81
4.3.1.	Diseño de secuencias de Hemaglutinina de vIA y vIP.	81
4.3.2.	Preparación de vectores de transferencia.....	81
4.3.3.	Producción de proteínas recombinantes de HA.....	85
4.3.4.	Evaluación de proteínas recombinantes purificadas.....	90
4.3.5.	Evaluación de la capacidad inmunogénica de las proteínas recombinantes.....	91
4.3.5.1.	Ensayo <i>in vitro</i> de respuesta de activación de monocitos/macrófagos porcinos.	91
4.3.5.2.	Ensayos <i>in vivo</i> de exposición a proteína rHA-H2 en pollos.....	93
4.3.5.3.	Ensayos <i>in vivo</i> de exposición a proteína rHA-H1 en lechones	98
V.	DISCUSIÓN	102
VI.	CONCLUSIONES	118
VII.	RECOMENDACIONES.....	119
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

Lista de cuadros

Cuadro 1.	Sitios de muestreo seleccionados en el estudio.	33
Cuadro 2.	Anticuerpos monoclonales y marcadores utilizados en el estudio.....	53
Cuadro 3.	Grupos experimentales y dosificación.....	55
Cuadro 4.	Cronograma de los muestreos de aves silvestres acuáticas realizados en el departamento de Lima.	58
Cuadro 5.	Identificación de especies aviarias y número de muestras obtenidas por especie.	59
Cuadro 6.	Cronograma de los muestreos en porcinos realizados en diferentes localidades del Perú.....	61
Cuadro 7.	Identificación de especies aviarias portadoras del Virus de Influenza A detectadas en el presente estudio.	64
Cuadro 8.	Secuencias genómicas de cepas del Virus de Influenza A aislados en Perú.....	66
Cuadro 9.	Identificación de secuencias aminoacídicas en la zona de clivaje de la proteína Hemaglutinina de los aislados de Virus de Influenza Aviar para la determinación de su patogenicidad.....	67
Cuadro 10.	Cepas referenciales de mayor cercanía genética en relación a cada segmento genómico correspondiente a los aislados de vIA peruanos.	72
Cuadro 11.	Identificación de las sustituciones aminoacídicas en la secuencia de la proteína Hemaglutinina de los aislados del vIA.	79
Cuadro 12.	Identificación de las sustituciones aminoacídicas en la secuencia de la proteína Neuraminidasa de los aislados del vIA.....	80
Cuadro 13.	Evaluación de la infiltración celular calculado en valores absolutos y concentración celular a las 24 horas post inoculación intraperitoneal de la proteína rHA-H2 en pollos de 3 semanas de edad.....	95
Cuadro 14.	Proporción de poblaciones leucocitarias en cavidad abdominal de pollos de carne estimulados con proteína rHA-H2 a las 24 horas, evaluados por citometría de flujo.....	96
Cuadro 15.	Evaluación de la infiltración celular calculado en valores absolutos y concentración celular a las 24 horas post inoculación intraperitoneal de la proteína rHA-H1 en lechones de 3 semanas de edad.....	98

Cuadro 16. Proporción de poblaciones leucocitarias en cavidad peritoneal de lechones estimados con proteína rHA-H1 a las 24 horas, evaluados por citometría de flujo.....	100
---	-----

Lista de figuras

Figura 1. Estructura del Virus de Influenza A.....	4
Figura 2. Imágenes de muestras de heces de aves silvestres..	32
Figura 3. Realización de hisopados nasofaríngeos en lechones provenientes de granjas no tecnificadas.....	60
Figura 4. Confirmación de la presencia de Virus de Influenza A en las muestras de aislamiento viral. A.	63
Figura 5. Árbol filogenético del segmento genómico de la Hemaglutinina H2.	69
Figura 6. Árbol filogenético del segmento genómico de la Hemaglutinina H6..	70
Figura 7. Árbol filogenético del segmento genómico de la Hemaglutinina H13..	71
Figura 8. Árbol filogenético del segmento genómico de la Neuraminidasa N2.....	75
Figura 9. Árbol filogenético del segmento genómico de la Neuraminidasa N6.....	76
Figura 10. Árbol filogenético del segmento genómico de la Neuraminidasa N8.....	77
Figura 11. Observación de las secuencias tras la digestión de plásmidos de clonación pUC57-Amp mediante las enzimas de restricción BamHI y NheI.....	82
Figura 12. Transformación de bacterias competentes con el inserto AIV-HA.....	83
Figura 13. Transformación de bacterias competentes con el inserto SIV-HA.	84
Figura 14. Evaluación individual de los plásmidos conteniendo el inserto SIV-HA mediante digestión enzimática.	85
Figura 15. Cultivos de células de insecto Sf9 infectados con Baculovirus recombinante (40X)	86
Figura 16. Evaluación de la producción de proteína rHA-H2 en células Sf9 infectadas con Baculovirus recombinante a las 24, 48 y 72 horas.	88
Figura 17. Proporción de células de insecto Sf9 productoras de proteína rHA-H2.....	89
Figura 18. Evaluación de las proteínas recombinantes rHA-H2 y rHA-H1 mediante Western blot.	90
Figura 19. Evaluación de la activación celular mediante ensayo <i>in vitro</i> de monocitos/macrófagos porcinos ante exposición a la proteína rHA-H1.....	92
Figura 20. Evaluación de la activación celular de monocito/macrófagos porcinos ante exposición a la proteína rHA-H1 mediante citometría de flujo.	93

Figura 21. Valores absolutos de células en cavidad abdominal de pollos inoculados con 5 y 20µg de proteína rHA-H2.	94
Figura 22. Análisis de subpoblaciones leucocitarias aviares a las 24 horas post inoculación intraperitoneal con la proteína recombinante HA-H2 mediante citometría de flujo	96
Figura 23. Proporción de poblaciones de macrófagos aviares estimulados que incrementaron la producción de ROS a las 24 horas post exposición a la proteína rHA-H2.	97
Figura 24. Valores absolutos de células en cavidad abdominal de porcinos inoculados con 50 µg de proteína rHA-H1.	98
Figura 25. Análisis de subpoblaciones leucocitarias porcinas a las 24 horas post inoculación intraperitoneal con la proteína recombinante HA-H1 mediante evaluación morfológica por citometría de flujo.	99
Figura 26. Poblaciones de macrófagos porcinos productores de ROS en los grupos de estudio	101

Lista de abreviaturas

ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNc	ARN complementario
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato (del inglés <i>Adenosine triphosphate</i>)
CRP	Complejo Respiratorio Porcino
CSF1R	Factor estimulante de las colonias 1 (del inglés <i>Colony-Stimulating Factor 1 Receptor</i>)
GTP	Guanosín trifosfato (del inglés <i>Guanosine triphosphate</i>)
HA	Hemaglutinina
IAAP	Influenza aviar de alta patogenicidad
IABP	Influenza aviar de baja patogenicidad
IFN-I	Interferón tipo I
IFN- β	Interferón β
IPIV	Índice de patogenicidad intravenosa
Kb	Kilobases
LB	Caldo Luria o caldo lisogénico (<i>Lysogenic broth</i>)
LPS	Lipopolisacárido
MCS	Sitio de clonación múltiple (del inglés <i>Multiple cloning site</i>)
MDCK	Células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (del inglés <i>Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells</i>)
MEM	Medio esencial mínimo (del inglés <i>Minimum Essential Medium</i>)
NGS	Secuenciamiento de siguiente generación (del inglés <i>Next Generation Sequencing</i>)
NK	Células asesinas naturales (del inglés <i>Natural killer</i>)
NLRP3	Receptor tipo NOD asociado a proteína 3 (del inglés <i>NOD-like receptor protein 3</i>)
NODs	Receptores tipo dominio de oligomerización nucleotídica (del inglés <i>nucleotide oligomerization domain receptors</i>)
pb	pares de bases
PBS	Solución salina bufferada o buffer fosfato salino (del inglés <i>phosphate buffered saline</i>)
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrón (del inglés <i>pattern recognition receptors</i>)

PVDF	Fluoruro de polivinilideno (del inglés <i>Polyvinylidene fluoride</i>)
RBS	Sitio de unión al receptor (del inglés <i>Receptor binding site</i>)
RNP	Ribonucleoproteína
RNPc	Ribonucleoproteína complementaria
rHA-H1	Proteína recombinante de HA subtipo H1
rHA-H2	Proteína recombinante de HA subtipo H2
RIG-I	Receptores tipo gen I inducible por ácido retinoico (del inglés <i>Retinoic acid-inducible gene I</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés <i>Reactive oxygen species</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (del inglés <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
SA	Ácido siálico o Ácido N-acetilneuramínico (del inglés <i>Sialic acid</i>)
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú
SPF	Libre de patógenos específicos (del inglés <i>Specific-pathogen free</i>)
TAE	Tris-acetate-EDTA
TLRs	Receptores tipo Toll (del inglés <i>Toll-like receptors</i>)
TNF α	Factor de necrosis tumoral α (<i>α-tumoral necrosis factor</i>)
UFP	Unidades formadoras de placas
VAERD	Enfermedad respiratoria agravada asociada a la vacuna (del inglés <i>vaccine-associated enhanced respiratory disease</i>)
VIA	Virus de Influenza A
vIA	Virus de Influenza aviar
vIP	Virus de Influenza porcino
VLPs	Partículas similares a virus (del inglés <i>Virus-like particles</i>)

RESUMEN

El virus de influenza A es el patógeno aviar más importante y representa gran preocupación para la salud pública y animal. Las aves acuáticas constituyen el reservorio natural de todos los subtipos y son fuente importante de transmisión a especies susceptibles como los cerdos. El Perú tiene una ubicación crucial en la ruta migratoria de aves silvestres en América y, por lo tanto, es relevante para la evolución viral. Debido a la importancia de la vigilancia de influenza aviar, el presente estudio tuvo como objetivo el aislamiento del virus en muestras fecales de aves acuáticas de la costa de Lima y muestras nasofaríngeas de cerdos en Perú en el periodo 2019-2021. Un total de 421 muestras aviarias y 206 muestras porcinas se procesaron para aislamiento viral en huevos embrionados y cultivos celulares, respectivamente. La identificación viral se realizó mediante RT-PCR y análisis del genoma completo mediante NGS. Se detectaron cuatro subtipos del virus de influenza aviar de baja patogenicidad H2N6, H6N2, H6N8 y H13N6. El análisis filogenético reveló una alta relación con los virus de influenza aviar norteamericanos, destacando características distintivas que podrían conferirles propiedades únicas. Para la producción de proteínas recombinantes HAs se seleccionaron un virus de influenza aviar H2N6 obtenido en este estudio (rHA-H2), y un virus de influenza porcina H1N1 estrechamente relacionado con la cepa pdm2009 (rHA-H1), empleando un sistema vector de expresión de baculovirus. Se evaluó su capacidad funcional a través de la activación de la respuesta inmunitaria utilizando un modelo de inoculación intraabdominal/intraperitoneal en pollos y lechones. Se detectó una gran infiltración leucocitaria a las 24 horas postinoculación compuesta por polimorfonucleares, monocitos/macrófagos y linfocitos. Además, se identificaron patrones diferenciales de activación de macrófagos, como la producción de especies reactivas de oxígeno en ambos modelos animales. Para esto se utilizó una metodología combinatoria en base a características morfométricas y citometría de flujo. Los resultados mostraron que las proteínas rHA-H2 y rHA-H1 poseen una capacidad inmunogénica. Estos resultados establecen los fundamentos sobre el desarrollo inmunológico frente a estas proteínas recombinantes, como base para el establecimiento de una potencial respuesta inmune a largo plazo en estos modelos animales.

Palabras clave: virus de la influenza aviar, virus de la influenza porcina, HA recombinante, respuesta inmune innata, inmunogenicidad, desarrollo de candidatos vacunales

ABSTRACT

Influenza A virus is the most important avian pathogen and represents a major concern for animal and public health. Waterfowl are the natural reservoir for all subtypes and the main source for transmission to susceptible species such as pigs. Peru has a critical location along the migration route of wild birds in the Americas, making it of major relevance for viral evolution. Due to the importance for influenza surveillance, this study aimed for the viral isolation of fecal samples obtained from aquatic birds of the coast of Lima, and nasopharyngeal swabs from swine during the period from 2019 to 2021 in our country. A total of 421 avian and 206 porcine samples were processed for virus isolation in embryonated chicken eggs, and cell culture, respectively. Viral identification was performed using a taqman-based qRT-PCR and full-genome analysis through NGS. Four low-pathogenicity avian influenza virus subtypes were detected as H2N6, H6N2, H6N8 and H13N6. Phylogenetic analysis revealed a close relationship to North American avian influenza viruses, highlighting distinctive features that might provide them with unique properties. For production of recombinant HA proteins, we selected an H2N6 avian influenza virus obtained in this study (rHA-H2) and an H1N1 swine influenza virus closely related to the pdm2009 strain (rHA-H1), using a Baculovirus expression vector system (BEVS). Their functional capacities were evaluated through the activation of immune responses using an intra-abdominal/intraperitoneal inoculation model in broiler chickens and piglets. A large proportion of infiltrating leukocytes at 24 hours post inoculation composed of polymorphonuclear cells, monocyte/macrophages and lymphocytes was identified. Moreover, differential patterns of macrophage activation such as reactive oxygen species production in both animal models were detected. A combinatorial approach of morphological and flow cytometry-based assay was used. The results showed that both rHA-H2 and rHA-H1 proteins have a strong immunogenic capacity. These results provide the fundamental knowledge of the immunological activation against these recombinant proteins, as the basis for the development of a potential long-term immune response in these animal models.

Keywords: avian influenza virus, swine Influenza virus, recombinant HA, innate immune response, immunogenicity, vaccine candidate development

I. INTRODUCCIÓN

El Perú posee una amplia industria avícola caracterizada por la crianza de diversas especies aviares domésticas como pollos, gallinas y pavos como los ejemplos de crianza intensiva, además de otros tipos de crianza a menor escala de codornices y patos. Es así que estas especies constituyen la principal fuente de proteína animal del país, la cual es representada por la carne de pollo y el huevo, donde el consumo per cápita en el año 2022 llegó a 52.19 y 15.27 kg, respectivamente (MIDAGRI, 2023), siendo los más altos a nivel de todos los estratos sociales. Por otro lado, la carne de cerdo es una de las fuentes proteicas más populares en el país, aunque de menor consumo que las fuentes avícolas (5.89 kg/per cápita en el año 2022) (MIDAGRI, 2023). La industria porcina, de igual forma está constituida por empresas de crianza tecnificada, semitecnificada, así como de traspatio. Estas cifras han ido incrementándose año tras año, reflejando el crecimiento de estos sistemas productivos, así como, la importancia de estos productos en la alimentación.

El constante desarrollo y crecimiento productivo de ambas industrias ponen en evidencia los riesgos sanitarios, infecciosos y aquellos causados por el manejo (Rauw *et al.*, 1998). El aislamiento físico de las granjas y la concientización del personal constituyen la base de la bioseguridad, sin embargo, como parte de las políticas de prevención, el uso de vacunas es muchas veces indispensable en lugares donde existen enfermedades endémicas y zonas de crianza intensiva cercanas a zonas de crianza no tecnificada o de traspatio, donde el control sanitario y bioseguridad es menor, y muchas veces constituyen reservorios de diversos agentes infecciosos (Lycett *et al.*, 2019; Souillard *et al.*, 2024).

Desde el enfoque de Una Salud, el virus de Influenza A (VIA) es uno de los agentes infecciosos de mayor preocupación a nivel mundial, debido a que afecta a diversas especies aviares, tanto silvestres como domésticas, y mamíferas, como los porcinos, equinos, felinos, caninos, mamíferos acuáticos y el ser humano. Por lo tanto, dentro de la industria, el virus de Influenza Aviar (vIA) y el virus de Influenza porcina (vIP) constituyen los mayores agentes de preocupación para la salud animal (Blagodatski *et al.*, 2021), siendo la industria avícola y porcina potenciales blancos

ante un posible ingreso de la enfermedad en el territorio peruano, sin perder de vista el potencial riesgo para la salud pública del país.

La vigilancia activa constituye una herramienta sustancial para el conocimiento de los subtipos circulantes, así como las investigaciones sobre su evolución en una región (Spackman *et al.*, 2016). Estas actividades son vitales para lograr una óptima preparación ante brotes en animales y el hombre, así como aquellos de potencial pandémico como se observó en la emergencia del subtipo H1N1 pandémico de 2009 (H1N1pdm09). Es así, que la alta variabilidad antigénica del VIA representa un desafío continuo para el desarrollo de estrategias de prevención y control a nivel mundial (Cho y Wrammert, 2016).

Previo a la emergencia del subtipo H5N1 aviar de alta patogenicidad a fines del año 2022, el Perú fue considerado un país libre de la enfermedad en aves domésticas. Sin embargo, diversos estudios de vigilancia activa se realizaron con el objetivo de determinar la presencia del virus en el Perú en poblaciones silvestres y cuáles son los subtipos circulantes en poblaciones animales de mayor riesgo. Es así que se detectó la presencia de diversos subtipos, principalmente de baja patogenicidad, en aves silvestres acuáticas costeras (Nelson *et al.*, 2016). Por otro lado, en las crianzas porcinas, existe un estudio realizado en granjas no tecnificadas donde se detectó la presencia del subtipo H1N1, el cual estaba muy relacionado con el subtipo H1N1pdm09 de gran riesgo para la salud pública (McCune *et al.*, 2012).

Es por ello que el presente estudio tuvo como objetivo dar continuidad a los trabajos de vigilancia activa en el Perú. Así mismo, se contempló realizar la caracterización genómica de los subtipos aislados a fin de contribuir con la información genética viral regional, y finalmente, evaluar características de la glicoproteína Hemaglutinina viral de los agentes con la visión de evaluar potenciales candidatos vacunales en beneficio de las industrias avícola y porcina.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Virus de Influenza A (Etiología)

El Virus de Influenza A (VIA) es un patógeno de distribución mundial que afecta a humanos y diversas especies aviares y mamíferas. Perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae* (Lycett *et al.*, 2019), los cuales poseen un genoma ARN viral pequeño caracterizado por presentar 8 segmentos. Estos virus se han clasificado en cuatro tipos: A, B, C y D, basado en las variaciones ubicadas a nivel de las proteínas M1 y NP (Dou *et al.*, 2018; Mostafa *et al.*, 2018).

2.1.1. Taxonomía y clasificación del virus de Influenza A

Acorde al Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), la reciente clasificación viral, define los tipos de influenza como géneros Alphainfluenzavirus, Betainfluenzavirus, Deltainfluenzavirus y Gammainfluenzavirus. Los VIA corresponden al género Alphainfluenzavirus, siendo todos sus subtipos pertenecientes a la especie *Alphainfluenzavirus influenzae*. Por lo tanto, la completa descripción taxonómica de este agente corresponde a la siguiente: Dominio: Riboviria; Reino: Orthornavirae; Phylum: Negarnaviricota; Subphylum: Polyploviricotina; Clase: Insthoviricetes; Orden: Articulavirales; Familia: Orthomyxoviridae; Género: Alphainfluenzavirus; Especie: Alphainfluenzavirus influenzae (ICTV 2023).

La clasificación de los subtipos virales se basa en las propiedades genéticas y antigénicas de las glicoproteínas de superficie Hemaglutinina (HA) y la proteína Neuraminidasa (NA), responsables del ingreso y salida de la célula, respectivamente. Estas proteínas son las que interactúan con los receptores en la superficie celular (Sun *et al.*, 2016). Actualmente, se han descrito 16 subtipos de HA y 9 subtipos de NA presentes en aves silvestres acuáticas (Dou *et al.*, 2018). En los últimos años han sido descritos los subtipos H17N10 y H18N11 en murciélagos en Centro y Latinoamérica (Tong *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014; Sato *et al.*, 2019). Sin embargo, estas glicoproteínas no guardan las funciones características descritas para Influenza A, siendo denominadas proteínas “tipo” HA y NA.

2.1.2. Características del virus de Influenza A

2.1.2.1. Morfología:

El virus de Influenza A posee una forma esférica con un diámetro aproximado de 100 nm (80-100 nm), sin embargo, cuando los viriones son recién liberados poseen una estructura filamentosa (Rossman y Lam, 2011; Suarez, 2017; Vahey y Fletcher, 2019). Posee una membrana lipídica o envoltura viral que deriva de la membrana celular hospedera, donde se encuentran insertadas las proteínas de superficie Hemaglutinina (HA), Neuraminidasa (NA) y Matriz 2 (M2). La HA se observa como una estructura trimérica a manera de espículas y es la más abundante en la superficie viral. En la cara interna de la envoltura se encuentra la proteína de Matriz 1 (M1) la cual cumple una función de soporte de la envoltura viral. En el interior, el genoma viral se encuentra en forma de estructuras de ribonucleoproteína viral (RNPv) (Figura 1A).

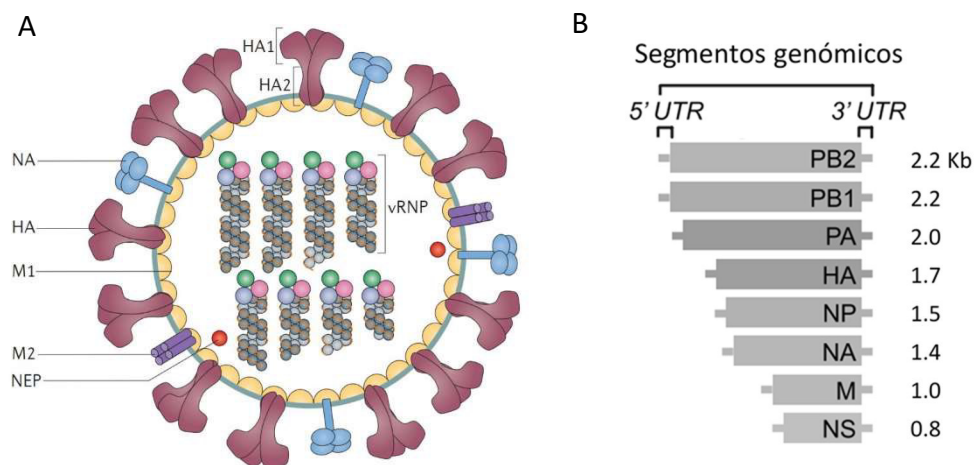


Figura 1. Estructura del Virus de Influenza A. (A) Se observa un virión VIA compuesto de 8 segmentos genómicos empaquetados en los complejos de ribonucleoproteína viral (RNPv). La superficie presenta las proteínas estructurales Hemaglutinina (HA), Neuraminidasa (NA) y la proteína M2. En la cara interna de la envoltura se observa la proteína M1 y la NS1 (NEP) proteína de exportación nuclear. (B) Representación esquemática del genoma del VIA, donde se observan los 8 segmentos genómicos y su longitud aproximada (Kb). Se esquematizan las regiones codificantes (rectángulo) y las regiones no transcripcionales o regiones no traducidas (UTR, siglas en inglés) en los extremos 5' y 3' (líneas) (Dou *et al.*, 2018; Petrova y Russell, 2018).

2.1.2.2. Genoma viral

Los virus miembros del género *Alphainfluenzavirus* poseen un genoma ARN pequeño (13 Kb), segmentado, de cadena simple y polaridad negativa. Presenta 8 segmentos genómicos que codifican al menos 10 proteínas virales (Lycett *et al.*, 2019; Hao *et al.*, 2020) y se encuentran conformando estructuras de ribonucleoproteína viral (RNPv) individuales. Cada RNPv se compone de una secuencia de ARN viral (ARNv) envuelta por numerosas copias de Nucleoproteína (NP) y unidos a la polimerasa viral, la cual corresponde a una estructura heterotrimérica conformada por las proteínas Polimerasa básica 1 (PB1), Polimerasas básica 2 (PB2) y Polimerasa ácida (PA) (Dou *et al.*, 2018; Petrova y Russell, 2018; Hao *et al.*, 2020). Es en la polimerasa PB1 donde se unen los segmentos genómicos mediante una secuencia horquilla helicoidal que resulta del apareado de bases entre los extremos conservados semicomplementarios 5' y 3' (Dou *et al.*, 2018). Las secuencias correspondientes a los extremos de cada segmento genómico presentan el mismo patrón 5'-AGUAGAAACAAGG (en el extremo 5') y 3'-UCG(U/C)UUUCGUCC (en el extremo 3') (Abdelwhab y Abdel-Moneim, 2019).

Un esquema de la estructura genómica se presenta en la figura 1B, donde se observan los tamaños aproximados de cada estructura.

2.1.2.3. Proteínas virales

El genoma viral, compuesto por ocho segmentos de ARN, codifican entre 10 y alrededor de 17 proteínas virales según la cepa (Yamayoshi *et al.*, 2016; Rajao *et al.*, 2019). A continuación, se describen brevemente las diferentes proteínas virales:

Complejo polimerasa viral. La polimerasa viral está formada por tres subunidades proteicas como el PB1, PB2 y PA.

La enzima PB1, codificada por el segmento 2, es la subunidad central de la estructura heterotrimérica de la polimerasa viral siendo el sitio de unión para los extremos 5 y 3' de los segmentos genómicos virales. Contribuye a la polimerización de ARN a través de su unión al promotor del ARN viral en los

procesos de síntesis genómica y de ARNm (Biswas *et al.*, 1998; Dou *et al.*, 2018). La enzima PB2, codificada por el segmento 1, posee la actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN. Actúa al inicio de la síntesis del ARN mensajero (ARNm) viral reconociendo y uniéndose al extremo 5' de los ARN celulares (caperuza) para utilizarlos como iniciadores de transcripción viral (Webster *et al.*, 1992; Biswas *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2017). Finalmente, la polimerasa PA, codificada por el segmento 3, es la subunidad de acción endonucleasa que escinde el extremo 5' de los ARN celulares, ya unidos a la subunidad PB2. Este extremo de los ARN celulares (Cap) serán usados como iniciadores de la síntesis de nuevas hebras de ARN viral (Biswas *et al.*, 1998; Dou *et al.*, 2018; Lo *et al.*, 2018).

Proteínas estructurales. En la envoltura viral se observan las 2 mayores glicoproteínas virales que corresponden a HA y NA, así como la proteína M, subunidad M1 y M2.

La proteína HA (segmento 4) es una glicoproteína trimérica de superficie responsable del proceso de unión a la célula mediante unión a receptores específicos que poseen ácido acetilneuramínico N-terminal (ácido siálico) ampliamente encontrado en células epiteliales del tracto respiratorio y digestivo. Así mismo, HA promueve la fusión de membranas para la internalización y liberación del material genético en el citoplasma de la célula infectada para lo cual requiere del clivaje de la proteína HA en sus 2 dominios H1 y H2 mediante acción de enzimas del hospedero (Dou *et al.*, 2018; York *et al.*, 2019). El dominio H1 contiene la secuencia de unión al receptor celular y constituye el mayor blanco para la respuesta inmune; por otro lado, el dominio H2 contiene la secuencia del péptido fusión mediando la unión de la envoltura y la membrana celular (Suzuki y Nei, 2002; Russell *et al.*, 2008).

La proteína NA (segmento 6) es una glicoproteína tetramérica de actividad enzimática de importante función en la salida de los viriones. Es responsable de la remoción de los residuos de ácido siálico de la superficie celular permitiendo la liberación de los viriones recién formados de la célula infectada (Xu *et al.*, 2017; McAuley *et al.*, 2019; York *et al.*, 2019).

La proteína M es codificada en dos subunidades de distinta función. La subunidad M1, ubicada en la cara interna de la envoltura viral, posee una función de soporte de la envoltura viral, por lo tanto, un rol importante durante el ensamblaje y formación de los viriones. En esta proteína se anclan las 8 RNPv adoptando la típica configuración 1+7 en el interior del virión. Por otro lado, la subunidad M2 constituye un canal iónico en la envoltura viral, el cual permite el paso de enzimas que acidifican el medio interno viral, facilitando la liberación o desprendimiento de los RNPv de las proteínas M1 (Rossman y Lamb, 2011; Dou *et al.*, 2018; Nuñez y Ross, 2019).

La proteína NP se asocia a las cadenas de RNA genómico para dar estabilidad y orden a la estructura de la RNPv mediando la unión y adecuado empaquetamiento del ARN viral; así mismo, está involucrada en el desarrollo de la síntesis de ARN (transcripción o replicación) (Biswas *et al.*, 1998; Rossman y Lamb, 2011).

Proteínas no estructurales: El segmento que codifica a la proteína no estructural (NS) es expresado en dos subunidades, NS1 y NS2.

La proteína no estructural 1 (NS1) está involucrada principalmente en la evasión de la respuesta inmune mediante diferentes vías, también limita la poliadenilación de ARNm del hospedero, interfiere con varias vías de señalización celular y controla la síntesis y empalme del ARN viral (Hao *et al.*, 2020). La proteína NS2, también conocida como NEP, posee un rol en la mediación de la exportación nuclear de los RNPv hacia el citoplasma durante la replicación viral (Rossman y Lamb, 2011; Petrova y Russell, 2018). Adicionalmente, algunas cepas de VIA expresan una proteína no estructural denominada PB1-F2, la cual está asociada a la inducción de la apoptosis en la célula hospedera. Esta proteína es transcrita a partir de un segundo marco de lectura abierto en la secuencia PB1 (Rossman y Lamb, 2011).

2.1.3. Propiedades antigénicas

Las proteínas de superficie Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) constituyen los principales determinantes antigénicos y su caracterización permite la

determinación del subtipo. La proteína HA es responsable de la unión al receptor en la superficie celular e ingreso a la célula, así como de la inducción de hemaglutinación de glóbulos rojos, y es el principal antígeno de superficie inductor de anticuerpos neutralizantes (Van Reeth y Ma, 2013). Es por ello que la proteína HA constituye el blanco principal para el desarrollo de vacunas.

Morfológicamente, la proteína HA es un trímero compuesto por una cabeza globular que contiene el sitio de unión al receptor (RBS, *Receptor binding site*), esencial para la unión a la célula hospedera. Así mismo, posee una región del tallo, la cual está involucrada en el proceso de fusión de membranas para el ingreso a la célula (Cho y Wrammert, 2016; Van Reeth, 2018). En la región de la cabeza globular se han descrito cinco distintos sitios antigénicos designados como Sa, Sb, Ca1, Ca2 y Cb. Cada sitio se conforma por aminoácidos que forman bucles en la proteína HA y contiene múltiples epítomos. Los cinco sitios antigénicos poseen la característica de inmunodominancia con respecto a otras regiones antigénicas en la cabeza y tallo (Das *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2018; Van Reeth, 2018). Los sitios Sa y Sb, específicos de cepa (S), corresponden a los sitios antigénicos más variables y están ubicados cerca del RBS. Los sitios C presentan una menor variabilidad y constituyen sitios que pueden presentar reacción cruzada dentro de los subtipos y se ubican más lejos del RBS (hacia la parte inferior de la cabeza HA) (Das *et al.*, 2010; Van Reeth, 2018).

La región del tallo de HA posee una secuencia altamente conservada entre los diferentes subtipos, con una tasa evolutiva mucho más lenta en comparación al dominio de la cabeza globular HA. Es por ello que ha sido considerado blanco para el desarrollo de vacunas universales contra las variantes relacionadas a cambios antigénicos de tipo Drift. De esta manera, este tipo de vacunas tendrían la capacidad de generar protección contra diversos subtipos con mayor duración de la misma (Kirkpatrick *et al.*, 2018; Van Reeth, 2018; Mathew y Angeletti, 2020).

2.1.4. Ciclo de replicación viral

El ingreso del virus a la célula es mediado por receptores. Este proceso inicia con el reconocimiento del dominio de unión al receptor en la proteína HA viral desencadenando el proceso de endocitosis. Los receptores corresponden a residuos terminales de ácido siálico (SA, ácido N-acetilneuramínico) ubicados en los

receptores de glicoproteína o glucolípidos en la superficie de la célula hospedera. Estos residuos de ácido siálico se unen a la penúltima molécula de galactosa en dos conformaciones, en la posición $\alpha 2,3$ (de mayor distribución en aves) o en la posición $\alpha 2,6$ (presentes principalmente en mamíferos) (Dou *et al.*, 2018; Neumann y Kawaoka, 2019; Rajao *et al.*, 2019; Sempere Borau y Stertz, 2021). Una vez que se une al receptor celular, se inicia un proceso de internalización mediado por clatrina principalmente, formando una vesícula que posteriormente será transportada hacia los endosomas (tempranos y tardíos), los cuales crean un medio alto en iones de hidrógeno (H^+) reduciendo el pH; y lisosomas, donde ocurre la exposición a las enzimas celulares e incrementa la acidez, generando cambios conformacionales a nivel estructural del virus (Dou *et al.*, 2018; Russell *et al.*, 2018; Aganovic, 2023). A su vez, el canal iónico M2 activado se abre para liberar las ribonucleoproteínas virales (RNPv) de la proteína M1 acidificando el interior viral (Sempere Borau y Stertz, 2021).

La fusión de la membrana celular y la envoltura viral requiere de un proceso de ruptura o clivaje de la proteína HA en sus 2 subunidades, HA1 y HA2, por acción de proteasas propias de la célula hospedera, principalmente tripsina, presente en el epitelio del tracto respiratorio y digestivo. La enzima furina, siendo una proteína endógena ha sido descrita como catalizadora del clivaje de HA en el caso de virus de Influenza aviar (vIA) de alta patogenicidad (Dou *et al.*, 2018; Russell *et al.*, 2018; Beau Reneer y Ross, 2019). Este proceso permite la exposición del péptido de fusión ubicado en el extremo N-terminal de la HA2 para su inserción en la membrana endosomal. Posteriormente la HA se transforma en un trímero de horquillas para promover la formación del poro de fusión (producto de la fusión de la membrana celular y membrana viral), que libera los RNPv en el citosol. Las señales de localización nuclear (NLS) expuestas en los RNPv son reconocidas por la proteína adaptadora que facilita el transporte a través del complejo de poros nucleares (NPC) y hacia el interior del núcleo (Dou *et al.*, 2018; Sempere Borau y Stertz, 2021).

En el núcleo, la ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp) heterotrimérica realiza los procesos de síntesis de ARNm y replicación de los segmentos de ARNv. La replicación del genoma viral implica un paso de síntesis de cadenas de ARN complementario (ARNc), y la subsecuente producción de nuevas

copias de ARNv utilizando los ARNc como plantillas (Dou *et al.*, 2018). La producción de ARNc es realizada por la RdRd viral, iniciando con la síntesis de la cadena complementaria de sentido positivo. Este proceso requiere de la complementación adecuada de moléculas de ribonucleótido trifosfato (rNTPs), como GTP y ATP, con el extremo 3' del ARN genómico viral. Este paso une la secuencia genómica al sitio activo de la RdRp en la subunidad PB1, dando lugar a la formación del dinucleótido A-G desde donde se inicia la extensión de la cadena de ARNc. Posteriormente se une con las nuevas proteínas RNP y polimerasa viral formando la ribonucleoproteína complementaria (RNPC). De similar forma y a partir de ella, se generarán las nuevas secuencias de RNA genómico empaquetándose finalmente con nuevas proteínas NP y polimerasas sintetizadas, formando la nueva RNPv (Rossman y Lamb, 2011; Dou *et al.*, 2018; Lo *et al.*, 2018).

El proceso de síntesis de ARNm viral corresponde a la producción de ARNm a partir de las secuencias genómicas virales que serán posteriormente utilizados para la producción de las proteínas virales. Para este proceso se requiere que cada segmento genómico incorpore una secuencia Cap en su extremo 5'. Para ello, la RdRp viral, a través de la subunidad proteica PA (asistido por la ARN polimerasa II C-terminal de la célula) se une a la secuencia Cap de ARNm celular (cap snatching). Posteriormente, la subunidad PB2 se une a este Cap y se genera el clivaje 10 a 13 nucleótidos posteriores a esta zona por acción endonucleasa de la subunidad PA. Posterior al clivaje, se crea un cambio conformacional que reposiciona la secuencia Cap de ARNm a la subunidad PB1, donde se empalma con la secuencia complementaria del segmento genómico viral en su extremo 3' y se cataliza la adición de nucleótidos durante la extensión del nuevo ARNm viral usando a la secuencia genómica como templado. Finalmente, la nueva secuencia sintetizada es poliadenilada en un probable proceso cíclico reiterativo donde serán adicionadas 5 a 7 bases de uracilo en el extremo 3', y es exportada al citoplasma (Biswas *et al.*, 1998; Reich *et al.*, 2014; Dou *et al.*, 2018).

La síntesis de proteínas o traducción se realiza en el citoplasma. Las proteínas no estructurales como las polimerasas, NP, NS, así como la M1, serán sintetizadas mediante los ribosomas citosólicos, mientras que las proteínas estructurales, por los ribosomas del retículo endoplásmico (RE) hacia la vía secretoria para la producción

de las proteínas asociadas a membrana (proteínas HA, NA y M2). Una vez sintetizadas las subunidades PA, PB1 y PB2 y la proteína NP, estas son importadas mediante las proteínas importin- α e importin- β de vuelta al núcleo, donde se ensamblarán las nuevas estructuras de RNP viral. Los RNPv ensamblados se asocian a la NS2 y, a su vez, a la proteína CRM1 o exportin 1 (miembro de la familia importin- β), la cual media su salida al citoplasma. Al ser exportados los RNPv se deben asociar a Rab11 para alcanzar la superficie celular. Pueden asociarse a vesículas que contienen Rab11 o asociarse a Rab11 presente en las membranas del retículo endoplasmático (Elton *et al.*, 2001; Dou *et al.*, 2018).

Para la producción de proteínas HA, NA y M2, los respectivos ARNm son exportados para su traducción en los ribosomas citosólicos. La exposición de la secuencia señal N-terminal de la HA y los dominios transmembrana de la NA y M2 recluta la partícula de reconocimiento de señales (SRP), la cual las dirige al complejo de cadena naciente del ribosoma en el RE. Posterior a la síntesis, las proteínas se oligomerizan y son transportadas a través del aparato de Golgi hacia la membrana plasmática, en una zona donde se localizan o acumulan, siendo una zona específica donde ocurrirá la gemación. Así mismo, la proteína M1 se acumula en dicha zona asociándose a las colas citoplasmáticas de HA y NA; y las RNPv recién formadas son exportadas desde el núcleo a esa ubicación (Rossman y Lamb, 2011; Dou *et al.*, 2018). Con todos los componentes virales disponibles, se inicia el ensamblaje en la zona apical del sitio de gemación. Las RNPv se asocian a las estructuras de M1 en la pared citoplasmática generando la disposición 1+7. La formación de la curvatura requerida para la gemación se adjudica a una serie de factores considerándose los principales la influencia de la proteína M1 en la superficie citoplasmática, así como la misma presencia e influencia de las proteínas estructurales en la superficie externa. Finalmente, las partículas virales ensambladas se liberan para infectar otras células y continuar el ciclo de replicación (Chen *et al.*, 2007; Rossman y Lamb, 2011; Dou *et al.*, 2018).

2.1.5. Patogenicidad viral

La proteína hemaglutinina es el determinante de virulencia de los VIA. Esta proteína se traduce en un precursor denominado H0 que, al ser sometido a la actividad

enzimática celular, será escindida formando las subunidades HA1 y HA2. Este paso es requisito indispensable para que el virus pueda infectar la célula hospedera.

Desde esta perspectiva, los virus de Influenza Aviar se clasifican en virus de Influenza aviar de baja patogenicidad (IABP) y virus de Influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP). Ambos presentan diferencias a nivel de la secuencia aminoacídica de la zona de clivaje de la HA, donde la frecuencia de aminoácidos básicos determinará su potencial patogenicidad. Los virus de baja patogenicidad poseen una secuencia monobásica en el sitio de clivaje de la HA, es decir, que pueden encontrarse 1 o 2 aminoácidos básicos (Arg, Lys, His) dispersos entre los últimos 6 a 8 aminoácidos del extremo carboxilo del dominio HA1, generalmente una arginina (Abdelwhab *et al.*, 2016; Nao *et al.*, 2017). El sitio de clivaje de la HA en los virus de baja patogenicidad interactúa únicamente con la proteasa tripsina por lo que las infecciones se circunscriben al tracto entérico y respiratorio del hospedero, donde pueden causar leve a moderada infección e incluso ser asintomático (Nao *et al.*, 2017). Por otro lado, en los virus de alta patogenicidad ocurren cambios a nivel de la zona de clivaje de la HA causado por la adquisición de múltiples aminoácidos básicos (con un mínimo de 1 arginina y 1 lisina; o 2 argininas), producto de sustituciones o inserciones de nucleótidos que generan una secuencia multibásica. Estos cambios permiten que la proteína pueda interactuar con enzimas ubicuas celulares como furina y PC-6 para su escisión, por lo que el virus adquiere la capacidad de desarrollar infección sistémica y enfermedad de alta mortalidad (Abdelwhab *et al.*, 2016; Nao *et al.*, 2017; Kida *et al.*, 2021).

Es así que los subtipos virales H5 y H7 de alta patogenicidad surgen de subtipos de baja patogenicidad que han sufrido cambios característicos en la zona de clivaje que les confirió el carácter de mayor virulencia (Nao *et al.*, 2017). Sin embargo, se han identificado otros subtipos que han alcanzado la condición de alta patogenicidad sin obedecer estas características como, por ejemplo, un reporte de virus subtipo H10 que carece del sitio de clivaje característico, sin embargo, en el índice de patogenicidad intravenosa (IPIV) demostró alta patogenicidad (Wood *et al.*, 1996; Kida *et al.*, 2021). Por otro lado, se reportó también un virus H4 que presentó una secuencia de 3 argininas en la zona de clivaje, pero demostró baja patogenicidad en pollos en la prueba IPIV (Wong *et al.*, 2014; Kida *et al.*, 2021).

Si bien es la HA la proteína principal determinante de virulencia, además de la NA, los otros genes también pueden contribuir con su patogenicidad. De esta manera, se requiere de una combinación de genes internos muy buena para lograr la mayor expresión de la virulencia de un subtipo (Dey *et al.*, 2023)

2.2. Evolución del Virus de Influenza

Los virus de Influenza A han evolucionado formando diversos linajes, los cuales también tienen una característica distribución geográfica (Everest *et al.*, 2020). La constante variación de los antígenos de superficie viral HA y NA ocurren en respuesta a la presión del sistema inmune hospedero, y estos se deben a los cambios de “Shift” antigénico y “Drift” antigénico que este tipo de virus desarrollan (Dou *et al.*, 2018).

2.2.1. Mutaciones

Las mutaciones puntuales ocurren debido a la propensa capacidad de cometer errores propia de una RNA polimerasa dependiente de ARN, y a su vez, que carece de un mecanismo de revisión y corrección. Este tipo de eventos se conocen como cambios antigénicos de tipo Drift (Seong *et al.*, 2016; Neumann y Kawaoka, 2019; Rajao *et al.*, 2019). Es así que el VIA posee una alta tasa de mutación, es decir, mutan constantemente lo que permite que el virus se adapte rápidamente a cambios o estrés proporcionado por las especies hospederas, como es el caso durante la transmisión entre especies.

La acumulación de mutaciones puntuales a lo largo del tiempo generará cambios en las proteínas, pero cuando estas mutaciones ocurren en los segmentos HA o NA, por lo general, se atribuye a un mecanismo de escape de la presión inmunitaria. Los cambios correspondientes a estas mutaciones son constantes, no prevenibles y son la causa de brotes estacionales de enfermedad respiratoria en animales y en el ser humano (Neumann y Kawaoka, 2019; Rajao *et al.*, 2019).

2.2.2. Reordenamiento genético

Teniendo en cuenta la estructura genómica de los virus de Influenza A que consiste en ocho complejos de RNPv separados, conteniendo cada uno de los segmentos genómicos, son estas estructuras las que juegan un rol primordial en el ensamblaje del virión (Dadonaite *et al.*, 2019). Esta segmentación ofrece la potencial ocurrencia de reordenamientos, es decir, el intercambio de segmentos genómicos completos entre dos diferentes cepas de VIA presentes en una célula durante una coinfección (Lowen, 2017; Dou *et al.*, 2018; Dadonaite *et al.*, 2019).

Este mecanismo, también conocido como cambio antigénico de tipo Shift, constituye el mayor mecanismo de adaptación del virus a los nuevos hospederos, pudiendo generar nuevos genotipos virales (Arai *et al.*, 2018). Así mismo, constituye un mecanismo mayor de diversificación genética de los VIA, importante para la evolución y son responsables de la emergencia de nuevas variantes con potencial pandémico (Arai *et al.*, 2018; Dou *et al.*, 2018). Sin embargo, este tipo de eventos corresponde a procesos ocasionales, de baja frecuencia, que implican contacto entre diferentes especies hospederas.

Por ejemplo, el intercambio de segmentos entre VIA exclusivamente de humanos y VIA exclusivos de reservorios animales puede generar la emergencia de cepas potencialmente patógenas para poblaciones humanas carentes de inmunidad para un nuevo subtipo (Lowen, 2017), como lo ocurrido en las gripes pandémicas reportadas en la historia de la humanidad.

2.2.3. Adaptación del Virus de Influenza A

Históricamente, la evolución de los virus de Influenza humana y porcina se han relacionado íntimamente. Diversos estudios genéticos han evidenciado que las pandemias ocasionadas por el VIA de 1957, 1968 y 2009, emergieron tras mecanismos de reordenamiento derivado de virus de origen humano y animal, así como eventos de transmisión zoonótica inversa; sin embargo, también se ha evidenciado la ocurrencia de infección directa de cerdos con VIA de origen puramente aviar. Como resultado de estos procesos, una variedad de sublinajes y genotipos de virus de IP ahora prevalece en las poblaciones porcinas de todo el

mundo, algunas con restricciones geográficas. Algunos de estos virus pueden tener potencial zoonótico y tener capacidad de retransmitirse a la población humana (Henritzi *et al.*, 2016; Lycett *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2020).

La aparición de subtipo H1N1pdm09 trajo una mayor conciencia global, transectorial a la evolución y epidemiología del VIA, sin embargo, aún hay escasez de información en cuanto a la epidemiología de este agente en varios países de Latinoamérica. Esta situación demanda la participación activa de entidades gubernamentales internacionales (Schnitzler y Schnitzler, 2009). Es por ello que el continuo monitoreo de los virus de Influenza porcino y aviar, así como los estudios de su potencial zoonótico, son esenciales para la prevención de pandemias de infección humana (Ozawa y Kawaoka, 2013; Sun *et al.*, 2020).

La actual epizootia del VIA H5N1 trae a la luz el potencial patogénico letal del VIA, mostrando su gran capacidad de dispersión y adaptación a nivel global. Desde la emergencia en China del subtipo H5N1 de alta patogenicidad en 1996, este subtipo se volvió endémico en diversas especies de aves en diversos espacios geográficos, del continente asiático y africano, principalmente en China y Egipto (Arai *et al.*, 2018). Los orígenes del linaje H5N1 datan del año 1996, donde se identificó la cepa A/Goose/Guangdong/1/1996 (H5N1- GsGd), que emergió como un virus que mutó de baja a alta patogenicidad, llegando a adaptarse en especies aviáres, mamíferos e incluso humanos con consecuencias fatales y permaneció circulante en países asiáticos y africanos (Poen *et al.*, 2019; Bui *et al.*, 2021). Producto de diversas adaptaciones, este linaje causó mayor impacto a partir del año 2000, donde se dispersó hacia Europa (Blagodatski *et al.*, 2021; Dey *et al.*, 2023). Entre 2015 y 2019, este linaje se dispersó y ocasionó mayor mortalidad en diversas especies silvestres y afectando a la avicultura en países asiáticos y europeos. En este proceso sufrió intercambios genéticos ocasionales con virus de baja patogenicidad (Isoda *et al.*, 2022; Dey *et al.*, 2023; Shi *et al.*, 2023). A fines de 2021, el virus llegó a Norteamérica ocasionando grandes pérdidas en el sector avícola diseminándose rápidamente desde la zona del Atlántico hacia el oeste (Bevins *et al.*, 2022). A fines de 2022, llegó a países sudamericanos, una región donde básicamente no existían casos de Influenza aviar como fue Perú. La emergencia H5N1 causó grandes estragos para la avicultura nacional y la fauna silvestre local, dada su gran patogenicidad

intrínseca y gran capacidad de adaptación a diferentes especies (Agüero *et al.*, 2023; Vreman *et al.*, 2023). En el Perú, este subtipo ocasionó gran mortalidad de la fauna silvestre aviar, siendo las especies más afectadas el Pelicano peruano (*Pelecanus thagus*), el Cormorán Guanay (*Phalacrocorax bougainvillii*) y el piquero peruano (*Sula variegata*), dispersándose posteriormente en las aves silvestres urbanas y finalmente, en aves domésticas (Castro-Sanguinetti *et al.*, 2024). Es así que la importancia del monitoreo e investigación de los subtipos circulantes cobra aún mayor prioridad en territorio peruano.

2.3. Ecología del virus de Influenza A

2.3.1. Hospederos

El VIA está presente en una gama amplia de especies hospederas, principalmente difundido en aves, seres humanos, equinos, porcinos y ocasionalmente en cetáceos y mustélidos (Jiménez-Bluhm *et al.*, 2016; Vittecoq *et al.*, 2019). Las aves silvestres son consideradas como los reservorios naturales en la ecología viral de los VIA, pues en ellas se han aislado todos los subtipos virales (H1 al H16 y N1 al N9) en todo el mundo, incluyendo la Antártida (Olsen *et al.*, 2006; Hurt *et al.*, 2016).

Es así que se han encontrado VIA en diversos órdenes aviares, siendo los 2 principales los Charadriiformes (que abarcan especies como gaviotas, charranes y aves playeras) y Anseriformes (que abarcan patos, gansos y cisnes), que han demostrado ser portadores de una amplia variedad de subtipos virales y poseen un papel importante en la diseminación y perpetuación de los VIA en la naturaleza (van Borm *et al.*, 2012; Vittecoq *et al.*, 2012; Afanador-Villamizar *et al.*, 2017; Stallknecht y Brown, 2017). Dentro de los Anseriformes, la mayoría de detecciones de diferentes subtipos han sido observadas en diversas especies de patos (miembros de la subfamilia Anatidae), siendo el pato silvestre o Mallard (*Anas platyrhynchos*) la especie que más reportes posee. Es así que especies anátidas silvestres son consideradas pieza clave en diseminación y perpetuación de los VIA en la naturaleza (Vittecoq *et al.*, 2012; Stallknecht y Brown, 2017).

Otros órdenes aviáres que poseen portadores del VIA, y habitantes de ambientes acuáticos, corresponden a Ciconiiformes, Gaviiformes, Gruiformes, Pelecaniformes, Podicipediformes, Procellariiformes, Suliformes (Lebarbenchon *et al.*, 2015; Stallknecht y Brown, 2017). Por otro lado, diversos estudios se han realizado en aves Passeriformes y Columbiformes teniendo en cuenta que son aves silvestres comúnmente encontradas alrededor de granjas avícolas. En estos grupos, la información obtenida indica la baja probabilidad de infección y con ello, un rol limitado en la transmisión del vIA. La detección positiva en estas aves ha sido esporádica, donde los individuos han tenido contacto con aves domésticas infectadas en relación a brotes en granjas (Han *et al.*, 2012; Slusher *et al.*, 2014; Stallknecht y Brown, 2017).

2.3.2. Interacción Virus-Hospedero

Siendo las aves acuáticas el reservorio natural para todos los subtipos virales, principalmente aquellas pertenecientes al orden Anseriformes y Charadriiformes, es en estas especies donde el agente puede estar presente de manera asintomática. De esta manera constituyen la fuente de diversidad genética requerida para la emergencia de cepas de potencial capacidad pandémica en humanos, mamíferos y otras aves (van Borm *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta que los virus de IAAP ocurren como resultado de mutación de virus de baja patogenicidad circulantes en aves domésticas (Koutsakos *et al.*, 2019; Hillman *et al.*, 2020), los subtipos antigénicos H5 y H7, constituyen cepas con gran potencial de generar virus altamente patogénicos y ser transmitidos de aves silvestres a aves domésticas ocasionando enfermedad y tasas de mortalidad altas (50 a 100%), y ser causa de casos esporádicos en humanos (Koutsakos *et al.*, 2019; Hillman *et al.*, 2020).

Por otro lado, el virus de Influenza porcina (vIP) es causante de enfermedad respiratoria en porcinos ocasionando cuadros de alta morbilidad y baja mortalidad. Los principales subtipos descritos en porcinos corresponden a H1N1, H1N2 y H3N2 con variantes diversas en todo el mundo (Baudon *et al.*, 2017). Los cerdos son

susceptibles a la infección de diversos subtipos de los VIA, ya sea de origen aviar o de mamíferos, debido a la presencia de los receptores de ácido siálico $\alpha 2$ -6 y $\alpha 2$ -3 en las células del tracto respiratorio del cerdo, en distribución similar a los humanos. La presencia de ambos receptores en las vías aéreas del porcino, evidencian su rol como el “vaso mezclador” para la ocurrencia de rearrreglos o recombinación de segmentos génicos que favorecen la emergencia de cepas de potencial pandémico (Rajao *et al.*, 2019).

Es así que la afinidad de los virus a los residuos terminales de ácido siálico en la superficie de la célula hospedera en disposición $\alpha 2,3$ (de mayor distribución en aves) o $\alpha 2,6$ (presentes principalmente en mamíferos) es un componente importante para la susceptibilidad a la infección viral contribuyendo a la diseminación (Lin y Brass, 2013).

2.3.3. Mecanismos de inmunidad innata contra el virus de Influenza A

La infección por una cepa del virus de Influenza A desencadena mecanismos de respuesta inmune innatos y adaptativos. La respuesta inmune innata actúa para prevenir y restringir la replicación viral en el organismo, activando también la respuesta inmune adaptativa, la cual es fundamental para la eliminación de células infectadas y virus aún presente, resolver la infección, y generar células de memoria en la preparación ante una siguiente infección por VIA (Dey *et al.*, 2023).

En la presente sección se describen a los macrófagos aviares y porcinos como pieza clave del componente celular en la respuesta inmunitaria innata, y algunos mecanismos fundamentales en la respuesta inicial frente a patógenos como el VIA.

2.3.3.1. Respuesta inmune celular innata

El sistema inmunológico innato permite el reconocimiento temprano de los virus y es una barrera importante en la defensa de la infección causada por los virus. Los IAV invaden la capa mucosa del epitelio respiratorio y las células epiteliales y luego se diseminan a otras células inmunes y no inmunes. En estas células, los receptores de reconocimiento detectan fácilmente el virus; esto da

como resultado que se desencadene la producción de IFN tipo 1, y el establecimiento del estado antiviral, responsable de la expresión de numerosos genes estimulados por IFN. Estos buscan reducir la capacidad de replicación del virus y limitar su propagación.

El componente celular abarca la acción de células epiteliales especializadas y las poblaciones de células inmunológicas clásicas que incluyen polimorfonucleares, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales (NK) y linfocitos T, las cuales se activan en respuesta a la infección por VIA, siendo las células dendríticas y los macrófagos las primeras en reconocer y responder ante la infección (Juul-Madsen *et al.*, 2013; Dey *et al.*, 2023). Esta acción tiene por objetivo inhibir la replicación del virus y proteger el epitelio de las vías respiratorias, al mismo tiempo que inducirá la respuesta inmune adaptativa.

Los VIA inducen mecanismos de respuesta celular luego de su interacción con el sistema inmune. Inicialmente estos mecanismos de respuesta se han estudiado en macrófagos humanos y células epiteliales de las vías aéreas (Ramos y Fernandez-Sesma, 2012). Esta primera interacción entre el sistema inmune innato y el virus es mediada por los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs, del inglés *pattern recognition receptors*) (Koutsakos *et al.*, 2019). Dentro de los más importantes PRRs descritos en infecciones por Influenza están los receptores tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll-like receptors*), los receptores tipo dominio de oligomerización nucleotídica (NODs, del inglés *nucleotide oligomerization domain receptors*) y los receptores tipo gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I del inglés *retinoic acid-inducible gene I*) (Iwasaki y Pillai, 2014). Debido a que el reconocimiento puede ser de forma intrínseca (cuando las células son infectadas) o extrínseca (cuando son internalizadas por los fagocitos), se ha establecido que los receptores RIG-I y el inflamosoma NLRP3 juegan un rol fundamental en el reconocimiento intrínseco, mientras TLR-3, 7 y 8 median el reconocimiento extrínseco (Iwasaki y Pillai, 2014).

2.3.3.1.1. Producción de citoquinas y quimiocinas

Aunque existen diferencias en los niveles de activación en células fagocíticas y epiteliales, inicialmente se observa una producción alta de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias por parte del epitelio respiratorio afectado como por ejemplo, interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18), así como la producción de TNF α e IFN β por parte de células de la línea monocítica (Cline *et al.*, 2013; Koutsakos *et al.*, 2019). Esta respuesta induce inflamación local y sistémica que causa sintomatología caracterizada por fiebre y anorexia en los animales. Además, la acción de las quimiocinas atraerá mayor número de leucocitos al sitio de la infección (Koutsakos *et al.*, 2019; Dey *et al.*, 2023).

Aunque la replicación viral en macrófagos es no productiva para algunas formas del virus, existe evidencia de replicación efectiva para otras formas virales en diferentes estirpes de macrófagos. Sin embargo, independiente del desarrollo de la replicación viral, los macrófagos son potentes inductores de respuestas celulares, contribuyendo con la secreción descontrolada de mediadores inflamatorios, también conocido como “tormenta de citoquinas” que es observado en los casos graves de infecciones por virus de Influenza. La infección denominada "tormenta de citoquinas", se refiere a la hipercitocinemia, es decir, a los niveles séricos inusualmente altos de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias que se han reportado en animales y pacientes infectados por H5N1 y se cree que desempeñan un rol importante en la patogenia de la enfermedad, y que conlleva a sintomatología exacerbada y alta mortalidad en animales. Existe una inducción transcripcional muy alta y prolongada de IFN tipo I y genes inducidos por IFN, así como genes importantes en la respuesta de fase aguda como IL-1 e IL-6, TNF- α y varios miembros de la vía del complemento (Koutsakos *et al.*, 2019; Rajao *et al.*, 2019).

2.3.3.1.2. Macrófagos porcinos

Una de las principales estirpes celulares como mecanismo de defensa frente a patógenos foráneos como células fagocíticas (Hoeffel y Ginhoux, 2015) y su contribución al mantenimiento de la homeostasis tisular son los macrófagos

(Roberts *et al.*, 2017). Estas células fagocíticas profesionales tienen la capacidad de internalizar partículas foráneas o restos de células muertas, procesarlas y destruirlas. Para esto es fundamental su capacidad de reconocimiento de antígenos y su alta capacidad de diferenciación celular y sobrevivencia (Richards y Endres, 2014; Okabe, 2018). Los macrófagos provienen de la diferenciación de los monocitos, motivo por el cual comparten funciones celulares comunes. De la misma forma, existen macrófagos con capacidad de proliferación y que se encuentran localizados en tejidos específicos. Así, es posible determinar diferentes estirpes macrofágicas en los mamíferos. Debido a la cercanía con los humanos, los macrófagos porcinos comparten mecanismos de activación y reconocimiento, aunque se hace referencia a diferencias en niveles de activación. Además, existe una mayor conservación de secuencias promotoras entre humanos y porcinos (Fairbairn *et al.*, 2013). Es conocido que los macrófagos porcinos no poseen la capacidad de producir óxido nítrico, incluso ante la presencia de niveles de IFN- γ (Meurens *et al.*, 2012). En estudios de respuesta fagocítica, como marcadores para la identificación de macrófagos se utilizan receptores de superficie celular. Aunque la disponibilidad de marcadores para macrófagos porcinos es menor comparado con otras especies como ratones, aves y humanos, se han realizado notables avances en la descripción y comercialización de anticuerpos monoclonales para su identificación y evaluar su función (Álvarez *et al.*, 2023).

Dentro de los marcadores de macrófagos porcinos se encuentran a CD172a, CD14, CD16, CD163, CD206, dectina-1, y otros (Piriou-Guzylack y Salmon, 2008). El marcador CD172a, también llamado SWC3, fue el primer marcador mielóide/monocítico porcino descrito (Álvarez *et al.*, 2007). Su expresión ocurre desde las formas precursoras celulares y se mantiene hasta las formas más diferenciadas de desarrollo, aunque también se ha descrito su expresión en bajos niveles en células dendríticas plasmocitoides (Ezquerro *et al.*, 2009). Por su parte, el marcador CD14 funciona como un correceptor junto con TLR-2 de lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas (Álvarez *et al.*, 2023). El marcador CD14 es expresado en monocitos, macrófagos tisulares y, en niveles más bajos, en granulocitos. Se ha descrito una forma soluble de CD14 (sCD14)

en suero y leche porcina, similar a humanos en términos de expresión y funcionalidad (Piriou-Guzylack y Salmon, 2008).

2.3.3.1.3. Macrófagos aviares

Similar a los macrófagos mamíferos, los macrófagos aviares cumplen un rol como primera línea de defensa celular frente a patógenos ya que poseen una gran capacidad fagocítica (Dietert y Golemboski, 1998). Los macrófagos aviares, como en otros vertebrados, derivan de células progenitoras de la médula ósea y se diferencian en monocitos circulantes en sangre (Klasing, 1998). A partir de los monocitos circulantes, se diferencian en macrófagos tisulares en múltiples tejidos. Funcionalmente, los macrófagos aviares comparten mecanismos de respuesta muy similares a su contraparte en mamíferos, sin embargo, se han evidenciado diferencias en niveles dependiente del estímulo y la estirpe o línea específica (Chu y Dietert, 1988; Qureshi *et al.*, 2000; Fellah *et al.*, 2013). Los macrófagos aviares no expresan CD4, lo que representa una de las principales diferencias con macrófagos humanos. A diferencia de la amplia gama de reactivos disponibles para identificar macrófagos en otros vertebrados, existe una limitada disponibilidad de marcadores para macrófagos aviares. Esto dificulta la diferenciación entre monocitos y macrófagos. Así, el receptor de manosa MRC tipo I, identificado como KUL01 o CD206, ha sido ampliamente usado para identificar monocitos/macrófagos aviares (Mast *et al.*, 1998). El receptor KUL01 ha evidenciado participar en el proceso de fagocitosis con una activa internalización de patógenos. Otro marcador de la línea monocito/macrófago es el receptor del factor estimulante de las colonias (CSF1R), el cual está altamente conservado en mamíferos y considerado el prototipo de marcador para esta estirpe celular. Como en el caso de otros vertebrados, los macrófagos aviares, como una de las principales células presentadoras de antígenos, juegan un importante rol en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa en aves.

2.4. Caracterización molecular

El virus posee una gran capacidad de variación y la generación de nuevas formas virales debido a sus mecanismos evolutivos. Es por esta propiedad que se hace necesario

implementar mecanismos de vigilancia viral para rastrear a los virus en diferentes regiones. Además, los estudios genéticos virales permiten estudiar los cambios a nivel nucleotídico, que en ocasiones puedan asociarse a alteraciones en las características del virus como su transmisibilidad, patogenicidad e inmunogenicidad. Debido a esto, se pueden rastrear formas virales que posean la capacidad de evadir la respuesta inmunológica a las vacunas y así, adaptarlas al virus circulante. Además, permite rastrear a los virus que circulan en animales y que puedan adquirir cambios que les permitan infectar otras especies incluyendo humanos.

Inicialmente la identificación y caracterización genética se basó en la identificación del ordenamiento de nucleótidos que codifican una región específica del genoma viral. Esto se llevó a cabo mediante una tecnología de secuenciamiento denominado método Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Este secuenciamiento parcial se concentró en los genes de HA y NA con el fin de lograr la subtipificación del virus (Chauhan y Gordon, 2022). Esta metodología, aunque informativa, tiene limitaciones debido a que cambios en otras regiones del genoma no son analizados. Así se requiere de múltiples procesos para abarcar e identificar todo el genoma.

Más recientemente, el desarrollo de la metodología de secuenciamiento de siguiente generación (NGS, *Next Generation Sequencing*, denominación en inglés) ha permitido realizar la identificación de secuencias genéticas o genómicas completas, por lo que es la opción más usada actualmente. En los últimos 10 años, se ha venido realizando el análisis del genoma completo del virus de influenza A permitiendo identificar el virus en diferentes regiones del mundo, incluso pudiendo identificar múltiples variantes en una misma muestra (Metzker, 2010). Diversos secuenciadores de segunda generación como NextSeq, MiSeq, y HiSeq han sido ampliamente utilizados para identificar y caracterizar el genoma viral. Más recientemente, la metodología de secuenciamiento de tercera generación ha permitido el obtener resultados con bajo costo, y sin necesidad de amplificación del material genético de la muestra (Liu *et al.*, 2012). Así, esta plataforma se está convirtiendo en una opción viable que requiere menor equipamiento comparado con el secuenciamiento de segunda generación (Chauhan y Gordon, 2022).

En los últimos 20 años, los estudios se han concentrado en secuenciar el genoma completo del VIA debido a la disponibilidad de nuevas técnicas, logrando de esta manera obtener información completa para desarrollar los estudios evolutivos del VIA. Es así que se logró identificar que los subtipos virales de importancia abarcaron procesos de recombinación más allá de los segmentos HA y NA que confirieron diferentes características a lo largo del tiempo como en el caso de los virus aviares euroasiáticos, con linajes evidenciando procesos de reordenamiento múltiple (Chauhan y Gordon, 2022). Así mismo, variaciones en otras proteínas como PB1, PB2, PA y NP pueden incrementar la patogenicidad de una cepa y determinar la adaptación a otras especies (Neumann y Kawaoka, 2019; Nuñez y Ross, 2019).

2.5. Desarrollo de metodología de prevención

El VIA es un virus de ARN que sufre de constantes cambios antigénicos, por lo que las vacunas actuales deben reformularse y administrarse anualmente para mantener su eficacia. Además, no todas las cepas vacunales disponibles corresponden a las cepas patogénicas circulantes, por lo que suele conllevar a resultados de baja o impredecible efectividad (Kirkpatrick *et al.*, 2018). Así mismo, el uso de vacunas en un protocolo establecido no protegerá contra subtipos nuevos emergentes pandémicos o zoonóticos.

Los anticuerpos que reconocen la HA viral son los únicos capaces de bloquear la unión del virus a la célula y, de esta manera, prevenir el ingreso de las partículas virales al citoplasma. Teniendo en cuenta que los principales anticuerpos están dirigidos hacia los sitios antigénicos presentes en la región de la cabeza de HA y que esta corresponde a una región altamente variable, los anticuerpos neutralizantes no presentan reacción cruzada con diferentes subtipos virales (Cho y Wrammert, 2016; Mathew y Angeletti, 2020). El uso de vacunas que inducen respuesta mediada por anticuerpos constituye la primera línea de defensa contra la infección. Tanto en medicina humana como en veterinaria, se han utilizado diversas plataformas enfocadas en la prevención de la enfermedad (Sims y Swayne, 2016). Las vacunas utilizadas buscan la inducción de anticuerpos dirigidos a la HA viral, específicamente al dominio de la cabeza globular. Cabe mencionar que anticuerpos dirigidos hacia el dominio altamente conservado del tallo de HA proporcionan protección cruzada entre los diversos subtipos, aunque a un

nivel muy bajo. A su vez, los anticuerpos dirigidos a la NA pueden ofrecer cierto nivel de protección (Dugan *et al.*, 2020). Por lo tanto, la constante búsqueda y evaluación de candidatos vacunales se ha visto favorecido por el desarrollo de diversas plataformas que incluyen tecnología recombinante para la producción de, por ejemplo, vacunas vectorizadas y partículas similares a virus (VLPs, del inglés *Virus-like particle*).

2.5.1. Vacunas de Influenza aviar

La vacunación es una de las herramientas más importantes en la prevención y control de la IA, la cual ha demostrado ofrecer protección en aves de producción (Swayne *et al.*, 2014). Por este motivo, se ha realizado su implementación en los programas de prevención de la enfermedad en diversas granjas avícolas del mundo (Swayne 2012). Aunque es lógico pensar que su uso ha sido dirigido para hacer frente a la IAAP, se han desarrollado diferentes vacunas frente a las formas de baja patogenicidad con el objetivo de controlar el impacto en aves ponedoras y producción de huevo (Kapczynski y Swayne, 2009). Con respecto a las vacunas frente al virus de alta patogenicidad, existen alternativas frente a los subtipos H5 y H7, usando tecnologías vectorizadas recombinantes (Kerstetter *et al.*, 2021) e inactivadas (Suarez y Pantin-Jackwood, 2017).

Existen en su mayoría vacunas inactivadas dirigidas a virus de IABP como H4, H6 (Zhu *et al.*, 2020), H10 y forma de baja patogenicidad H7 (Swayne, 2009). En cualquier circunstancia, el desarrollo ideal debe abarcar el uso del virus o de la información genética del virus circulante, y dirigida a la hemaglutinina principalmente (Swayne, 2009). Por otro lado, las vacunas vectorizadas confieren una protección más amplia producto de la expresión de proteínas no estructurales provenientes del vector que estimulan una respuesta de tipo celular lo que las diferencia de las inactivadas. Existen también vacunas desarrolladas con subunidades antigénicas basados en la producción de la hemaglutinina del virus en sistemas de células de insecto o cultivo celular (Chua *et al.*, 2010; Putri *et al.*, 2020; Nurziah *et al.*, 2022). Teniendo en cuenta las características del VIA, es importante desarrollar candidatos vacunales con base al virus circulante en un área determinada, que sea segura y permita la diferenciación con virus de campo.

2.5.2. Vacunas de Influenza porcina

La Influenza A porcina representa una amenaza global para la industria porcina que implica grandes pérdidas económicas, y una amenaza a la salud pública. Así, se han implementado mecanismos de control en granjas porcinas dentro de las cuales la vacunación juega un rol fundamental (Reeth *et al.*, 2016). A la fecha se han desarrollado diferentes vacunas específicas para proteger frente a los tipos virales que circulan en estas poblaciones como el VIA H1N1, H1N2 y H3N2 (Crisci *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2019). Estas vacunas están diseñadas para generar una respuesta humoral y celular frente a la hemaglutinina viral, como hacia otros componentes virales.

Actualmente existen vacunas basadas en virus inactivados (Vincent *et al.*, 2010) y aunque han mostrado la capacidad de inducir protección frente a la enfermedad, esta no es completa produciendo infecciones virales causando, en muchos casos, la llamada enfermedad respiratoria agravada asociada a la vacuna (*vaccine-associated enhanced respiratory disease*, VAERD) como consecuencia de una respuesta excesiva ante la exposición a un agente heterólogo, es decir, cuando la infección no corresponde al tipo vacunal (Van Reeth y Ma, 2013). En ese sentido, actualmente se desarrollan alternativas como vacunas con virus vivo atenuado, que producen una más amplia respuesta celular, pero posee un riesgo a la reversión a la virulencia (Reeth *et al.*, 2016; Swayne y Kapczynski, 2016).

También se están desarrollando vacunas vectorizadas que están mostrando resultados promisorios usando adenovirus o alfavirus y otros virus como vectores vacunales (Tatsis *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2021). Más allá del gran avance en el desarrollo de vacunas, todavía se requiere de mayor investigación con el fin de lograr amplíen el espectro inmunológico en busca de mejorar la protección, y sobre todo que estén dirigidas hacia el virus que circula en un área determinada. Así, el desarrollo de vacunas recombinantes diseñadas utilizando la información genética del virus circulante representa una opción, como lo es para otros agentes patógenos.

2.6. Vigilancia del virus de Influenza A en el Perú

Desde hace más de 70 años se ha establecido un sistema de respuesta y vigilancia de influenza global (GISRS) con el objetivo de coadyuvar esfuerzos para el monitoreo

del virus de influenza que circula en las especies. Este sistema está compuesto por instituciones de los países miembros de la Organización Mundial de la Salud (OMS). El objetivo principal de este sistema es coleccionar muestras en los Centros de Influenza Nacionales (NICs), realizar el análisis preliminar y generar recomendaciones para la adaptación de las vacunas que se usan en la salud humana. Es así que el GISRS funciona como mecanismo global de vigilancia y respuesta frente a influenza anual, pandémica o zoonótica; una plataforma para el monitoreo de la enfermedad por Influenza; y un sistema de alerta global frente a la emergencia de nuevas formas virales.

La vigilancia epidemiológica de la enfermedad se puede dar mediante el uso de pruebas serológicas para medir exposición previa de las poblaciones al virus. Por otro lado, la evaluación del virus permite detectar, caracterizar y realizar estudios genéticos. Mientras que, en temas de salud pública, la vigilancia viral se realiza a través de análisis de muestras de hisopados nasofaríngeos; en animales, se han implementado métodos de vigilancia del virus de influenza usando muestras de hisopado en mamíferos y heces en especies aviares.

En las especies porcinas la circulación viral se ha evaluado por medio de estudios de seroprevalencia en las granjas porcinas en el Perú. En el 2010, Tinoco *et al.*, realizaron una evaluación serológica del virus de influenza pH1N1 encontrando una seroprevalencia de entre 8 y 24%, antes y después del ingreso del virus al país (Tinoco *et al.*, 2016). Más recientemente se ha realizado un estudio de seroprevalencia en Arequipa, Ica y Lima en el que se describe una seroprevalencia de 22 a 27.8% (Flores Lava *et al.*, 2023). Estos estudios determinaron que el virus de Influenza A porcina circula con diferentes frecuencias en diversas zonas productivas porcinas. En el Perú, no se considera la vacunación como estrategia de control, con el objetivo de no interferir con la vigilancia serológica que se realiza mediante la evaluación de la presencia de anticuerpos en las poblaciones porcinas.

En contraste, se han realizado estudios de seroprevalencia en aves de producción en nuestro país encontrando que hasta antes del ingreso del virus de Influenza A altamente patógeno H5N1 clado 2.3.4.4b, no se había reportado circulación del virus. Entre 1998 y 1999 se realizó un estudio de seroprevalencia en aves de producción de carne en 36 granjas de Chancay, Lima, en aves que presentaron signos respiratorios. Se

determinó la ausencia de anticuerpos contra el virus de Influenza A H9N2 (Monasi y Icochea, 1999). Más reciente, en el 2017 se realizó un estudio en 600 patos de las provincias de Huaral y Huaura, del departamento de Lima, no encontrando resultados positivos a la prueba de captura de antígeno viral (Valladares *et al.*, 2018). Así, el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos realizó un último monitoreo serológico en aves reproductoras encontrando un 0% de seroprevalencia (Callupe Leyva, 2022).

En la actualidad, luego del ingreso del virus de Influenza A H5N1 de alta patogenicidad clado 2.3.4.4b en las granjas avícolas a fines del año 2022, esta realidad ha cambiado. El ingreso del virus a la industria avícola ha ocasionado una gran mortalidad de aves y el consecuente reforzamiento de medidas de bioseguridad e implementación de protocolos de vacunación para mitigar el impacto de la enfermedad. Esto habría generado una inmunidad poblacional frente al virus circulante y, en conjunción con la optimización de medidas de bioseguridad, se ha limitado el ingreso del virus a las granjas. El Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA) autorizó el uso de vacunas comerciales incluyendo vacunas vectorizadas e inactivadas lo cual limita el monitoreo serológico para una aproximación a la exposición del virus en las granjas avícolas.

Paralelamente, la vigilancia del VIA en aves y porcinos permite realizar un acercamiento a la evolución del virus en un área geográfica determinada y así evaluar sus capacidades de adaptación a nuevos hospederos, interacción virus-célula, virulencia, patogenicidad y evasión de la respuesta inmune. En el caso de la influenza porcina, se han realizado pocos avances acerca de la caracterización del virus que circula en las poblaciones porcinas. En el año 2009, Tinoco y colaboradores realizaron una evaluación filogenética del virus circulante en poblaciones de cerdos de traspatio y encontraron que correspondían con al menos dos eventos de transmisión viral entre humano y porcino (Tinoco *et al.*, 2016). Si bien, se han realizado varios esfuerzos por parte de diferentes instituciones de Perú en establecer actividades de vigilancia activa, aún estas son consideradas insuficientes dada la gran necesidad de conocer y analizar los subtipos circulantes en nuestra región. Con el objetivo de obtener más luces sobre la dinámica evolutiva y potenciales riesgos que los virus de Influenza A puedan generar, dicha

información será de gran interés para la salud animal, así como para la salud pública nacional, regional y global.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución y periodo

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Patología Aviar y el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, sedes ubicadas en Lima, Perú, y en los laboratorios del Departamento de Biotecnología Marina del Instituto de Tecnología Marina y Ambiental de la Universidad de Maryland, ubicado en Baltimore, Maryland, EEUU.

El periodo de ejecución abarcó de marzo de 2019 a noviembre de 2022.

3.2. Material experimental

3.2.1. Animales y especímenes:

3.2.1.1. Aves

Con respecto a las especies aviarias, estas correspondieron a especies pertenecientes a los órdenes taxonómicos *Anseriformes* y *Charadriiformes* principalmente. Estas poblaciones se ubican en diversos humedales de la costa de Perú, abarcando diversas especies de aves silvestres acuáticas migratorias, así como residentes. Como espécimen inicial se utilizaron heces frescas de aves colectadas del suelo, siempre que se haya identificado la especie aviar de origen.

Por otro lado, durante los estudios de inmunogenicidad se utilizaron pollos de carne de la línea Cobb 500 de 3 semanas de edad, los cuales fueron criados desde el primer día de edad en el área experimental y expuestos al antígeno recombinante de vIA a las 3 semanas.

3.2.1.2. Porcinos

Las especies porcinas correspondieron a animales de granjas comerciales tecnificadas y granjas no tecnificadas o informales con historial positivo de presencia de virus de Influenza A, así como crianzas informales donde se reportaron cuadros respiratorios principalmente en animales jóvenes.

Como espécimen inicial se utilizaron hisopados nasofaríngeos. Estas muestras fueron procesadas e inoculadas en huevos embrionados de pollo SPF, así como en cultivos celulares para el aislamiento viral. Posteriormente se cosecharon las muestras cultivadas, para su confirmación mediante la técnica de RT-PCR tiempo real y las técnicas moleculares posteriores correspondientes a fin de obtener la secuencia genómica de las cepas.

Con respecto a los ensayos de evaluación inmunogénica de proteínas, se utilizaron lechones de la línea PIC 410 de 3 semanas de edad, los cuales fueron recibidos y estudiados en el área experimental.

3.3. Diseño experimental u observacional

El estudio se llevó a cabo mediante el desarrollo de 3 fases de actividades descritas de la siguiente manera: primera: Aislamiento cepas de Influenza A provenientes de aves y porcinos de Perú; segunda: Caracterización molecular de cepas de Influenza A de origen aviar y porcino; y tercera: Producción y evaluación de proteínas candidatas vacunales contra el Virus de Influenza A.

El Laboratorio de Patología Aviar contó con los lineamientos del convenio entre el Naval Medical Research Unit N°6 (NAMRU-6) y la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Convenio NCRADA-NAMRU-6-18-10410 (2018)) para el desarrollo de actividades de vigilancia, detección y monitoreo de VIA en aves silvestres del Perú. Así mismo, la metodología del estudio fue evaluada y aprobada por el Comité de Ética de la Facultad (Constancia de Autorización: N° 2021-33).

3.3.1. CAPÍTULO 1: Aislamiento cepas de Influenza A provenientes de aves y porcinos de Perú.

El estudio contempló el muestreo de poblaciones aviares y poblaciones porcinas en el Perú, como parte de la fase inicial de actividades.

3.3.1.1. Actividades de muestreo

3.3.1.1.1. Toma de muestras aviares

Con el fin de aislar al Virus de Influenza A aviar se tomaron muestras de heces frescas de aves silvestres acuáticas (locales y migratorias) habitantes de áreas de la costa del departamento de Lima. Las aves no fueron manipuladas, siendo las muestras colectadas del suelo, por lo que fue importante tomar en cuenta sus características. Las muestras recolectadas correspondieron a heces frescas, íntegras, que no estén cubiertas de tierra o arena, y no hayan sido bañadas con agua (salada o dulce) (figura 2).

La toma de muestra de heces se realizó mediante el uso de hisopos estériles y medio de transporte universal (UTM), medio apropiado para la conservación de virus respiratorios (Spackman *et al.*, 2016), el cual mantiene la viabilidad de los patógenos. La punta del hisopo se embebió en las heces evitando contacto con el suelo, se introdujo el hisopo dentro del tubo, y se homogenizó manualmente. Las muestras fueron conservadas en temperatura de refrigeración (4-8°C) y transportadas al Laboratorio dentro de las 8 horas posteriores a la colección.

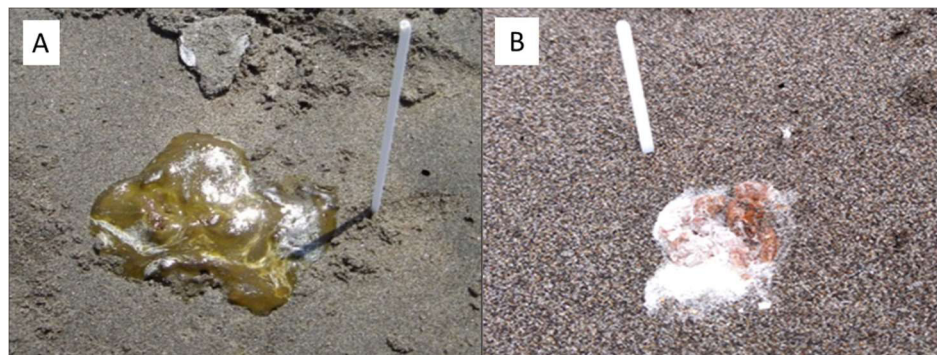


Figura 2. Imágenes de heces de aves silvestres halladas en el suelo de las zonas de muestreo. A) Heces frescas, incluidas en el estudio; B) Heces ligeramente secas, excluidas por su mala condición.

La determinación de las especies aviarias se realizó mediante observación de los grupos de aves descansando en tierra. Se observaron las características fenotípicas de las aves y se tomaron fotografías. Solo fueron recogidas las muestras de heces frescas cuya especie aviar pudo ser identificada.

Las áreas de muestreo seleccionadas correspondieron a humedales costeros del departamento de Lima, las cuales constituyen áreas naturales de descanso de aves silvestres acuáticas. Estas áreas fueron: Puerto Viejo (76.7026578°W 12.5714006°S), Pantanos de Villa (76.9949416°W 12.2065568°S), Albufera de Medio Mundo (77.6626868°W 10.9353162°S), Laguna La Encantada (77.5522327°W 11.1364147°S) y Poza de La Arenilla (77.1590185°W 12.0721548°S) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Sitios de muestreo seleccionados en el estudio. Se indica el nombre, ubicación y coordenadas de los puntos de muestreo realizados en hábitats naturales de aves silvestres costeras en el Departamento de Lima.

Lugar	Ubicación	Coordenadas*
Puerto Viejo	Provincia Cañete, Distrito de San Antonio de Mala y Chilca	76.7026578°W 12.5714006°S
Pantanos de Villa	Provincia Lima, Distrito de Chorrillos	76.9949416°W 12.2065568°S
Albufera de Medio Mundo	Provincia Huacho, Distrito Vegueta	77.6626868°W 10.9353162°S
Laguna La Encantada	Provincia Huaura, Distrito Santa María	77.6845453°W 11.1157134°S
Poza La Arenilla	Provincia Callao, Distrito de La Punta	77.1590185°W 12.0721548°S

* Coordenadas aproximadas del sitio de toma de muestra.

3.3.1.1.2. Toma de muestra porcina

En el caso porcino, las muestras correspondieron a hisopados nasofaríngeos de animales jóvenes, principalmente lechones menores de 14 semanas de edad (Gerber *et al.*, 2017), que presentaron sintomatología asociada a procesos respiratorios como tos, estornudos y secreciones nasales.

Las muestras fueron tomadas mediante el uso de hisopos estériles y colocados en medio de transporte universal (UTM), y transportados al Laboratorio en temperatura de refrigeración (4-8°C) para su procesamiento.

Las áreas de muestreo abarcaron los departamentos de Lima, Lambayeque, San Martín, Ucayali y Arequipa, donde se realizaron las tomas en granjas tecnificadas, así como en granjas no tecnificadas (informales), donde la presencia de problemas sanitarios de tipo respiratorio se considera muy frecuente. En el caso de granjas tecnificadas, la toma de muestra fue realizada por el médico veterinario y/u operarios de los planteles, que cuentan con la experticia para realizar este tipo de procedimientos.

3.3.1.2. Procesamiento de muestras

Al llegar al Laboratorio, las muestras de aves, así como los hisopados nasofaríngeos porcinos, fueron almacenadas en ultracongelación (-80°C) hasta la realización del procesamiento posterior. El procesamiento consistió en la separación y colección del sobrenadante del resto de componentes presentes en la muestra (residuos orgánicos propios de las vías respiratorias, contenido fecal, excretas y contaminación ambiental).

Para este propósito, las muestras contenidas en los tubos UTM fueron procesadas individualmente mediante centrifugación a 1800 x g durante 10 minutos. Se colectó el sobrenadante el cual fue filtrado (mediante filtro de jeringa de 0.22 µm) y posteriormente incubado en solución antibiótica (Penicilina G 1000 U/mL, Estreptomicina 1 mg/mL, Anfotericina B 10 µg/mL) a 4 °C por 2 horas previo a la inoculación. A partir de este paso, la mayor parte de las muestras fueron preparadas en pool, formando grupos de 4 o 5 muestras de aves del mismo origen y, generalmente, de la misma especie. Las muestras que no fueron inoculadas el mismo día del procesamiento fueron almacenadas en congelación (-80 °C) hasta su uso posterior.

3.3.1.3. Aislamiento viral

El procedimiento de aislamiento viral se llevó a cabo mediante el uso de huevos embrionados libres de patógenos específicos (*Specific pathogen free* – SPF, siglas en inglés), así como cultivos celulares.

3.3.1.3.1. Aislamiento viral mediante propagación en huevos embrionados de pollo.

En el caso de muestras aviares, se procedió a realizar la técnica de aislamiento viral mediante el uso de huevos embrionados SPF de 9-10 días de edad acorde al método clásico (Swayne, 1998), utilizando material estéril y trabajando en una cabina de Bioseguridad tipo II. Para ello, con cada muestra procesada (individual o preparadas en pool) se procedió a la inoculación de 0.2 mL en la cavidad alantoidea de 5 huevos (5 repeticiones técnicas por muestra).

Posterior a la inoculación, los embriones fueron incubados a 37 °C por 120 horas. Los huevos se observaron diariamente mediante ovoscopio y se registró la mortalidad. Posterior al tiempo de incubación, los embriones fueron llevados a refrigeración por 24 horas. Completado este periodo, se realizó la cosecha de fluido alantoideo. En el caso de los huevos SPF que murieron antes de las 120 horas, estos fueron cosechados al día siguiente del registro de mortalidad. La muerte embrionaria por VIA es un hallazgo común observado a partir de las 48 horas, por lo que cualquier hallazgo de estas condiciones constituyen sospecha del aislamiento viral. Se asocia 100% de mortalidad en el caso de virus IAAP, mientras que en caso de virus IABP puede observarse menor mortalidad (Spackman, 2020). La cosecha se llevó a cabo tomando un volumen de 2 mL de fluido alantoideo y conservado en criotubos a -80°C. A partir de cada colecta se realizaría el siguiente pasaje.

Las colecciones de fluido alantoideo fueron preliminarmente evaluadas mediante la técnica de hemaglutinación para observar su capacidad hemaglutinante en el caso de ser muestras positivas al VIA. Para ello, se tomaron 45 µL de fluido alantoideo de cada huevo embrionado y se enfrentó con 45 µL de solución de glóbulos rojos de pollo al 0.7% (preparada 24 a 72 horas previo a la aplicación de la técnica) (Spackman, 2020), se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos, y finalmente se observó la presencia de hemaglutinación (formación

aglomeración de eritrocitos) lo cual es evidencia de la presencia de agentes con capacidad hemaglutinante. Por lo tanto, una muestra positiva en esta prueba fue considerada como sospechosa a la presencia de VIA y se requirió de su confirmación posterior. En el caso de muestras negativas, para corroborar ese estatus, se realizaron hasta 3 pasajes observando ausencia de capacidad hemaglutinante, negativa a la prueba de antígeno o negativo a la prueba molecular.

3.3.1.3.2. Aislamiento viral mediante cultivo celular

En el caso de las muestras porcinas, el aislamiento viral se llevó a cabo mediante la inoculación de las muestras en células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells), acorde al protocolo descrito por la Organización Mundial de Salud Animal (WOAH, 2018).

Se prepararon placas de cultivo de 24 pozos donde se sembraron células MDCK, en 2 mL de medio de cultivo MEM (Minimun Essential Medium) de crecimiento. La placa se incubó a 37 °C en ambiente de CO₂ al 5% por 24 horas para obtener el crecimiento de la monocapa hasta una expansión del 80%. Previo a la inoculación, se retiró el medio MEM de los pozos y se lavaron con PBS estéril. Se realizó la inoculación de 200 µL de muestra procesada y una adsorción por 1 hora, para luego adicionar 1 mL de medio MEM suplementado con 10 µg/ml de Tripsina TPCK (Sigma, T1426). Las placas se incubaron a 37°C en ambiente de CO₂ al 5% por 120 horas. Diariamente fueron observadas a microscopio invertido para la identificación de efecto citopático (redondeamiento de células, pycnosis y desprendimiento de la monocapa), lo cual determinó sospecha de aislamiento viral. Posteriormente se realizó la cosecha de los cultivos tomando 1 mL de cada pozo y conservándose a -80 °C. Los pasajes sucesivos se realizaron a partir de cada cosecha. Por otro lado, para considerar una muestra como negativa, esta debió evidenciar ausencia de efecto citopático en 5 pasajes sucesivos.

3.3.1.4. Confirmación de detección viral

Ante la presencia de muestras sospechosas, es decir, fluido alantoideo que evidencie positividad en el ensayo de hemaglutinación y cultivos celulares con presencia de efecto citopático, se procedió a la confirmación mediante inmunocromatografía y/o pruebas moleculares para la detección del VIA.

3.3.1.4.1. Ensayo inmunocromatográfico

Como prueba de confirmación rápida inicialmente se utilizó el test rápido QuickVue Influenza A+B Test (Quidel), el cual es un ensayo de detección antigénica cualitativa diferencial de Influenza tipo A y B. Este método fue utilizado principalmente en muestras de fluido alantoideo en la fase inicial de los muestreos.

Para esta evaluación se tomaron 50 µL de muestra en un tubo de ensayo. Se agregó en contenido de una ampolla de buffer de reacción, se homogenizó e incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Posteriormente se introdujo el extremo de absorción de la tira reactiva en el tubo y se incubó por 10 minutos más para realizarse finalmente la lectura. La aparición de una banda color rojo superior a la banda control indica positividad a la presencia de antígeno del VIA.

3.3.1.4.2. Pruebas moleculares

Para la confirmación por la técnica molecular, se utilizaron protocolos de RT-PCR, convencional y en tiempo real. Para ello, se realizó la extracción y purificación de ARN total a partir de 140 µL de fluido alantoideo o cultivo celular cosechados, mediante el uso del kit comercial QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, EE.UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN fue extraído mediante el uso de membranas de sílica en un proceso de purificación por centrifugación. Finalmente, el ARN fue eluido en 40 µL de agua libre de nucleasas. El ARN extraído fue evaluado cualitativa y cuantitativamente por espectrofotometría (Nanodrop One, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.).

La confirmación se llevó a cabo mediante protocolos de RT-PCR convencional en primera instancia (debido a la disponibilidad de este recurso durante la primera fase de los muestreos). Se utilizó el kit comercial GoScript™ Reverse Transcription System kit (Promega, EE.UU.) para la síntesis de ADN complementario (ADNc) por transcripción reversa, siguiendo las instrucciones del fabricante. En este procedimiento se utilizó un cebador universal descrito por Hoffman *et al.*, (2001), Uni-12 5'-AGCAAAAGCAGG-3'. Este cebador es afín a los últimos 12 nucleótidos en el extremo 5' de los diferentes segmentos genómicos,

por lo que permite la amplificación de todas las secuencias genómicas del virus de Influenza A (Hoffmann *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2010). La prueba de PCR convencional se llevó a cabo utilizando el kit comercial GoTaq® G2 Green Master Mix (Promega, EE.UU.) y los cebadores específicos descritos por Wright *et al.*, (1995) Anp-1 (5'- ATCACTCACTGAGTGACATC-3') y Anp-2 (5'- CCTCCAGTTTTCTTAGGATC-3'), los cuales generan un amplicón de 306 pares de bases (pb) correspondiente al gen NP viral. El protocolo utilizado correspondió a 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (denaturación), 58° por 30 segundos (hibridación) y 72°C por 60 segundos (extensión); y 72°C por 5 minutos (extensión final). Posteriormente, los productos fueron revelados por electroforesis en gel de agarosa 1.5% y tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/mL), y visualizados en transiluminador ultravioleta (UV) para la identificación de las bandas específicas.

Por otro lado, avanzado el desarrollo del proyecto se logró contar con la prueba de PCR en tiempo real de un paso, donde se utilizaron los kits comerciales RealPCR Influenza A RNA Mix (IDEXX, EE.UU.) y VetMAX™-Gold SIV Detection Kit (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) para la detección de virus de Influenza A aviar y porcino, respectivamente, siguiendo las indicaciones de los respectivos fabricantes. El cambio de la utilización de la técnica convencional por la de tiempo real permitió agilizar las pruebas de confirmación.

Finalmente, las muestras confirmadas fueron seleccionadas para su posterior secuenciamiento.

3.3.2. CAPÍTULO 2: Caracterización molecular de cepas de Influenza A

3.3.2.1. Secuenciamiento de genoma completo

Este procedimiento se llevó a cabo mediante metodología de Secuenciamiento de siguiente generación (del inglés *Next Generation Sequencing*), a fin de caracterizar el genoma viral completo y determinar su relación filogenética con otros aislados por cada segmento genómico. Así mismo, al análisis de las secuencias de Hemaglutinina y Neuraminidasa permitió la subtipificación de los virus aislados.

A partir de las muestras confirmadas se procedió a realizar una nueva extracción de ARN y preparación de ADNc acorde a la metodología para la fabricación de librerías. Con este propósito se obtuvo ADNc de la primera hebra utilizando el kit comercial SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, EE.UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando el cebador FR20RV (5'-GCCGGAGCTCTGCAGATATC-3') aplicable para la preparación de las librerías del virus de Influenza (Zhang *et al.*, 2020). Para este propósito, se preparó un volumen de reacción de 20 µL utilizando 1-4 µg de RNA, 0.5 µM de cebador FR20RV, 500 µM de mix de dNTPs, 2 µL de Buffer RT 10x, 5 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 40 U de RNase OUT y 2200 U de enzima RT SuperScript III. Se incubó a 50 °C por 50 minutos, 25 °C por 10 minutos, 50 °C por 50 minutos y se mantuvo a 4°C. Finalmente se adicionaron 2 U de enzima RNasa y se incubó a 37° por 20 minutos. El producto obtenido se utilizó para la preparación de librerías utilizando el método Nextera XT (Illumina Inc., EE.UU.) y se secuenciaron mediante plataforma MiSeq usando lectura de 150 bases pareadas (Cambridge Technologies, MN, EE.UU.).

Los datos crudos obtenidos fueron editados utilizando el software Trimmomatic, muy utilizado para procesamiento de datos de Illumina NGS para la remoción de adaptadores (Bolger *et al.*, 2014), mientras que la evaluación del control de calidad se basó en la escala de calidad Phred usando el programa FastQC (Ewing y Green, 1998). Las lecturas que presentaron una puntuación Phred alta se enviaron para el ensamblaje del genoma *de novo* (DISCOVAR)

(Love *et al.*, 2016). Los segmentos que no se ensamblaron correctamente se enviaron a una nueva ronda utilizando PRICE (Ruby *et al.*, 2013).

Algunos extremos de los segmentos genómicos no fueron completamente secuenciados por NGS por lo que se diseñaron cebadores específicos para amplificar las secuencias no codificantes de estos segmentos. Los amplicones resultantes fueron purificados para posteriormente ser secuenciados por el método de Sanger. Sin embargo, en algunos casos se optó por clonar el ADN mediante el plásmido vector pGEM-T, y posterior a su amplificación se realizó el secuenciamiento clásico del plásmido conteniendo la secuencia de interés.

Finalmente, con las secuencias nucleotídicas completas se procedió a la denominación individual y anotación mediante la herramienta “Influenza Virus Resource” del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, siglas en inglés).

3.3.2.2. Subtipificación viral y análisis filogenético

Para el desarrollo de los análisis subsecuentes, se incluyeron secuencias de los diferentes subtipos reportadas en el continente americano en el periodo de 2000 a 2021, depositadas en el NCBI, en la base de datos de Genoma de Virus de Influenza (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi?go=genomeset>), así como en la base de datos de GISAID (<https://gisaid.org/influenza-subtypes-dashboard/>). Para dicha selección fueron excluidas las secuencias parciales y aquellas que presentaron nucleótidos degenerados. Las secuencias obtenidas en el presente estudio en conjunto con las secuencias seleccionadas en el NCBI fueron alineadas mediante el programa MAFFT, disponible online (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Posteriormente, los alineamientos fueron editados manualmente utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2 (Kim *et al.*, 2018).

Los análisis filogenéticos de las secuencias genómicas se llevaron a cabo mediante el software MEGA 11, utilizando método de Máxima Verosimilitud (Maximum-likelihood) y bootstrap de 1000 réplicas, bajo distribución Gamma en el modelo General Tiempo Reversible (GTR, siglas en inglés), y parámetros de

proporción de sitios invariable. La subtipificación de los virus aislados se llevó a cabo mediante el análisis de secuencias de los genes de Hemaglutinina y Neuraminidasa mediante el uso del software MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021).

El estudio filogenético de las demás secuencias genómicas se llevó a cabo de forma similar al análisis comparativo de secuencia HA y NA de los aislados en el estudio, y utilizando todas las secuencias de origen americano como cepas referenciales disponibles en GenBank. De esta manera se determinó la variabilidad genética y relación de origen o divergencia de los aislados obtenidos en el estudio. A su vez, se identificaron y describieron los cambios encontrados a nivel nucleotídico.

Adicionalmente, se analizó la zona de clivaje de la hemaglutinina a fin de determinar la patogenicidad viral de cada aislado en función a la presencia de aminoácidos básicos en dicha región.

3.3.2.3. Análisis de la información aminoacídica

Se llevó a cabo el análisis de secuencias aminoacídicas con el objetivo de identificar si existen cambios importantes a nivel de las proteínas Hemaglutinina y Neuraminidasa, que puedan estar asociadas a un potencial incremento en la patogenicidad viral. Es así que, se realizó el análisis de secuencias utilizando las cepas referenciales para la identificación de sustituciones aminoacídicas e identificar parientes genéticos cercanos para cada segmento viral.

Los análisis genéticos permitieron evaluar la variabilidad de los aislados detectadas en territorio peruano, identificando mutaciones silentes/no silentes, traducidas en sustituciones aminoacídicas que pudieran considerarse específicas de la región.

3.3.2.4. Selección de secuencias HA

A partir del análisis de las características determinadas para cada aislado, se realizó la selección de una secuencia de la Hemaglutinina del virus de Influenza aviar y porcino a fin de ser utilizados en las evaluaciones posteriores, como

potenciales candidatas vacunales para su aplicación en aves domésticas y porcinos, respectivamente.

Las características de selección se asociaron principalmente al subtipo viral, debido a que algunos son considerados de potencial riesgo para la salud pública y animal y toman prioridad en las investigaciones; y a la identificación de mayores cambios genéticos, en vista que las variaciones a nivel de la proteína HA viral pueden implicar el incremento de la capacidad patogénica de un virus (Ryu 2017; Beau Reneer y Ross, 2019; Lin *et al.*, 2020).

3.3.3. CAPÍTULO 3: Producción de proteínas candidatas vacunales

La producción de proteínas se llevó a cabo mediante el uso del sistema de expresión basado en Baculovirus y células de insecto (Ge *et al.*, 2016).

3.3.3.1. Producción de proteínas recombinantes

3.3.3.1.1. Preparación de secuencias

A partir de los aislados se seleccionó un subtipo de Hemaglutinina que, según los hallazgos tras su caracterización, evidencie presencia de cambios o una mayor variación genética que pueda asociarse a su adaptación a las condiciones de la región, los cuales, indirectamente puedan implicar desde sutiles cambios en su capacidad patogénica hasta la emergencia de nuevos subtipos de impacto en la salud animal, así como para la salud pública, propios de este territorio. Esta selección se realizó con el objetivo de evaluar una proteína Hemaglutinina recombinante para identificar características inmunogénicas de interés en la búsqueda de candidatos vacunales contra el Virus de Influenza A circulante en territorio peruano.

Para este propósito, las secuencias de Hemaglutinina viral seleccionadas fueron diseñadas a partir de la secuencia codificante, obviando la porción que corresponde al dominio transmembrana y adicionando una secuencia de histidina (6x) (extremo 3'). En los extremos fueron adicionadas las secuencias de restricción: BamHI en el extremo 5' y NheI en el extremo 3'. Se estableció una secuencia HA de Influenza A de origen Aviar (HA-AIV) y una secuencia de origen porcino (HA-SIV). Ambas secuencias de interés diseñadas fueron solicitadas a New England Biolab Inc. (Reino Unido), siendo clonadas y proporcionadas en el plásmido vector de clonación pUC57-amp. Posteriormente, fueron resuspendidas a una concentración de trabajo de 250 ng/μL.

3.3.3.1.2. Digestión enzimática de secuencias clonadas

Las secuencias diseñadas de HA fueron recuperadas a partir del vector de clonación mediante la digestión por enzimas de restricción BamHI y NheI, logrando el corte en los extremos flanqueados por los sitios de restricción presentes. Los nuevos extremos fueron compatibles con el vector de transferencia

pAcGP67B a utilizarse. Se tomó 1 μL de los plásmidos, siendo preparados en 1 μL de 10x Cut Smart buffer (New England Biolabs, B6004S), 5 UI de enzima BamHI (New England Biolabs, R0136S), 5 UI de enzima NheI-HF (New England Biolabs, R3131S) y 8 μL de agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó a 37 °C por 45 minutos (en baño maría).

Posteriormente, los productos de la digestión fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa 0.8% utilizando 10 μL de volumen y 2 μL de Buffer de carga 6x (New England Biolabs, B7024S). Se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Marker (Thermo Fisher Scientific). La electroforesis se llevó a cabo a 130 V durante 60 minutos aproximadamente. Como resultado se esperó observar la presencia de 2 bandas, una correspondiente al vector de clonación pUC57-amp de aproximadamente 2.7 Kb y, la segunda, a la secuencia del inserto. Las secuencias clonadas de HA fueron recuperadas por escisión de la banda correspondiente, siendo posteriormente purificadas mediante el uso del kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante y cuantificadas mediante espectrofotometría (Nanodrop One, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.).

3.3.3.1.3. Ligación de secuencias HA en el vector de transferencia

Las secuencias de HA purificadas fueron procesadas a fin de ser ligadas al vector de transferencia pAcGP67B (BD Biosciences), el cual es ampliamente utilizado para trabajar bajo el sistema Baculovirus/células de insecto. Para ello, se prepararon 3 μL del inserto con 2 μL del plásmido vector, 2 μL de buffer 10x T4 buffer Ligase (B0202S), 1 μL de enzima T4 ligasa (New England Biolabs, M0202S) (400 UI) y 1 μL de agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó a 4 °C hasta el día siguiente. Se esperó como resultado la construcción de un vector plasmídico recombinante que contiene la secuencia diseñada de HA insertada en la región correspondiente al sitio de clonación múltiple (MCS).

3.3.3.1.4. Transformación de bacterias *E. coli* competentes

En este paso, se utilizaron células de *E. coli* competentes JM109 (L2001, Promega). Para este proceso, se utilizaron 5 μL del producto de ligación y 50 μL de la solución de células competentes (aproximadamente 3×10^5 UFC).

Inicialmente la mezcla se mantuvo en hielo por 30 minutos, luego fue sometida a choque de calor colocándolas a 42 °C en baño maría por 60 segundos e inmediatamente trasladadas a hielo por 2 minutos. Se adicionó 1 mL de caldo lisogénico (LB) y se incubó a 37 °C por 60 minutos en agitación (250 rpm).

Posteriormente, se realizó el sembrado por extensión en placas de agar LB conteniendo ampicilina al 1 %. Se transfirieron 200 µL de la solución bacteriana a una placa LB (1X). Con el volumen restante (aprox. 800 µL) se realizó un incremento de la concentración a 10X del volumen y se sembró en una segunda placa. Se incubaron ambas placas a 37 °C por 20 horas. Las colonias de células transformadas crecieron en colonias de bordes bien definidos, de color blanco, alto relieve y de 2 mm de diámetro aproximadamente. Estos criterios fueron utilizados posterior a la incubación para seleccionar las colonias que han logrado la transformación, es decir, han incluido al plásmido en su citoplasma.

Cada colonia seleccionada fue evaluada individualmente, realizándose un picado y sembrado en 2 mL de caldo LB con ampicilina 1% e incubado a 37 °C en agitación (250 rpm) por 20 horas. Posteriormente, se colectó el volumen de cada muestra, se centrifugó a 8000 rpm por 2 minutos, eliminando el sobrenadante y utilizando el pellet para la extracción de ADN plasmídico mediante el kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, EE.UU.), siguiendo el protocolo del fabricante y realizando una elución final con 50 µL de agua libre de nucleasas.

Para verificar el proceso de clonación, una alícuota de 1 µL de cada purificado se sometió a digestión con enzimas de restricción BamHI y NheI, acorde al protocolo descrito previamente y los productos fueron visualizados en gel de agarosa 0.8%. En el caso de las colonias que correspondieron a células transformadas, se esperó que la electroforesis revele la presencia de 2 bandas, la primera correspondiente a la secuencia del vector de transferencia (9.7 Kb aprox.), y la segunda, correspondiente a la secuencia insertada (vIA-HA y vIP-HA de longitud determinada). Se seleccionaron los plásmidos purificados que presentaron estas características. Finalmente, la concentración fue evaluada mediante espectrofotometría (Nanodrop One, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.).

3.3.3.1.5. Propagación de células de insecto *Sf9*.

Para el estudio se requirió del uso de células de insecto *Spodoptera frugiperda*, las cuales fueron cultivadas de forma adherente en medio Sf-900™ II SFM medium (Gibco, EE.UU.) suplementado con gentamicina (50 µg/mL). Las células almacenadas en nitrógeno líquido fueron retiradas y colocadas inmediatamente a 37 °C en baño maría por 1 minuto. Posteriormente fue temperada a 28 °C en baño maría. Se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, eliminando el sobrenadante. Se adicionaron 2 mL de medio suplementado al sedimento celular, se homogenizó suavemente y se trasladó el contenido a un frasco T25 (25 cm²). Se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos y se procedió a observar al microscopio óptico corroborando la morfología de las células y que estas se hayan adherido a la superficie de cultivo del frasco. Se completó el volumen de medio a 5 mL y se incubó a 28 °C por 36 horas en presencia de oxígeno. Se realizó la observación de los frascos 2 veces al día a medida que las células se propagaron, realizando cambio del medio a fin de refrescar la fuente de nutrición y eliminar las células muertas.

Cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia, se procedió a realizar la recuperación de las mismas, para ello se retiró el medio por decantación y se hizo un pipeteo con el volumen remanente para desprender las células adheridas. Se llevó a cabo la cuantificación de células en el volumen recuperado en cámara de Neubauer, utilizando tinción de azul de tripán 0.4% (10 µL V/V), a fin de realizar el conteo de células viables. Los siguientes pasajes se realizaron sembrando en frascos T25 o T75 (75 cm²), a razón de $2-4 \times 10^4$ células/cm², equivalente a 4×10^6 células en frascos T25 con 5 mL de medio, o 12×10^6 células en frasco T75 adicionando 15 mL de medio de cultivo.

3.3.3.1.6. Transfección de Baculovirus recombinante en células de insecto Sf9

El procedimiento se llevó a cabo utilizando cada muestra de plásmido clonado y seleccionado, los cuales fueron incubados en el sistema comercial ProFold™-ER1 (AB Vector, EE.UU.). Se preparó una mezcla tomando 2 µg de los plásmidos en solución, 0.5 µg del vector Baculovirus (Baculovirus genomic vector: ProFold™-ER1 (AB Vector)), en 250 µL de medio Sf-900™ II SFM sin

antibiótico; se homogenizó suavemente y se agregaron 8 μ L de reacción comercial de Mirus Bio™ TransIT™-Insect Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) acorde al protocolo del fabricante y se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla fue transferida a las células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf9) preparadas en placas de 6 pozos, con una confluencia de 60-70%. Como controles negativos, se mantuvieron células sin infectar. Las placas se agitaron suavemente para homogenizar el volumen, y se incubaron en anaerobiosis a 28°C por 55 horas realizando la observación 6 veces al día. Se esperó que las células de insecto muestren signos de infección evidenciando efecto citopático como son el aumento del diámetro celular, picnosis y desprendimiento de células de la monocapa. Estos cambios permitieron interpretar que el virus presente replicó, por lo tanto, están expresando sus proteínas. Se procedió a la cosecha de los cultivos al observar estos cambios a las 55 horas postinfección aproximadamente, siendo el sobrenadante la fuente de la primera generación de Baculovirus recombinante (P0). Posteriormente, se realizaron 2 pasajes más en frascos T25 de 5 mL de volumen (P1) y T75 de 15 mL de volumen (P2), respectivamente, colectando el sobrenadante cada vez como fuente de la siguiente progenie de Baculovirus recombinante.

Para determinar el mejor tiempo de cosecha se evaluaron frascos de cultivo celular inoculados y cosechados a las 24, 48 y 72 horas de incubación con el fin de evaluar la producción de proteína recombinante mediante detección del producto por citometría de flujo utilizando el anticuerpo monoclonal Anti-His Tag AF647 (BIORAD, MCA1396A647), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello, se tomaron muestras de 4 mL, las cuales fueron centrifugadas y decantadas, para adicionar 0.4 μ L del anticuerpo y se incubaron por 1 hora a 37 °C. Las células se lavaron dos veces con PBS, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos y se decantaron. Se realizó la lectura por citometría de flujo, utilizando el equipo citómetro por imágenes FlowSight® (AMNIS®) y el software de lectura INSPIRE® y software de análisis IDEAS® (AMNIS®).

Para la producción masiva de proteína recombinante (P2), se sembraron 15 frascos de cultivo celular T75 (75cm²) con 12×10^6 células de insecto en cada uno. Se incubaron a temperatura ambiente hasta observar adherencia completa. La

infección de células de insecto se llevó a cabo inoculando Baculovirus recombinante (en volumen de 100 μ L por 5 mL de medio de cultivo), para lo cual se preparó una solución de Baculovirus recombinante 12×10^6 UFP/mL de medio de cultivo con antibiótico, adicionando un volumen de 1 mL en cada frasco T75. Se incubaron a 28 °C por 72 horas, hasta observar efecto citopático. Al determinar el tiempo adecuado de cosecha, los frascos fueron retirados de la incubadora y refrigerados por 12 horas. Posteriormente, cada frasco fue cosechado en su totalidad, recuperando un volumen aproximado de 14 mL; por lo tanto, como volumen general, se recuperó aproximadamente 210 mL.

3.3.3.1.7. Evaluación de producción de proteínas

Los cultivos colectados fueron evaluados mediante la técnica de Western Blot para evidenciar la producción de la proteína recombinante. Se centrifugaron las colectas a 2800 rpm por 5 minutos a fin de separar el sobrenadante del pellet. El primero se conservó a 4 °C para la realización de los pasajes subsecuentes, mientras que el sedimento se utilizó en cada evaluación. Este sedimento fue lavado con PBS pH 8.0 frío. Posteriormente, se adicionó PBS a razón de 200 μ L por sedimento recuperado correspondiente a cada 5 cm² de superficie cultivada. Estas suspensiones se conservaron a -20 °C.

Para la evaluación se tomaron 50 μ L del volumen de solución de cultivo y se adicionaron 50 μ L de solución buffer de SDS 2X (4% sodio dodecyl sulfato, 0.4% azul de bromofenol). La mezcla se incubó a 90°C (baño maría) por 5 minutos y se llevó a hielo inmediatamente. Se preparó el módulo de electroforesis vertical utilizando gel al 12% (12% SDS-PAGE Mini Protean TGX gel, BIORAD) y buffer de corrida 1X. Las muestras fueron colocadas en el gel en volumen de 10 μ L y se sometieron a 20 mAmp durante 30 minutos aproximadamente. Se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (BIORAD, EE.UU.). La transferencia se realizó removiendo el gel y colocándolo en buffer de transferencia. Se utilizaron membranas de PVDF previamente embebidas en metanol absoluto y equilibrada en el mismo buffer, y se procedió a ensamblar el cassette de transferencia. Este fue colocado en el módulo con buffer de transferencia y posteriormente se corrió a 370 mAmp por 30 minutos.

Después de la corrida, se recuperó la membrana y se procedió a la inmunotinción utilizando el kit comercial iBind™ Solution Kit (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante y, así mismo, se utilizó el dispositivo iBind Western Device, iBind™ (Invitrogen). Como anticuerpo primario, se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti His-Tag (6X-His Tag Antibody, Thermo Fisher Scientific R930) en dilución 1:500; mientras que como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo IgG de cabra anti ratón en la misma dilución (Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody, AP, 31321).

Para la visualización se recuperó la membrana PVDF y se procesó mediante el uso de la enzima fosfatasa alcalina en el kit comercial Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate kit (BIORAD), siguiendo las indicaciones del fabricante. La incubación se realizó a temperatura ambiente en agitador mecánico hasta que la coloración se completó (30-40 minutos). Finalmente, la membrana se enjuagó en agua desionizada, se dejó secar a temperatura ambiente y se registraron las imágenes. Como resultado se esperó obtener una banda única de tamaño específico correspondiente para la proteína Hemaglutinina recombinante (rHA) de origen aviar de 60 kDa y aquella de origen porcino de 64 kDa.

3.3.3.1.8. Purificación de proteínas recombinantes

La purificación de la proteína recombinante se llevó a cabo a partir de la muestra resuspendida del cultivo celular. Se utilizó el kit comercial HisPur™ Cobalt Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) acorde al protocolo del fabricante, el cual se basa en el uso de resinas de alta afinidad por histidina, de esta manera, se retienen únicamente los péptidos que poseen una cadena de múltiple histidina en uno de sus extremos. Para este procedimiento se utilizó buffer de equilibrio/lisis de 20mM Tris HCl pH 8.0, pH 7.5, 0.5 M NaCl y 5 mM Imidazol, al cual se adicionó un inhibidor de proteasas sin EDTA (cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Sigma-Aldrich). Las colecciones de cultivos celulares y los reactivos se mantuvieron en hielo (4 °C) durante todo el procedimiento.

Se cosecharon todos los frascos de cultivo T75. El volumen final se centrifugó a 5000xg por 30 segundos. El sobrenadante fue separado y conservado

a temperatura de refrigeración. El sedimento fue lavado 2 veces con PBS pH 8.0 frío. Se adicionó buffer de lisis con inhibidor de proteasas, se homogenizó y se procedió a la sonicación a 0.8 mdB de forma continua por 2-3 minutos. Para corroborar la lisis homogénea, se tomó una alícuota de 10 µL con azul de tripan, se montó en cámara de Neubauer y se observó al microscopio óptico.

Posteriormente, la solución sonicada fue centrifugada a 15000 x g por 5 minutos. El sobrenadante fue colectado y a partir de este, se tomaron 4 mL de volumen y se transfirieron a la columna de purificación His-Tag. Se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 5000 x g por 30 segundos. Se repitió este paso hasta completar todo el volumen de trabajo. Se realizaron 2 lavados con buffer de equilibrio. Posteriormente, se adicionó el buffer de elución (20 mM Tris HCl pH 8.0, pH 7.5, 0.5 M NaCl y 5 mM Imidazol). Se incubó por un minuto y se centrifugó a 5000 x g por 30 segundos, colectándose aproximadamente 6 mL de volumen de eluido. Finalmente se realizó un proceso de diálisis utilizando una membrana de celulosa de 10 kDa de peso molecular de corte. La desalinización se realizó sumergiendo la membrana conteniendo el eluido en 350 mL de PBS pH8.0 estéril a 4°C por 3 horas. Este paso se repitió una vez más y finalmente se colectó el contenido. La concentración de proteína del purificado se determinó mediante espectrofotometría (Nanodrop One, Thermo Fisher Scientific).

3.3.3.2. Evaluación del efecto inmunogénico de las proteínas recombinantes

Mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, se realizaron evaluaciones del efecto inmunogénico de la proteína recombinante mediante exposición directa de leucocitos obtenidos de pollos de carne de 3 semanas de edad y en lechones de la misma edad; así como a través de la inoculación de la proteína a nivel de la cavidad peritoneal en ambos modelos animales. Posteriormente, se analizaron las poblaciones celulares a las 24 horas post exposición.

3.3.3.2.1. Evaluación *in vitro* de respuesta de activación celular de leucocitos porcinos.

Con el objetivo de evaluar la efectividad inmunogénica de las proteínas se requirió de optar por un modelo que permita un fácil acceso a poblaciones de

macrófagos en forma de cultivos. En ese sentido, el porcino fue seleccionado en vista que ofrece una gran cantidad de monocitos/macrófagos peritoneales obtenidos a través de lavados locales con PBS, a diferencia de su contraparte aviar, donde la colección de leucocitos en cavidad peritoneal en animales no estimulados es muy limitada.

Es así que la evaluación *in vitro* de las proteínas se realizó mediante la exposición de leucocitos colectados de lavados locales en animales sanos. De esta manera, se considera que las principales células presentes corresponden a la línea monocito/macrófago, las cuales constituyen la mayor población de células inmunológicas presentes en la cavidad peritoneal en condiciones normales. Estas células fueron colectadas a partir de lavados peritoneales en porcinos aparentemente normales. La evaluación correspondió a analizar características de respuesta innata ante la exposición a la proteína recombinante asociado a la migración de leucocitos a la zona de exposición a antígeno e identificación de las subpoblaciones celulares. En esta fase únicamente se trabajaron muestras porcinas; en el caso de aves la colecta en animales no estimulados fue muy reducida, debido a la baja población celular presente a nivel peritoneal en condiciones de equilibrio.

a. Obtención de leucocitos locales.

Para este ensayo se utilizaron lechones de la línea PIC 410 de 3 semanas de edad aparentemente sanos, es decir, lechones sin signos de enfermedad. Los lechones fueron recibidos en las instalaciones del área experimental porcina de la FMV-UNMSM y los ensayos fueron realizados en los 3 días siguientes a su llegada para permitir su aclimatación. En este periodo los lechones recibieron alimento de inicio y agua *ad libitum*. Los ensayos posteriores fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Patología Aviar.

El sacrificio de los lechones consistió en aturdimiento por perno cautivo e inmediato desangrado mediante corte a nivel de venas yugulares. De similar forma, los porcinos fueron colocados en decúbito dorsal, se desinfectó la piel de la zona abdominal, se procedió a realizar un corte de 12-16 cm con hoja bisturí hasta alcanzar la cavidad abdominal. Se procedió a introducir 40 mL de PBS pH

7.0 – 7.2, estéril frío, se realizó un agitado del cuerpo de forma manual para un adecuado lavado de la cavidad abdominal. Se colectó el volumen introducido en un tubo de centrifuga de 50 mL y se mantuvo en hielo (4°C). Una vez colectados los lavados, se procedió al conteo del total de células utilizando una muestra de 10 µL del volumen colectado mediante cámara de Neubauer, contando en los 4 cuadrantes de los extremos, obteniendo un promedio y multiplicándolo por 10 mil. El valor resultante corresponde a la concentración de células por mililitro de volumen de muestra.

b. Exposición de leucocitos a la proteína recombinante (Ensayo *in vitro*)

A partir de las colectas, se sembraron 2×10^6 leucocitos porcinos en tubos de ensayo de 5 mL con tapa para citometría. Se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos decantando el sobrenadante. A continuación, se adicionaron 500 µL de medio RPMI 1640 Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) incompleto y se realizó la adición de la proteína recombinante HA (rHA) de origen porcino en diferentes concentraciones: 0.05 µg, 0.25 µg, 1.0 µg, 5.0 µg y 20.0 µg. Se incubaron por 1 hora a 37 °C, bajo un nivel de CO₂ del 5%. Como control negativo se adicionaron 10 µL de PBS pH 8.0; y como control positivo se adicionaron 10 µL de solución de una cepa de *E. coli* patogénico aviar (APEC) (9.0×10^8 UFC/mL) inactivada por calor a 80 °C por una hora.

Posteriormente, se realizó un lavado con 500 µL de medio para centrifugar y decantar. Se adicionaron 500 µL del medio y se procedió a la aplicación de 0.4 µL del fluoróforo CellROX, incubándose por 1 hora a 37°C y CO₂ 5%. Se realizaron dos lavados con 2mL PBS. Las células se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos y se decantaron. Se adicionaron 0.5 µL de anticuerpo anti CD172a (Monocito/Granulocito porcino) o anticuerpo anti CD14 (monocito porcino), y se incubaron a 4°C por 30 minutos en oscuridad. Se adicionaron 2.5 µL del fluoróforo NucBlue incubándose a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados con 2mL de PBS y finalmente el fijado con 100 µL de formaldehído 2% e incubación por 10 minutos a 4°C (Cuadro 2). Posteriormente se realizaron las lecturas en el citómetro de flujo por imágenes acorde a las indicaciones descritas previamente.

Cuadro 2. Anticuerpos monoclonales y marcadores utilizados en el estudio por citometría de flujo.

Anticuerpo/fluorocromo	Denominación	Objetivo	Volumen de trabajo
Mouse anti-chicken KUL01 FITC (8420-02 Southern Biotech)	Monocytes/Macrophages	Identificación de monocitos y macrófagos de pollo.	0.1 µL
Mouse anti-porcine CD172a PE (4525-09 Southern Biotech)	Monocyte/Granulocyte	Identificación de monocitos y granulocitos porcinos.	0.5 µL
Mouse anti-porcine CD14 FITC (MCA1218 BIORAD)	Monocyte	Identificación de monocitos porcinos.	0.4 µL
Fluorocromo CellRox Deep Red (C10422 Life Technologies)	CellRox Deep Red	Identificación de células productoras de ROS	0.4 µL
Fluorocromo NucBlue live reagent - Hoechst 3342 (R37605 Life Technologies)	NucBlue live reagent	Identificación nuclear en células viables	2.5 µL

3.3.3.2.2. Evaluación de respuesta post inoculación intraperitoneal de proteína recombinante en pollos y porcinos (ensayos *in vivo*)

Con el fin de evidenciar la interacción en respuesta a la presencia de las proteínas recombinantes, se diseñaron los ensayos mediante la inoculación de la proteína HA recombinante (rHA) en la cavidad peritoneal de aves y cerdos. Las poblaciones celulares expuestas al material extraño fueron colectadas y evaluadas en función a su capacidad inmunogénica. Para ello se llevó a cabo la cuantificación directa de las poblaciones leucocitarias y evaluación de las subpoblaciones y activación celular por citometría de flujo.

Es así que se plantearon, como objetivos de los ensayos *in vivo* en aves y porcinos, los siguientes:

- Evaluar la infiltración local de leucocitos, en función al incremento de la presencia celular producto de la exposición a antígenos en la cavidad peritoneal en valores absolutos y relativos.
- Identificar los diferentes grupos celulares, mediante la diferenciación de las subpoblaciones leucocitarias migrantes presentes en la cavidad peritoneal, mediante citometría de flujo.
- Evaluar la activación celular mediante la medición de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de las subpoblaciones leucocitarias (monocitos/macrófagos).

Para el desarrollo de los ensayos de respuesta ante el estímulo tras la inoculación de proteínas recombinantes, se establecieron 3 grupos de experimentación en ambos modelos animales:

- 1) Control Negativo (animales expuestos a solución PBS pH 8.0 estéril);
- 2) Grupo Tratamiento (animales expuestos a la proteína recombinante);
- 3) Grupo Control Positivo (animales expuestos a antígeno inactivado).

Las evaluaciones fueron realizadas en al menos 4 repeticiones (4 animales) con el objetivo de obtener un promedio con validez estadística. Como control positivo se utilizó una cepa bacteriana de *E. coli* patogénico aviar (APEC) inactivada por calor (heat-killed).

a. Ensayos en aves:

Los ensayos se desarrollaron utilizando pollos de carne de la línea Cobb 500, de 3 semanas de edad. Estas aves fueron criadas desde el primer día de edad en las instalaciones de la FMV-UNMSM, acorde a las condiciones estándar de crianza, con alimentación de inicio y crecimiento y consumo de agua *ad libitum*. Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Patología Aviar y se llevaron a cabo mediante la inoculación intraperitoneal de 5 µg y 20 µg de la proteína recombinante HA (rHA) de origen aviar en solución con PBS pH 8.0 estéril, logrando un volumen total de inoculación de 200 µL (Cuadro 3). La evaluación del ensayo se realizó a las 24 horas post inoculación.

Posterior al tiempo indicado, las aves fueron sacrificadas por dislocación cervical y procediendo a realizar el desangrado (por 4 minutos). Las aves fueron colocadas en decúbito dorsal, se desinfectó la piel de la zona abdominal, se procedió a realizar un corte de 2 cm con hoja bisturí y abrir las estructuras hasta alcanzar la cavidad abdominal. A este nivel se introdujeron 20mL de PBS pH 8.0 frío, se realizó un agitado del cuerpo manualmente, a fin de lograr un adecuado lavado de los órganos y pared abdominal. Se colectó el volumen introducido y se mantuvo en hielo (4 °C).

b. Ensayos en porcinos:

En el caso de los porcinos, los ensayos se realizaron utilizando lechones de 3 semanas de edad aparentemente sanos. Dichos ensayos de llevaron a cabo mediante la inoculación intraperitoneal de 50 µg de proteína rHA de origen porcino en solución con PBS pH 8.0 (volumen total de inoculación de 500 µL) (Cuadro 3). La evaluación del ensayo se realizó a las 24 horas post inoculación. Se realizaron las colectas de lavados peritoneales acorde a lo descrito previamente, realizándose la cuantificación de leucocitos totales.

Cuadro 3. Grupos experimentales y dosificación.

	Volumen de inoculación y dosis de proteína	
	Aves	Porcinos
Grupo tratamiento: Animales inoculados con proteína recombinante en PBS pH8.0	200 µL (5 y 20 µg)	1 mL (50 µg)
Grupo control positivo: Animales inoculados con cepa de <i>E. coli</i> patogénico aviar inactivada	200 µL (9.0 x 10 ⁸ UFC/mL)	1 mL (4.5 x 10 ⁸ UFC/mL)
Grupo control negativo: Aves inoculadas con PBS pH8.0	200 µL	1 mL

c. Cuantificación de células leucocitarias totales

Para la cuantificación absoluta de leucocitos presentes en cavidad abdominal (aves) y peritoneal (porcinos), se llevó a cabo el conteo de células

totales mediante el uso de la cámara de Neubauer utilizando 10 μ L del volumen recuperado.

Las evaluaciones de cuantificación relativa, así como la diferenciación de poblaciones celulares e identificación de poblaciones de monocitos/macrófagos se llevaron a cabo mediante mediciones multiparamétricas por citometría de flujo, utilizando el equipo citómetro por imágenes FlowSight® (AMNIS®) además del software de lectura INSPIRE® y software de análisis IDEAS® (AMNIS®). Es así que los grupos celulares fueron determinados mediante el análisis de complejidad (imagen darkfield) y tamaño celular (brightfield) (McKinnon, 2018; Rees *et al.*, 2022). Para ello se consideraron las características fenotípicas propias de los 3 grupos de leucocitos circulantes principales (More Bayona *et al.*, 2017), donde los heterófilos son células de gran complejidad al poseer un citoplasma con un gran número de gránulos y núcleo multilobulado, a su vez, su forma corresponde a una célula alargada, en comparación a los monocitos/macrófagos. Los monocitos/macrófagos se pueden diferenciar por ser células poseedoras de un mayor tamaño y núcleo grande. Los linfocitos son células mononucleares de menor tamaño, con un núcleo redondo que ocupa casi toda la célula, por lo que su tamaño y complejidad son menores.

Paralelamente, la identificación y evaluación de las subpoblaciones de monocitos/macrófagos, así como su respuesta, fueron determinadas mediante marcación por anticuerpos monoclonales y fluorocromos. El detalle de estos reactivos es presentado en el cuadro 2. La data colectada fue analizada y procesada para evidenciar las funciones celulares que fueron activadas tras la exposición a las proteínas recombinantes HA.

d. Evaluación de poblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo por imágenes

Para estas evaluaciones se sembraron 2×10^6 leucocitos en tubos de citometría de 5 mL a partir de cada colecta. Se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos decantando el sobrenadante. Se procedió a la aplicación de los anticuerpos monoclonales. Primero, se adicionó 0.4 μ L de CellRox, se incubaron por 1 hora a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. Se lavaron dos veces con PBS, se

centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos y se decantaron. Segundo, se adicionó 0.5 μ L de anticuerpo anti-KUL01 (Monocito/macrófago de pollo) o anticuerpo anti CD-172a (Monocito/granulocito porcino) y anticuerpo anti CD14 (Monocito porcino) según el grupo animal analizado. Las muestras celulares se incubaron a 4 °C por 30 minutos en oscuridad. Posteriormente se adicionaron 2.5 μ L del fluoróforo NucBlue y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente y se realizaron lavados con PBS. Se centrifugaron los tubos a 1500 rpm por 5 minutos y se decantaron. Finalmente, se realizó el fijado con 100 μ L de formaldehído 2% e incubado durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se realizaron las lecturas en el citómetro de flujo por imágenes.

3.3.3.2.3. Análisis de la información

Para evaluar los resultados obtenidos se realizaron comparaciones de grupos mediante Análisis de Varianza de una vía (ANOVA) y prueba de Tukey para identificar los grupos donde existen diferencias significativas, utilizando el programa estudio RStudio v2022.02.0, trabajando con un nivel de confianza del 95%. Así mismo, para la presentación de los resultados se utilizó el programa GraphPad PRISM v6.01 para el diseño de los gráficos de barras. Se consideró una diferencia estadística significativa entre grupos evaluados, con valor de $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

Los resultados del estudio se presentan a continuación, acorde a cada una de las fases del estudio.

4.1. CAPÍTULO 1: Aislamiento de cepas de Influenza A provenientes de aves y porcinos de Perú.

4.1.1. Actividades de muestreo en especies aviares silvestres

Durante el periodo correspondiente a la primera fase, se realizaron nueve (09) muestreos llevados a cabo en las cinco (05) ubicaciones en el departamento de Lima, las cuales correspondieron a hábitats de aves acuáticas silvestres en zonas de playa y humedales de la costa (Cuadro 4). Las actividades de muestreo se iniciaron en el mes de mayo hasta diciembre del año 2019, logrando como resultado la colección de un total de 421 muestras de heces frescas. Estas muestras fueron tomadas mediante hisopados y transportadas al Laboratorio en medio de transporte UTM con el fin de ser procesadas para su posterior utilización en el método de aislamiento viral.

Cuadro 4. Cronograma de los muestreos de aves silvestres acuáticas realizados en el departamento de Lima. Se muestra fecha, lugar y cantidad de muestras colectadas.

#	Fecha	Lugar	Nº de muestras
1	05/05/2019	Pantanos de Villa	57
	17/10/2019	Provincia de Lima Distrito de Chorrillos	
2	17/10/2019	Humedales de Puerto Viejo	27
		Provincia de Cañete Distrito de San Antonio	
3	23/10/2019	Albúfera de Medio Mundo	130
	31/10/2019	Provincia de Huaura	
	07/12/2019	Distrito de Végueta	
4	13/12/2019	Laguna Encantada	90
	27/12/2019	Provincia de Huaura Distrito de Santa María	
5	13/12/2019	Poza La Arenilla	115
	19/12/2019	Provincia del Callao Distrito de La Punta	

Las especies aviares incluidas en el estudio se enfocaron principalmente a especies miembros de los órdenes taxonómicos *Anseriformes* y *Charadriiformes*, sin embargo, también se incluyeron especies de diferentes órdenes propias de las áreas naturales. Las aves incluidas en el estudio correspondieron a 21 diferentes especies y se detallan en el Cuadro 5. Cabe mencionar que se incluyeron 2 muestras de Garcitas blancas que fueron enviadas al Laboratorio y fueron identidades de origen como “FMV”.

Cuadro 5. Identificación de especies aviares y número de muestras obtenidas por especie. Se observa un total de 421 aves muestreadas, distribuidas en 8 órdenes y 21 especies.

#	Orden	Nombre Común	Nombre científico	Unid
1	Charadriiformes	Gaviota de Franklin	Leucophaeus pipixcan	54
2		Playero colector	Actitis macularius	37
3		Rayador americano	Rynchops niger	34
4		Ostrero americano	Haematopus palliatus	26
5		Gaviota peruana	Larus belcheri	20
6		Gaviota capucha gris	Chroicocephalus cirrocephalus	13
7		Chorlo gritón	Charadrius vociferus	8
8		Ostrero negro	Haematopus ater	4
9		Gaviota dominicana	Larus dominicanus	2
10		Zarapito trinador	Numenius phaeopus	2
11	Anseriformes	Pato gargantilla	Anas bahamensis	20
12		Pato silvestre	Anas platyrhynchos	10
13	Pelecaniformes	Pelícano peruano	Pelecanus thagus	37
14		Garcita blanca	Egretta thula	15
15		Garza Huaco	Nycticorax nycticorax	3
16	Suliformes	Cormorán neotropical	Phalacrocorax brasilianus	91
17	Gruiformes	Gallineta común	Gallinula chloropus	38
18	Podicipediformes	Zambullidor	Podilymbus podiceps	2
19	Passeriformes	Siete colores	Tachuris rubrigastra	2
20	Cathartiformes	Gallinazo cabeza negra	Coragyps atratus	2
21		Gallinazo de cabeza roja	Cathartes aura	1
TOTAL				421

La mayor parte de las muestras tomadas de aves (54.6%) pertenecieron a los órdenes Charadriiformes y Anseriformes, abarcando el 47.5% (200 de 421) y 7.1% (30 de 421) del total de muestras, respectivamente. Las muestras restantes fueron obtenidas de otras especies acuáticas pertenecientes a órdenes como Pelecaniformes representando el 13.1% (55 aves); Suliformes, 21.6% (55 aves); Gruiformes, 9.0% (38 aves); y Podicipediformes, 0.5% (2 aves). Así mismo, se tomaron muestras de especies no acuáticas presentes en las zonas de muestreo como Passeriformes abarcando el 0.5% de las muestras (2 aves) y Cathartiformes con un 0.7% de las mismas (3 aves).

4.1.2. Actividades de muestreo en porcinos

Con respecto a las muestras porcinas, se recolectaron en total 206 muestras de hisopados nasofaríngeos en animales jóvenes, que mostraron leves a marcados signos de enfermedad respiratoria. Estos muestreos se llevaron a cabo en nueve (09) localidades correspondientes a seis (06) departamentos del país donde la crianza porcina se desarrolla ampliamente (Cuadro 6). Estas actividades se llevaron a cabo en el periodo de mayo de 2020 a setiembre de 2021.



Figura 3. Realización de hisopados nasofaríngeos en lechones provenientes de granjas no tecnificadas. Se realizó la contención de los porcinos para la toma de muestra, luego se colocaron los hisopos en tubos de colección conteniendo medio de transporte universal (UTM).

Cuadro 6. Cronograma de los muestreos en porcinos realizados en diferentes localidades del Perú. Se muestra fecha, lugar y cantidad de muestras colectadas, así como tipo de explotación.

#	Fecha	Localidad	Ubicación	N° de muestras	Tipo de explotación
1	11.11.2020	Parque Porcino de VES	Departamento de Lima Provincia Lima Distrito de Villa el Salvador	21	No tecnificada
2	28.11.2020	Centro poblado Abejaico	Departamento de Ucayali, Provincia Coronel Portillo Distrito de Campo Verde	10	No tecnificada
3	05.12.2020	Santa Rosa	Departamento de Ucayali, Provincia Coronel Portillo Distrito de Campo Verde	6	No tecnificada
4	09.06.2021	Aguaytía	Departamento de Ucayali, Provincia Padre Abad Distrito de Padre Abad	7	No tecnificada
5	28.11.2020	Parque Porcino de Ventanilla	Departamento de Lima, Provincia de Callao Distrito de Ventanilla	6	No tecnificada
6	24.09.2021	Cieneguilla	Departamento de Lima, Provincia Lima Distrito de Cieneguilla	22	Tecnificada
7	07.05.2021	Chilca	Departamento de Lima, Provincia Cañete Distrito de Chilca	11	No tecnificada
8	04.12.2020	Chilca	Departamento de Lima, Provincia Cañete Distrito de Chilca	25	Tecnificada
9	04.12.2020	Tarapoto	Departamento de San Martín, Provincia San Martín Distrito de Tarapoto	25	Tecnificada
10	15.12.2020	Arequipa	Departamento de Arequipa, Provincia Arequipa Distrito de Paucarpata	18	Tecnificada
11	16.02.2021	Yuramayo	Departamento de Arequipa, Provincia Arequipa Distrito de Vitor	35	Tecnificada
12	20.12.2020	Chiclayo	Departamento de Lambayeque, Provincia Chiclayo Distrito de Requena	18	Tecnificada
13	28.05.2021	San Antonio de Jicamarca	Departamento de Lima, Provincia Lima Distrito de San Juan de Lurigancho	7	No tecnificada

Las muestras correspondieron a granjas de 2 tipos: tecnificadas y no tecnificadas. En el caso de granjas tecnificadas, las muestras fueron tomadas por los operarios de las mismas granjas, siendo estas remitidas al Laboratorio el día de la toma de muestra. En el caso de granjas no tecnificadas, se realizó la sujeción de los animales y toma de muestra por parte nuestra (Figura 3).

Se realizaron en total 13 muestreos en porcinos, correspondiendo 6 a granjas tecnificadas, mientras que se lograron realizar 7 muestreos en granjas no tecnificadas, donde se consideró mayor riesgo de presencia de enfermedades debido a la menor implementación de medidas sanitarias. En estos predios se pudo constatar la presencia de animales con signos respiratorios, principalmente en los animales más jóvenes. Los signos que se registraron correspondieron a estornudos, tos y presencia de secreción nasal; por otro lado, entre otros signos se observó decaimiento, anorexia y diarrea.

4.1.3. Aislamiento de cepas del virus de Influenza A

Las muestras de hisopado tomadas en medio UTM fueron procesadas e inoculadas en huevos embrionados de pollo SPF con el fin de lograr el aislamiento del Virus de Influenza A.

4.1.3.1. Aislamiento viral de muestras aviares

A partir de la cosecha de fluido alantoideo tras el aislamiento viral, se lograron identificar 8 muestras que resultaron positivas en la prueba de hemaglutinación. Para una identificación rápida del VIA mediante el test de inmunocromatografía, se identificaron 5 muestras como VIA aislados en territorio peruano, los cuales fueron posteriormente confirmados mediante la prueba de RT-PCR (Figura 4). Las muestras negativas a VIA fueron evaluadas mediante prueba de RT-PCR dirigida a la identificación de Paramyxovirus aviar, obteniéndose resultado positivo.

Es así que, a partir de las 421 muestras se logró la propagación y aislamiento de 5 virus de Influenza A de origen aviar. Las muestras positivas provinieron de cuatro especies aviares hospedadoras, tres correspondientes al orden

Charadriiformes y, una correspondiente al orden Anseriformes (Cuadro 7). De estos aislados, dos fueron obtenidos de muestras tomadas en la Poza de la Arenilla, Callao; dos, de los Pantanos de Villa, Lima; y uno, de La Laguna La encantada, Huaura, Lima. Los 2 aislados correspondientes a la Poza de la Arenilla provinieron de muestras de Gaviotas de Franklin; así mismo, los dos aislados correspondientes a los Pantanos de Villa provinieron de una gaviota peruana y un zarapito trinador, respectivamente; finalmente, la cepa correspondiente a la laguna La Encantada provino de un pato silvestre.

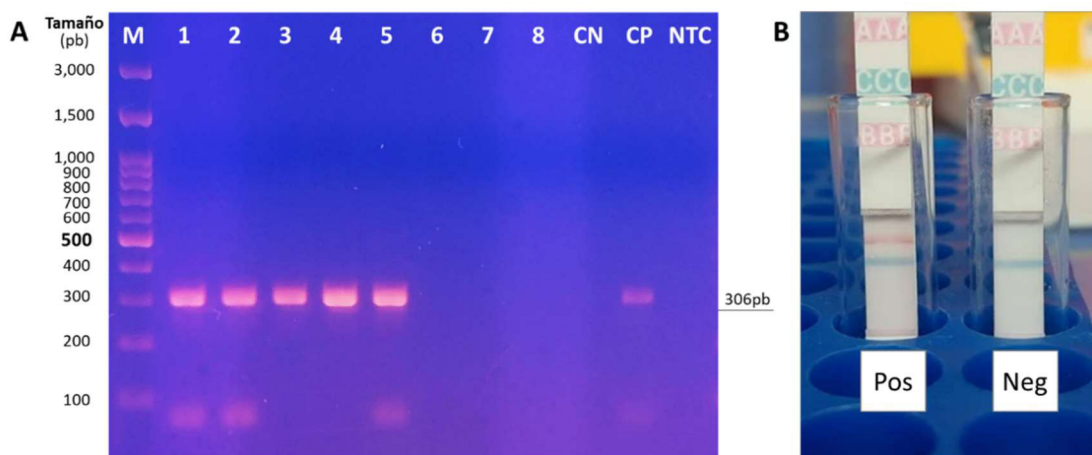


Figura 4. Confirmación de la presencia de Virus de Influenza A en las muestras de aislamiento viral. A. Prueba de RT-PCR que identifica el segmento NP de VIA (306 pb). M: Marcador de peso molecular; carriles 1-5: cepas de VIA aisladas; carriles: 6-8: muestras negativas; CN: control negativo (Virus de enfermedad de Newcastle); CP: control positivo; NTC: control sin templado. B. Prueba innumocromatográfica de identificación del VIA. Se observa el resultado de una muestra positiva (izquierda) y una muestra negativa (derecha).

Las cepas aisladas fueron identificadas como PE01, PE02, PE03, PE04 y PE05 como se muestra en el cuadro 7. Cada aislado fue seleccionado y posteriormente procesado acorde a la metodología descrita para el secuenciamiento de genoma completo.

Cuadro 7. Identificación de especies aviares portadoras del Virus de Influenza A detectadas en el presente estudio.

Nombre común	Orden	Ubicación	Identificación
Zarapito trinador	Charadriiformes	Pantanos de Villa, Provincia Lima, Distrito de Chorrillos	PE 01
Gaviota dominicana	Charadriiformes	Pantanos de Villa, Provincia Lima, Distrito de Chorrillos	PE 02
Gaviota de Franklin	Charadriiformes	Poza de la Arenilla, Provincia Callao, Distrito de La Punta	PE 03
Gaviota de Franklin	Charadriiformes	Poza de la Arenilla, Provincia Callao, Distrito de La Punta	PE 04
Pato silvestre	Anseriformes	La Encantada, Provincia Huaura, Distrito Santa María	PE 05

4.1.3.2. Aislamiento viral de muestras porcinas

En relación a las muestras porcinas, se procesaron las 206 muestras, las cuales fueron ensayadas mediante el método de aislamiento viral en cultivo celular MDCK. Inicialmente, las muestras fueron analizadas por la prueba de RT-PCR en tiempo real con el objetivo de dar prioridad a las muestras que sean positivas a la presencia viral. En este punto, se identificaron muestras positivas por la prueba evidenciando una baja carga viral, por lo que se procedió al desarrollo de la técnica de aislamiento viral.

Desafortunadamente, no se lograron resultados positivos en el aislamiento a partir de muestras porcinas. Las muestras PCR positivas no lograron ser aisladas en ninguno de los pasajes sucesivos. Sin embargo, se encontraron 4 muestras que se consideraron como sospechosas en los cultivos celulares, debido a que presentaron efecto citopático leve a moderado, sin embargo, la realización de una prueba de RT-PCR posterior determinó ausencia del virus. Cabe mencionar que, para estas muestras, se realizaron 5 pasajes por cultivo de células, obteniendo el mismo resultado negativo. Es por ello que la causa de muerte celular en las muestras sospechosas se adjudicaría a factores diferentes a la infección por VIA.

4.2. CAPÍTULO 2: Caracterización genética de cepas de AIV aisladas

El secuenciamiento del genoma completo de las 05 cepas peruanas aisladas, abarcó el procesamiento y análisis de 40 segmentos genómicos. La información de denominación y acceso a GenBank se detallan en el cuadro 8.

4.2.1. Subtipificación de cepas peruanas.

Los primeros análisis se enfocaron en las secuencias correspondientes al segmento genómico de la Hemaglutinina y Neuraminidasa viral a fin de subtipificar los aislados. Estos análisis evidenciaron que los subtipos de los aislados correspondieron a H6N8 (cepa PE01), H2N6 (cepa PE02), H6N2 (cepa PE03), H13N6 (cepa PE04) y H6N2 (cepa PE05). Estos subtipos correspondieron a Virus de Influenza de baja patogenicidad, los cuales han sido comúnmente reportados en diversas especies de aves silvestres costeras a nivel mundial. Cabe mencionar que en este estudio se realizó el primer reporte de los subtipos H2N6, H6N2 y H13N6 presentes en aves silvestres de la costa del Perú.

Cuadro 8. Secuencias genómicas de cepas del Virus de Influenza A aislados en Perú.

Aislado	Subtipo	Denominación	Segmento	Longitud (nt)	Número de acceso GenBank
PE 01	H6N8	A/Whimbrel/Peru/M5/2019	PB2	2280	OL601968
			PB1	2274	OL601969
			PA	2151	OL601970
			HA	1701	OL366799
			NP	1497	OL366800
			NA	1413	OL366801
			MP	982	OL366802
			NS	838	OL366803
PE 02	H2N6	A/Mallard/Peru/M6/2019	PB2	2280	OL355023
			PB1	2274	OL355024
			PA	2151	OL355025
			HA	1689	OL355026
			NP	1497	OL355027
			NA	1413	OL355028
			MP	982	OL355029
			NS	838	OL355030
PE 03	H6N2	A/Franklins gull/Peru/M7/2019	PB2	2236	OL355032
			PB1	2297	OL355033
			PA	2151	OL355034
			HA	1701	OL355035
			NP	1497	OL355036
			NA	1382	OL355037
			MP	979	OL355038
			NS	838	OL355039
PE 04	H13N6	A/Kelp gull/Peru/M8/2019	PB2	2280	OL355040
			PB1	2274	OL355041
			PA	2157	OL355042
			HA	1698	OL355043
			NP	1497	OL355044
			NA	1413	OL355045
			MP	982	OL355046
			NS	838	OL355047
PE 05	H6N2	A/Franklins gull/Peru/M9/2019	PB2	2280	OL602181
			PB1	2277	OL602182
			PA	2133	OL367080
			HA	1701	OL367081
			NP	1497	OL367082
			NA	1422	OL367083
			MP	982	OL367084
			NS	838	OL367085

4.2.2. Evaluación de secuencia en zona de clivaje HA / Análisis de patogenicidad

Se realizó la evaluación de la secuencia correspondiente a la zona de clivaje de la proteína de la Hemaglutinina de las cepas aisladas, identificando la presencia de aminoácidos básicos (Arg, Lys, His).

Todas las secuencias analizadas correspondientes al segmento de la HA presentaron características propias de una secuencia monobásica (Cuadro 9). Los aislados presentaron únicamente un aminoácido básico, Arginina (R). Por lo tanto, como resultado de este análisis se pudo observar que las cinco cepas peruanas aisladas en este estudio corresponden a Virus de Influenza A de baja patogenicidad (IABP).

Cuadro 9. Identificación de secuencias aminoacídicas en la zona de clivaje de la proteína Hemaglutinina de los aislados de Virus de Influenza Aviar para la determinación de su patogenicidad.

ID	Subtipo	Secuencia	Clasificación	Número de acceso
PE 01	H6N8	PQIETR*GLF	IABP	OL366799.1
PE 02	H2N6	PQIESR*GLF	IABP	OL355026.1
PE 03	H6N2	PQIETR*GLF	IABP	OL355035.1
PE 04	H13N6	PAISNR*GLF	IABP	OL355043.1
PE 05	H6N2	PQIETR*GLF	IABP	OL367081.1

Aminoácidos: P: Prolina; Q: Glutamina; I: Isoleucina; E: Ácido glutámico; T: Treonina; S: Serina; R: Arginina; G: Glicina; L: Leucina; F: Fenilalanina; A: Alanina; N: Asparagina.

4.2.3. Análisis filogenético de secuencias genómicas

4.2.3.1. Análisis de secuencias de Hemaglutinina viral

Se realizaron los análisis de la secuencia de la Hemaglutinina subtipos H2, H6 y H13 donde se incluyeron todas las secuencias reportadas en el continente americano (Figura 5, 6 y 7) y disponibles en GenBank.

En el análisis del subtipo H2, se puede observar al aislado peruano PE02 (H2N6) ubicado en un clado que comparte con cepas de origen norteamericano, específicamente aquellas reportadas en los Estados Unidos entre los años 2011 y 2015. Sin embargo, el gráfico evidencia una mayor distancia con sus parientes más cercanos dentro del mismo grupo, probablemente debido a una mayor acumulación de mutaciones puntuales que incrementan la divergencia.

Así mismo, en el análisis cepas del subtipo H6, se pudo observar a los tres aislados peruanos (PE01, PE03 y PE05) presentes en un clado correspondiente a cepas norteamericanas, compartiendo un ancestro común, subagrupándose en un subclado particular, paralelo a un subclado de cepas norteamericanas detectadas en 2015.

El aislado PE01 (H6N2) presenta mayor relación o cercanía genética de la HA con la cepa PE03 (H6N2). Los aislados PE03 y PE05, provinieron de la misma especie hospedera (gaviota de Franklin), y presentaron una distancia considerable a pesar de ser aisladas en una misma área (Poza de la Arenilla, Callao), en un mismo periodo de tiempo (una semana de diferencia).

Finalmente, analizando el subtipo H13, se puede observar la presencia del aislado peruano PE04 dentro de un clado correspondiente a cepas de origen norteamericano detectadas en 2015, una correspondiente al subtipo H13N8 (MH764042.1) con la que comparte un 99.12% de identidad nucleotídica.

El cuadro 10 se muestra, a manera de resumen, la cepa con la cual cada segmento HA genómico de cada aislado peruano comparte una mayor cercanía genética, y así grafica el origen más probable identificando el subgrupo o subclado de mayor relación.

Hemagglutinina H2

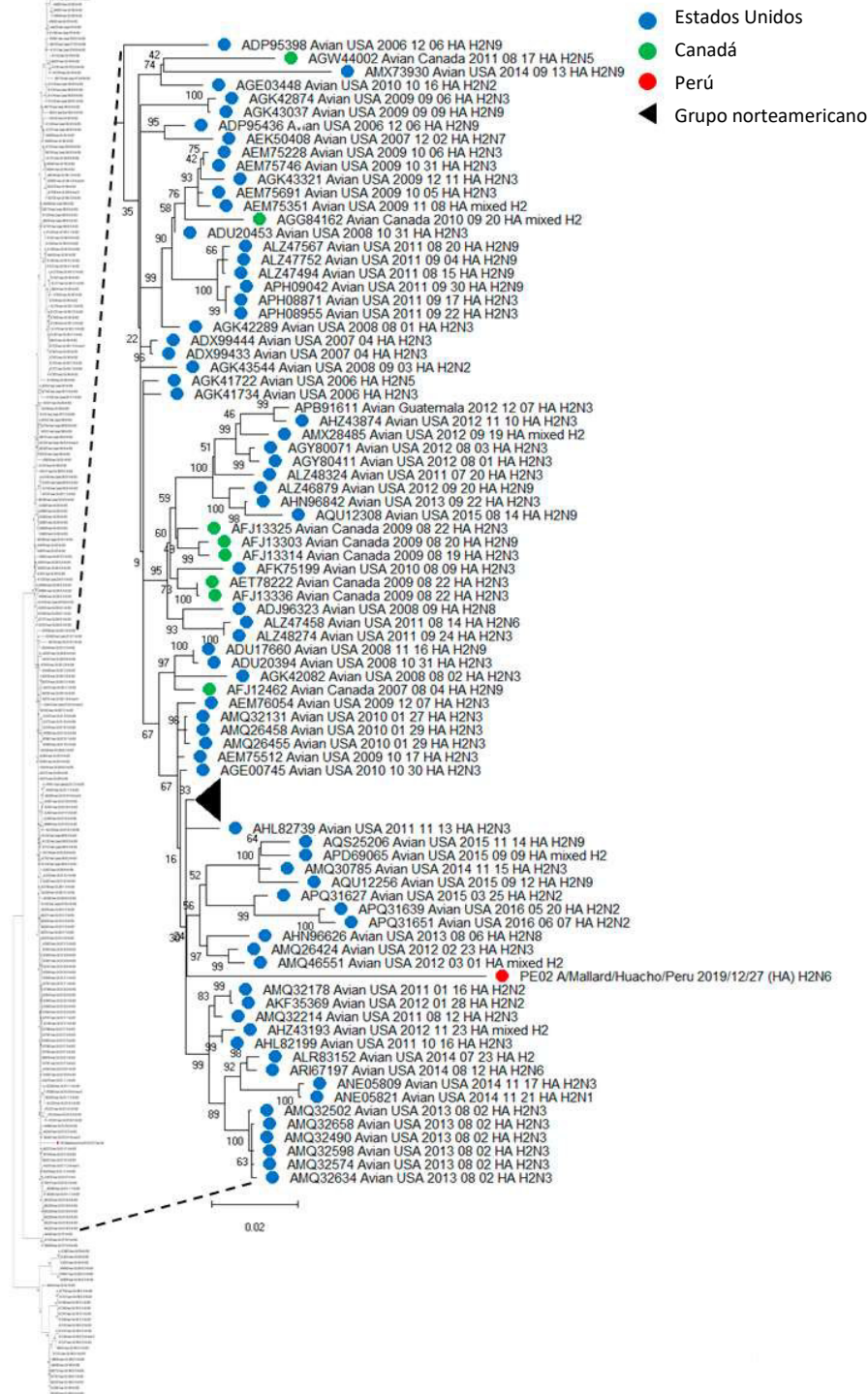


Figura 5. Árbol filogenético del segmento genómico de la Hemagglutinina H2. Se incluyeron el aislado PE02 proveniente de Pato silvestre y 256 cepas del subtipo H2 reportadas en América que presentan la secuencia HA codificante completa. Se expande un subárbol donde se observan las cepas peruanas. Se observan secuencias de Estados Unidos (azul), Canadá (verde), Perú (rojo) y un grupo colapsado de cepas norteamericanas (triángulo negro). Método de máxima verosimilitud con bootstrap de 1000 réplicas y modelo de sustitución nucleotídica GTR.

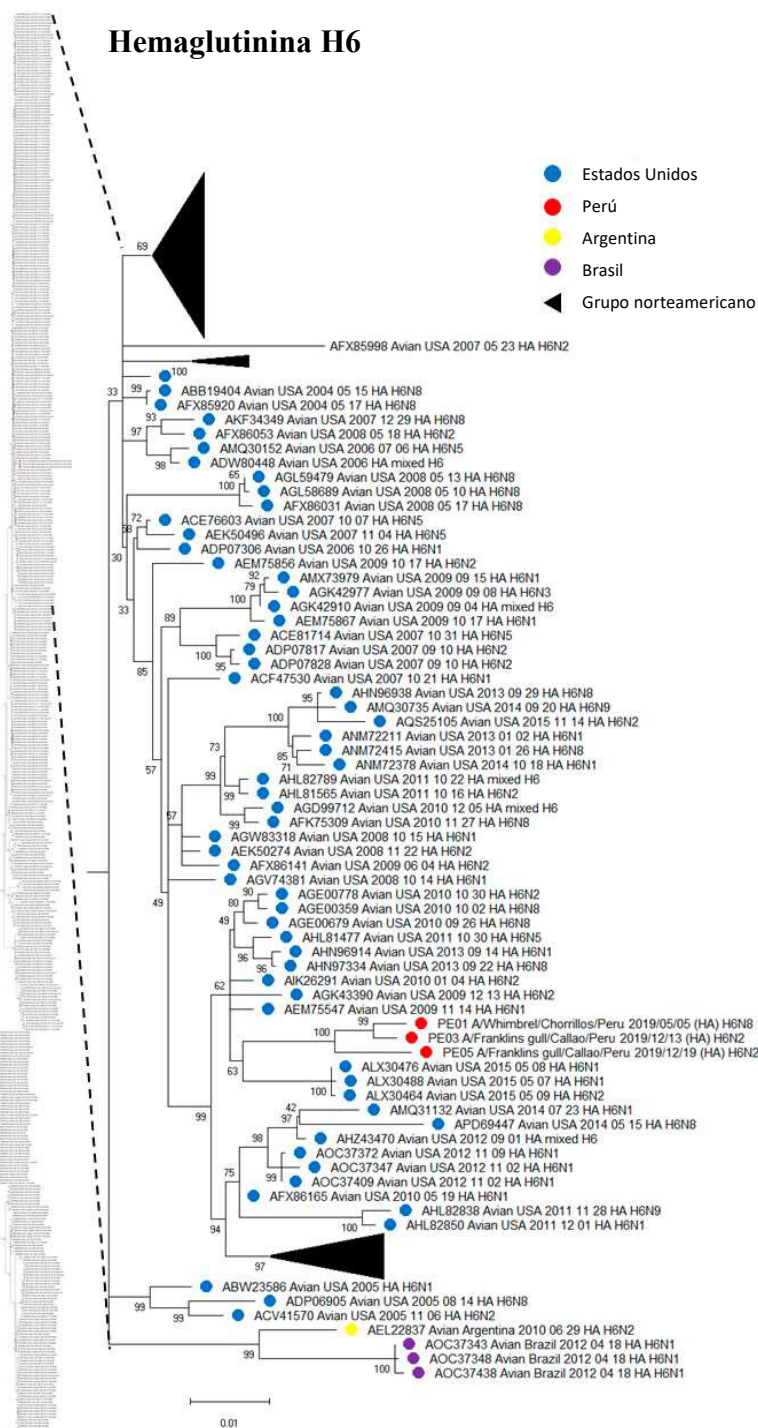


Figura 6. Árbol filogenético del segmento genómico de la Hemaglutinina H6. Se incluyeron el aislado PE01, PE03 y PE05 provenientes de la especie zarapito trinador y gaviotas de Franklin, y 477 cepas del subtipo H6 reportadas en América que presentan la secuencia HA codificante completa. Se expande un subárbol donde se observa la cepa PE02. Se observan secuencias de Estados Unidos (azul), Perú (rojo), Argentina (amarillo), Brasil (morado) y un grupo colapsado de cepas norteamericanas subtipo H6 (triángulo negro). Método de máxima verosimilitud con bootstrap de 1000 réplicas y modelo de sustitución nucleotídica GTR.

Hemaglutinina H13

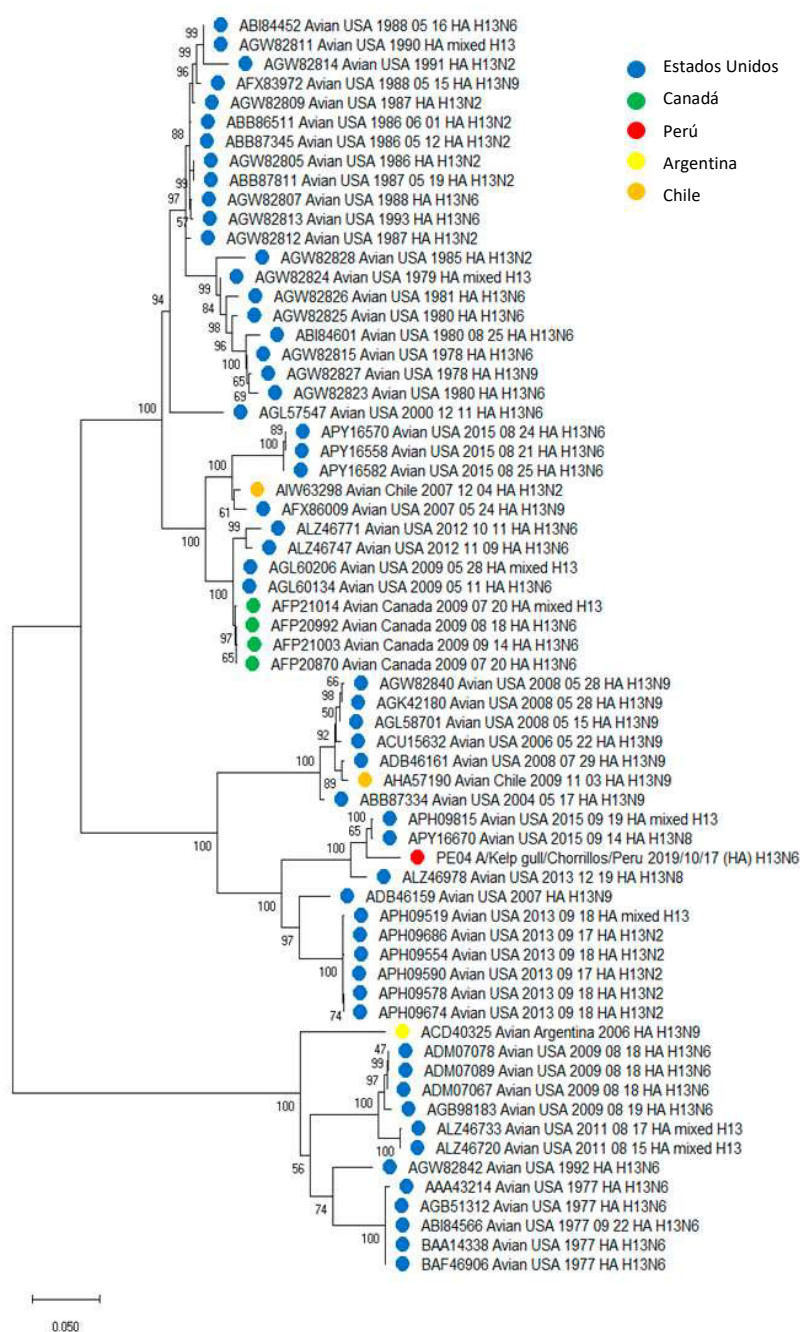


Figura 7. Árbol filogenético del segmento genómico de la Hemaglutinina H13. Se incluyeron el aislado PE04 proveniente de gaviota peruana y 64 cepas del subtipo H13 reportadas en América que presentan la secuencia HA codificante completa. Se observan secuencias de Estados Unidos (azul), Canadá (verde), Perú (rojo), Argentina (amarillo) y Chile (naranja). Método de máxima verosimilitud con bootstrap de 1000 réplicas y modelo de sustitución nucleotídica GTR.

Cuadro 10. Cepas referenciales de mayor cercanía genética en relación a cada segmento genómico correspondiente a los aislados de vIA peruanos.

Aislado (subtipo)	Segmento	N° de acceso		Cepa de referencia (origen)
		Aislado peruano	Cepa de referencia	
PE-01 (H6N8)	PB2	OL601968	MK237638	A/blue-winged teal/Illinois/17OS2553/2017 –H6N1
	PB1	OL601969	MH764210	A/ring-billed gull/Minnesota/CLMNAI1197/2017 –mixed
	PA	OL601970	OL355025 y MH764242	A/Mallard/Peru/M6/2019 –H2N6 y A/ring-billed gull/Minnesota/CLMNAI1501/2017
	HA	OL366799	MK236883	A/American green-winged teal/Missouri/17OS3048/2017 –H6N1
	NP	OL366800	MT566304	A/Mallard/Ohio/17OS1691/2017 –H3N8
	NA	OL366801	MH936480	A/blue-winged teal/Alberta/460/2017 –mixed
	MP	OL366802	MN253773	A/Mallard/Maine/AH0063771S.7.A/2015 –H11N1
	NS	OL366803	MN254207	A/Mallard/Minnesota/AH0031714S.8.A/2015 –H3N8
PE-02 (H2N6)	PB2	OL355023	CY235256	A/mallard/Idaho/UGAI16-1941/2016 –mixed
	PB1	OL355024	MG266062	A/blue-winged teal/Wyoming/AH0099021/2016 –H7N9
	PA	OL355025	OL601970 y MH764242	A/Whimbrel/Peru/M5/2019 –H6N8 y A/ring-billed gull/Minnesota/CLMNAI1501/2017 –H13N2
	HA	OL355026	KY644183	A/blackish oystercatcher/Chile/C6534/2016 –H2N2
	NP	OL355027	MT566304	A/Mallard/Ohio/17OS1691/2017 –H3N8
	NA	OL355028	MK424190	A/Meleagris gallopavo/Valparaiso/10_2_10/2017 –H7N6
	MP	OL355029	MK071455	A/yellow-billed teal/Argentina/CIP112-1227/2016 –H4N6
	NS	OL355030	MH932199	A/blue-winged Teal/Alberta/459/2017 –H3N8
PE-03 (H6N2)	PB2	OL355032	MK237300	A/bufflehead/Wisconsin/17OS4051/2017 –H1N1
	PB1	OL355033	CY206625	A/blue-winged teal/Texas/UGAI14-3363/2014 –H4N6
	PA	OL355034	MK236731	A/mallard/Ohio/17OS5632/2017 –H10N7
	HA	OL355035	MK236883	A/American green-winged teal/Missouri/17OS3048/2017 –H6N1
	NP	OL355036	MG280371	A/scoter/Maryland/16OS2529/2016 –H10N7
	NA	OL355037	MH499219	A/Franklin's gull/Chile/C10242/2016 –H6N2
	MP	OL355038	MN253732	A/Blue-winged Teal/Minnesota/AH0031755S.7.A/2015 –H3N8
	NS	OL355039	MK345974	A/ruddy turnstone/Delaware Bay/190/2018 –H2N7

PE-04 (H13N6)	PB2	OL355040	MH764127	A/ring-billed gull/Minnesota/CLMNAI0808/2017 –H13N8
	PB1	OL355041	MT624324	A/Mallard duck/Alberta/216/2019 –H6N5
	PA	OL355042	MH764181	A/ring-billed gull/Minnesota/CLMNAI0955/2017 –H13N8
	HA	OL355043	MH764042	A/ring-billed gull/Minnesota/OPMNAI0817/2017 –H13N8
	NP	OL355044	MH764179	A/ring-billed gull/Minnesota/CLMNAI0955/2017 –H13N8
	NA	OL355045	MH764203	A/ring-billed gull/Minnesota/CLMNAI1197/2017 –mixed
	MP	OL355046	OL367084 y MH763860	A/Franklins gull/Peru/M9/2019 –H6N2 y A/ring-billed gull/Minnesota/OPMNAI0816/2017 –H13N8
	NS	OL355047	MH764257	A/ring-billed gull/Minnesota/CLMNAI1539/2017 –H13N6
PE-05 (H6N2)	PB2	OL602181	MT421768	A/northern shoveler/Maryland/UGAI16-5592/2016 –H11N9
	PB1	OL602182	CY235271	A/mallard/Idaho/UGAI16-1943/2016 –H3N8
	PA	OL367080	MK995693	A/Northern Shoveler/California/D1715696/2017 –H5N3
	HA	OL367081	MK236677	A/American wigeon/Missouri/17OS4599/2017 –H6N1
	NP	OL367082	MK995691	A/Northern Shoveler/California/D1715696/2017 –H5N3
	NA	OL367083	MK237026	A/mallard/Wisconsin/17OS3655/2017 –H3N2
	MP	OL367084	OL355046 y MH763860	A/Kelp gull/Peru/M8/2019 –H13N6 y A/ring-billed gull/Minnesota/OPMNAI0816/2017 –H13N8
	NS	OL367085	MH764257	A/ring-billed gull/Minnesota/CLMNAI1539/2017 –H13N6

4.2.3.2. Análisis de secuencias de Neuraminidasa viral

Se realizaron los análisis filogenéticos correspondientes a la secuencia de la Neuraminidasa subtipos N2, N6 y N8, donde se incluyeron todas las secuencias reportadas en el continente americano (Figura 8, 9 y 10) y disponibles en GenBank.

En el análisis del subtipo N2, se pueden observar que las secuencias de los aislados peruanos (PE03 y PE05) subtipo N2 son genéticamente distantes, siendo la secuencia N2 de PE03 muy relacionado a cepas virales de origen sudamericano, específicamente se ubica en un clado que abarca cepas reportadas en Argentina y Chile del 2007 al 2016. Por otro lado, el aislado PE05, se encuentra ubicado dentro de un clado correspondiente a cepas virales de origen norteamericano reportadas entre 2016 y 2018. Ambos aislados peruanos (PE03 y PE05), corresponden a la misma especie hospedera (gaviotas de Franklin) y fueron obtenidas en una misma área (Poza de la Arenilla, Callao), en un mismo periodo de tiempo (una semana de diferencia).

De forma similar, en el análisis de los subtipos N6 (aislados PE02 y PE04) se observó una gran distancia. Se observa la secuencia N6 del aislado PE02 (H2N6) ubicado en un clado conformado únicamente por cepas de origen sudamericano (cepas reportadas en Chile en el año 2013) con quienes presenta una mayor similitud; mientras que muy distante se encuentra el clado que alberga a la cepa PE04 (H13N6), compuesto por cepas de origen norteamericano reportadas en Estados Unidos y Canadá del 2012 al 2015.

Finalmente, en el análisis correspondiente al subtipo N8, el aislado PE01 (H6N8) se observó muy relacionado a cepas de origen norteamericano, reportadas en los Estados Unidos en el año 2015, sin embargo, evidencia una mayor distancia con estas dentro del mismo clado presentando un 99.57% de identidad con su pariente más cercano.

Neuraminidasa N2

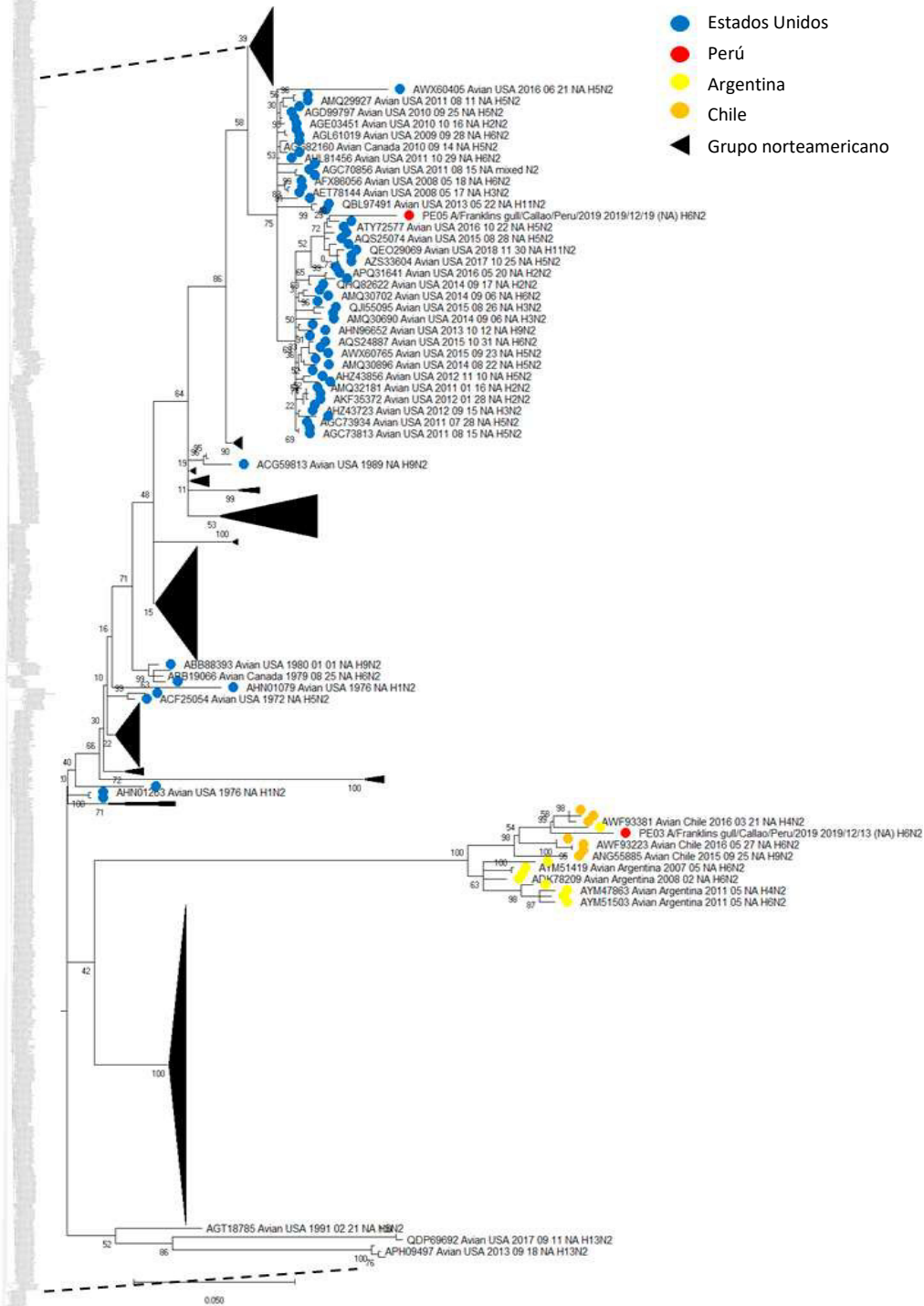


Figura 8. Árbol filogenético del segmento genómico de la Neuraminidasa N2. Se incluyeron los aislados PE03 y PE05 provenientes de gaviotas de Franklin, y 1020 cepas del subtipo N2 reportadas en América que presentan la secuencia NA codificante completa. Se expande subárboles donde se encuentran las cepas peruanas. Se incluyen cepas de Estados Unidos (azul), Perú (rojo), Argentina (amarillo) y Chile (naranja). Así mismo, se observan grupos colapsados de cepas norteamericanas (triángulos negros). Método de máxima verosimilitud con bootstrap de 1000 réplicas y modelo de sustitución nucleotídica GTR.

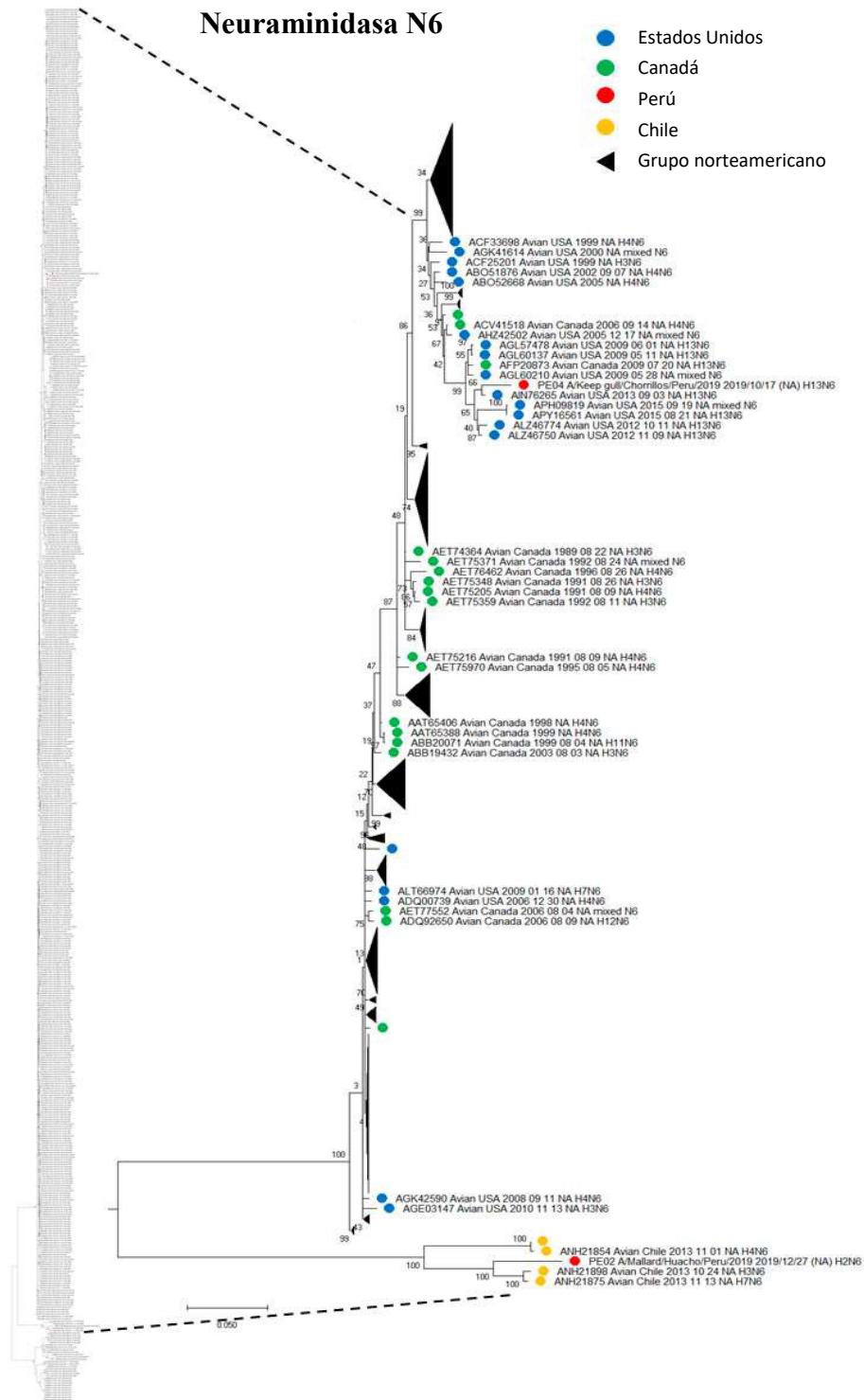


Figura 9. Árbol filogenético del segmento genómico de la Neuraminidasa N6. Se incluyeron los aislados PE02 y PE04 provenientes de pato silvestre y gaviota peruana, y 585 cepas del subtipo N6 reportadas en América que presentan la secuencia NA codificante completa. Se expanden subárboles donde se encuentran las cepas peruanas. Se incluyen cepas de Estados Unidos (azul), Canadá (verde), Perú (rojo) y Chile (naranja). Así mismo, se observan grupos colapsados de cepas norteamericanas (triángulos negros). Método de máxima verosimilitud, bootstrap de 1000 réplicas y modelo de sustitución nucleotídica GTR.

Neuraminidasa N8

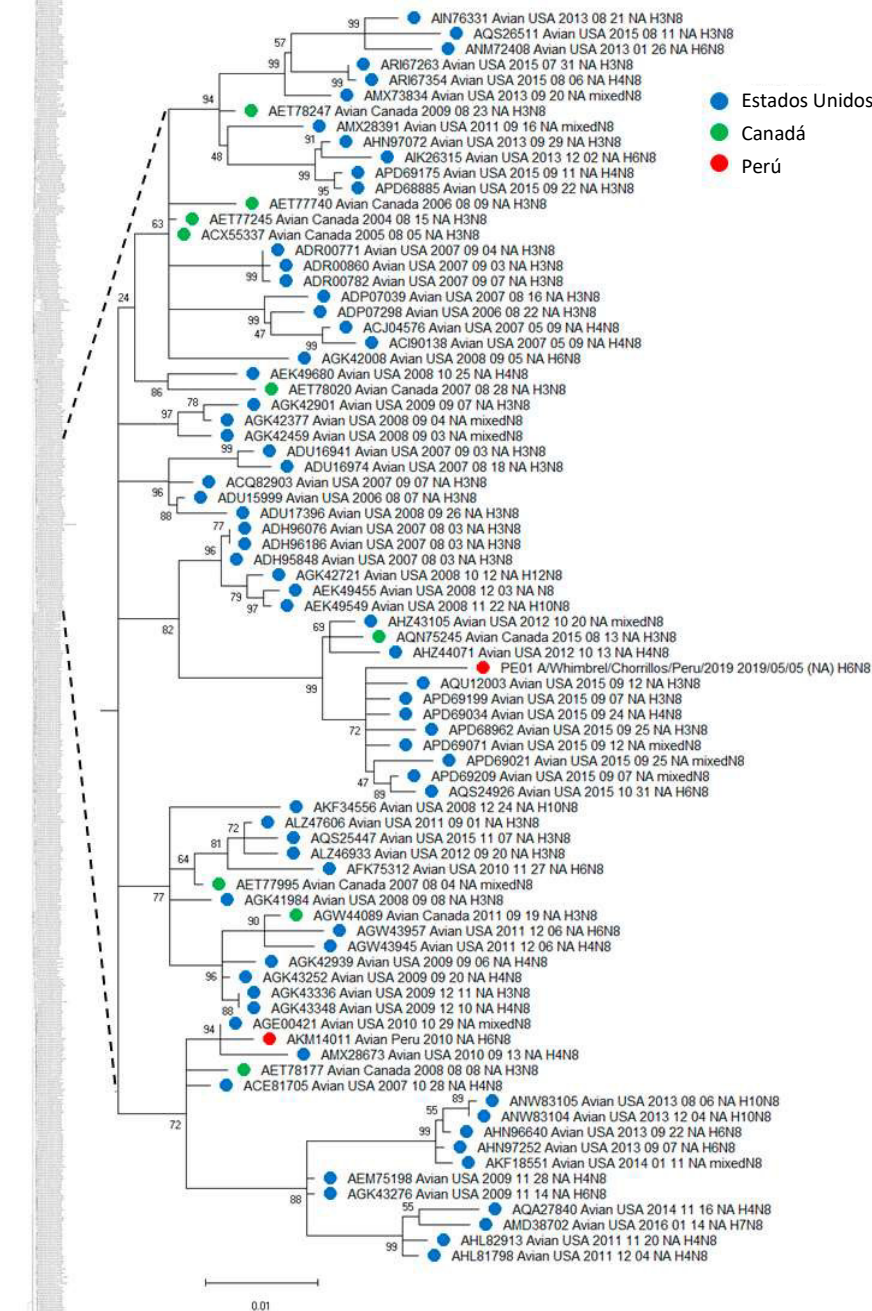


Figura 10. Árbol filogenético del segmento genómico de la Neuraminidasa N8. Se incluyó el aislado PE01 proveniente de zarapito trinador, y 741 cepas del subtipo N8 reportadas en América que presentan la secuencia NA codificante completa. Se observan cepas de Estados Unidos (azul), Canadá (verde) y Perú (rojo). Método de máxima verosimilitud con bootstrap de 1000 réplicas y modelo de sustitución nucleotídica GTR.

4.2.4. Identificación de cambios genéticos

En el análisis de secuencias de aminoácidos, se pudieron observar sustituciones importantes en las secuencias correspondientes a la Hemaglutinina y Neuraminidasa virales. Se realizaron las comparaciones identificando las sustituciones en relación a sus parientes más cercanos reportados en el NCBI.

En el caso de la Hemaglutinina, se lograron identificar sustituciones en relación a las secuencias PE01, PE02, PE04 y PE05. Las secuencias subtipo H6, PE01 y PE05, presentaron 5 y 2 sustituciones respectivamente, observándose un 99.12 y 99.65% de identidad con la cepa referencial más relacionada, respectivamente. El subtipo H13 (PE04), presentó 3 sustituciones que significaron un 99.47% de identidad con la cepa referencial más cercana. En cuanto a la secuencia subtipo H2 (PE02), esta presentó un número mayor de sustituciones (21), representando un valor de identidad del 96.26% con su pariente más cercano. El análisis identificando las sustituciones en las secuencias de la HA en relación a sus parientes más cercanos se describen en el Cuadro 11.

En lo concerniente al análisis de la Neuraminidasa, se lograron identificar sustituciones aminoacídicas en los 5 aislados virales. Los subtipos N6, PE02 y PE04, presentaron 10 y 2 cambios respectivamente, significando 97.87 y 99.57% de identidad con la cepa referencial más cercana. De forma similar, los subtipos N2, PE03 y PE05, presentaron 6 y 2 sustituciones, observándose un 98.69 y 99.56% de identidad con su pariente más cercano (cover query 98 y 96%). En el caso del subtipo N8 (PE-01), este presentó 2 sustituciones aminoacídicas, presentando un 99.57% de identidad con la cepa referencial más cercana. Los resultados del análisis identificando las sustituciones en las secuencias de la NA en relación a sus parientes más cercanos se detallan en el Cuadro 12.

Cuadro 11. Identificación de las sustituciones aminoacídicas en la secuencia de la proteína Hemaglutinina de los aislados del vIA.

Aislado peruano	Pariente más cercano	Sustituciones aminoacídicas	Identidad (%)
PE 01 (H6N8)	A/ruddy turnstone/New Jersey/AI10-652/2010(H6N1) AWV92994.1	114 (A → V) 153–154 (DG → YN) 281 (V → I) 283 (R → K)	561/566 (99.12)
PE 02 (H2N6)	A/common goldeneye/Michigan/18OS3858/2018 (H2N1) QGT49557.1	59 (N → S) 81 (N → E) 157 (Q → R) 161–162 (IY → VS) 164 (G → N) 173 (T → V) 175 (A → K) 185 (K → Q) 199 (T → A) 203 (E → T) 249 (P → T) 273 (I → R) 323 (N → D) 358 (I → T) 404–405 (KA → EV) 417 (I → L) 456 (R → K) 491 (I → V) 510 (T → N)	541/562 (96.26)
PE03 (H6N2)	A/Canada goose/Delaware Bay/34/2010 (H6N1) AFX86165.1	-	566/566 (100)
PE 04 (H13N6)	A/ring-billed gull/Minnesota/OPMNAI0817/2017 (H13N8) AXO65592.1	231 (I → T) 385 (K → R) 402 (D → N)	562/565 (99.47)
PE 05 (H6N2)	A/Blue-winged Teal/Florida/AH0108339S.4.B/2016 (Mixed) QDX47360.1	04 (V → I) 275 (K → T)	564/566 (99.65)

Cuadro 12. Identificación de las sustituciones aminoacídicas en la secuencia de la proteína Neuraminidasa de los aislados del vIA.

Aislado peruano	Pariente más cercano	Sustituciones aminoacídicas	Identidad (%)
PE 01 (H6N8)	A/environment/New Jersey/UGAI17-2155/2017(H5N8) AVN99905.1	57 (I → V) 377 (K → R)	468/470 (99.57)
PE 02 (H2N6)	A/turkey/Chile/17-002745-1/2017 (H7N6) AYJ18735.1	44 (T → I) 75 (I → V) 79–80 (GK → ET) 172 (A → T) 213 (A → V) 241 (I → V) 262 (K → R) 305 (T → I) 426 (I → V)	460/470 (97.87)
PE03 (H6N2)	A/Franklin's gull/Chile/C10242/2016 (H6N2) AXF49015.1	20 (V → I) 72 (I → T) 249 (K → R) 338 (K → R) 415 (K → R) 418 (V → I)	453/459 (98.69) 469 (cover query 98)
PE 04 (H13N6)	A/ring-billed gull/Minnesota/OPMNAI0926/2017 (H13N6) AXO65346.1	43 (L → P) 59 (T → I)	468/470 (99.57)
PE 05 (H6N2)	A/gadwall/Arkansas/15OS7729/2015 (H5N2) APQ31926.1	50 (A → V) 306 (D → N)	456/458 (99.56) 469 (cover query 96)

Acorde al número de sustituciones, la cepa peruana PE02, subtipo H2N6, es la que presenta mayor acumulación de sustituciones en ambas proteínas. La secuencia de la Hemaglutinina H2, con 21 sustituciones, implica cambios que pueden estar asociados al efecto de la presión de selección acorde a las condiciones del territorio peruano.

4.3. CAPÍTULO 3: Producción de proteínas de Hemaglutinina recombinante

4.3.1. Diseño de secuencias de Hemaglutinina de vIA y vIP.

Acorde a las secuencias seleccionadas se realizó el diseño de secuencia de HA del vIA correspondiente al subtipo H2N6 asilado en el presente estudio ([OL355026.1](#)). Con respecto a la secuencia HA de vIP, se utilizó la secuencia del virus H1N1 A/swine/Shandong/1207/2016 ([MN416643.1](#)) (Sun *et al.*, 2020), correspondiente a una cepa muy relacionada a la cepa pandémica H1N1 del año 2009.

Ambas secuencias fueron diseñadas a partir del segmento codificante de las Hemaglutininas en su porción correspondiente al ectodominio de la proteína (excluyendo el dominio transmembrana), adicionando la secuencia Poli-Histidina (6xHis) en el extremo 3', y flanqueadas por las secuencias de restricción BamHI y NheI en los extremos C' y N' terminal, respectivamente.

4.3.2. Preparación de vectores de transferencia

Habiendo seleccionado las secuencias de Hemaglutinina de VIA de origen aviar y porcino, se procedió a aplicar la metodología descrita para la construcción del plásmido vector de transferencia. Las secuencias HA fueron recuperadas a partir del vector de clonación pUC57-Amp por digestión mediante el uso de las enzimas de restricción BamHI y NheI. Como productos, se evidenciaron en la electroforesis la presencia de los segmentos HA-vIA (correspondiente al subtipo H2) de 1395 kb y HA-vIP (correspondiente al subtipo H1) de 1548 kb, además de la que corresponde al vector de clonación (Figura 11). Ambos insertos fueron escindidos del gel y posteriormente purificados.

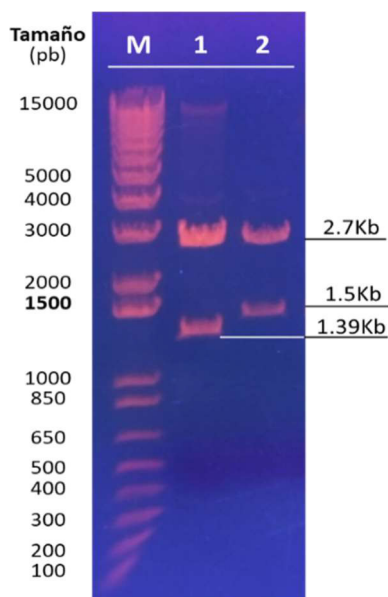


Figura 11. Observación de las secuencias tras la digestión de plásmidos de clonación pUC57-Amp mediante las enzimas de restricción BamHI y NheI. Se observan la banda correspondiente al vector (2710 pb) y las bandas que corresponden a las secuencias insertadas. M: marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA, Thermo Fisher Scientific); carril 1: secuencia de inserto HA-vIA de 1395 kb; carril 2: HA-vIP de 1548 kb. Electroforesis realizada en gel de agarosa al 0.8% y buffer TAE 1X.

Se procedió a la inserción de las secuencias HA purificadas en el plásmido vector de transferencia pAcGP67 (9761 pb) mediante el uso de la enzima T4 ligasa, para posteriormente ser captados por bacterias competentes a través de las cuales se logró producir una mayor cantidad de plásmidos al generar la replicación de las bacterias transformadas mediante su cultivo en caldo LB. A partir de este cultivo se realizó un sembrado por extensión en placas de agar LB, observándose el crecimiento de colonias blanquecinas características. A partir de estos cultivos, se seleccionaron 8 colonias, a fin de ser evaluadas individualmente. Cada colonia fue cultivada para su amplificación en caldo LB, para luego ser procesadas en la extracción de ADN plasmídico. Para corroborar la transformación de cada colonia, los plásmidos extraídos fueron sometidos a digestión con enzimas de restricción BamHI y NheL a fin de confirmar la presencia de los insertos en el vector de transferencia.

En el caso del análisis del inserto HA-vIA, la electroforesis evidenció su presencia (inserto de 1.39 kb) en cada una de las colonias (Figura 2) además de la secuencia del plásmido vector (9.7 kb). Posteriormente, cada muestra de plásmido extraído fue cuantificada, seleccionándose la correspondiente a la colonia #3, la cual presentó mayor concentración (159 ng/μL), para ser utilizada en la siguiente fase.

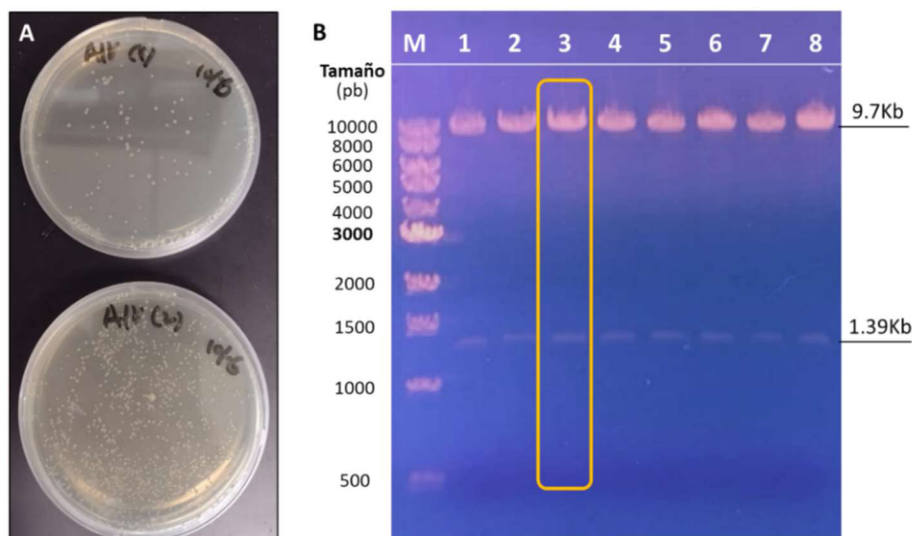


Figura 12. Transformación de bacterias competentes con el inserto HA-vIA. A. Crecimiento de bacterias *E. coli* competentes JM109 transformadas, sembradas a diferente concentración (1X y 10X) en agar LB. Se seleccionaron 8 colonias cuyos plásmidos fueron extraídos y purificados. B. Evaluación individual de los plásmidos purificados mediante digestión enzimática. Las 8 colonias evidenciaron poseer plásmidos transformados tras la digestión con las enzimas BamHI y NheI. M: marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder, New England Biolabs); carril 1-8: secuencias de cada plásmido extraído donde se observan la presencia del plásmido vector (9.7 kb) e inserto (1.39 kb). Se seleccionó la muestra #3 por presentar mayor concentración (amarillo). Electroforesis en gel de agarosa 0.8% y TAE 1X.

Con respecto al análisis del inserto HA-vIP, se realizó el mismo procedimiento, y se observó la presencia del producto esperado en únicamente 2 de las 8 colonias seleccionadas (inserto de 1.54 kb), por lo que fueron seleccionadas para su evaluación.

La presencia de al menos dos diferentes tamaños de producto tras la digestión con las enzimas BamHI y NheI en la evaluación de transformación para la producción del plásmido SIV-HA, obligó a la evaluación posterior para corroborar las características de los dos únicos plásmidos transformados cuyo producto tras la digestión fue de 1.553 kb. Para ello, se eligieron distintos patrones de digestión acorde a la presencia de diferentes sitios de restricción en la secuencia insertada. Es así que se evaluó mediante el uso de las enzimas EcoRV, PstI y KpnI, cuyos sitios de acción se encontraron en dos áreas distantes dentro de la secuencia insertada y ausentes a lo largo del vector de transferencia utilizado.

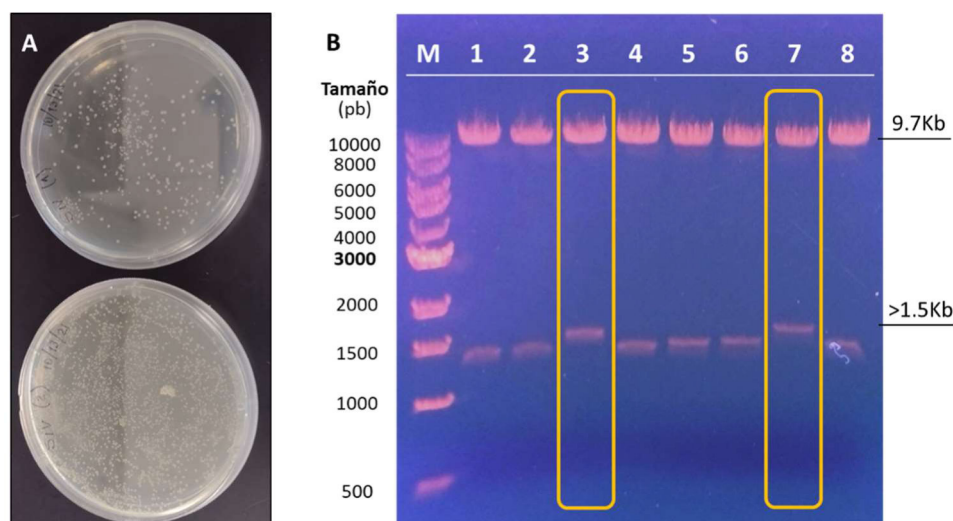


Figura 13. Transformación de bacterias competentes con el inserto HA-vIP. A. Crecimiento de bacterias *E. coli* competentes JM109 transformadas a diferente concentración (1X y 10X) en agar LB. Se seleccionaron 8 colonias para la extracción y purificación de plásmidos. B. Evaluación individual de los plásmidos purificados mediante digestión enzimática por BamHI y NheI. Se observan únicamente 2 colonias que poseen plásmidos transformados de tamaño esperado (1.553 kb). M: marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder, New England Biolabs); carril 1-8: secuencias de cada plásmido extraído donde se observan la presencia del plásmido vector (9.7 kb) e inserto esperado en carril 3 y 7. Se seleccionó la muestra de mayor concentración de plásmidos (colonia #3). Electroforesis en gel de agarosa 0.8% y TAE 1X.

Cada enzima mencionada fue evaluada en una diferente reacción para cada muestra. En la evaluación se utilizaron como muestra los dos plásmidos positivos #3 y #7, y adicionalmente se incluyó el plásmido #6 para la evaluación de los negativos a la transformación esperada.

Como resultado se pudo observar la presencia del fragmento producto de la digestión de las enzimas EcoRV, PstI y KpnI, en tamaño de 1314 pb, 1553 pb y 1755 pb, respectivamente (Figura 4) utilizando los plásmidos #3 y #7, a diferencia del plásmido #6, donde no se observó ninguno de los fragmentos correspondientes. Por lo tanto, se corroboró la correcta inserción de la secuencia HA-vIP en el plásmido de transferencia #3 y #7. Entre ambas, se seleccionó la correspondiente a la #3, la cual que presentó mayor concentración (112.4 ng/μL) para su uso en los análisis posteriores.

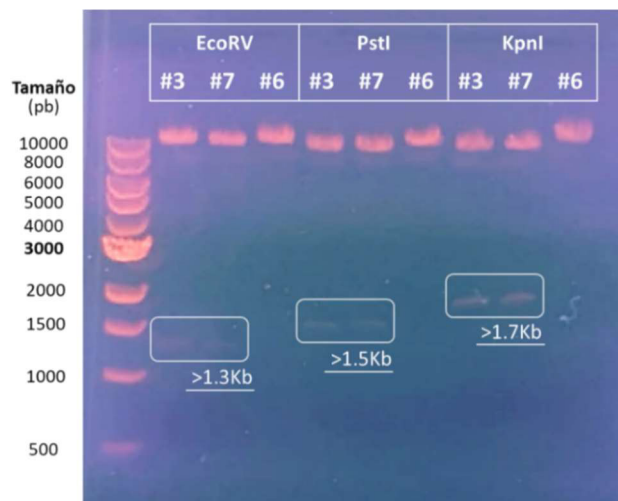


Figura 14. Evaluación individual de los plásmidos conteniendo el inserto HA-vIP mediante digestión enzimática. La secuencia diseñada de HA-vIP contiene secuencias correspondientes a las enzimas de restricción EcoRV, PstI y KpnI, que no están presentes en el vector. El uso de estas enzimas permite la generación de fragmentos de aprox. 1.3 kb, 1.5 kb y 1.7 kb, respectivamente. La presencia de los 3 fragmentos corrobora la presencia de la secuencia blanco, lo cual se observó en las colonias #3 y #7 de plásmidos HA-vIP.

4.3.3. Producción de proteínas recombinantes de HA

Los plásmidos seleccionados fueron utilizados para llevar a cabo la transfección. Dichos plásmidos fueron expuestos a genoma de Baculovirus y posteriormente, trasladados a cultivo de células de insecto Sf9 (P0).

Para ello, fueron preparadas células en placas de 6 pozos, sembrándose 1×10^6 células en cada celda logrando una confluencia del 60%. Estos cultivos presentaron cambios asociados a efecto citopático dentro de las 48 a 60 horas p.i. (Figura 15). Los cambios observados asociados a la infección iniciales se percibieron a partir de las 24 horas p.i., donde se pudo apreciar la presencia de agrandamiento celular y picnosis, diferenciándose de los controles. A partir de las 48 horas p.i. se observó muerte celular evidenciada por el desprendimiento de células en diversas zonas de la placa. Con respecto a los controles, las células se observaron aparentemente normales, continuando su crecimiento óptimo llegando a una confluencia superior al 90%. Al observarse estas características, todas las placas fueron llevadas a refrigeración por 20 horas. Posteriormente, se realizaron las cosechas de los cultivos tomando el

sobrenadante como fuente de la siguiente generación de Baculovirus recombinante y realización de pasajes siguientes. La proteína correspondiente a la secuencia HA-vIA se denominó proteína recombinante HA subtipo H2 (rHA-H2), mientras que la secuencia HA-vIP se denominó proteína recombinante HA subtipo H1 (rHA-H1).

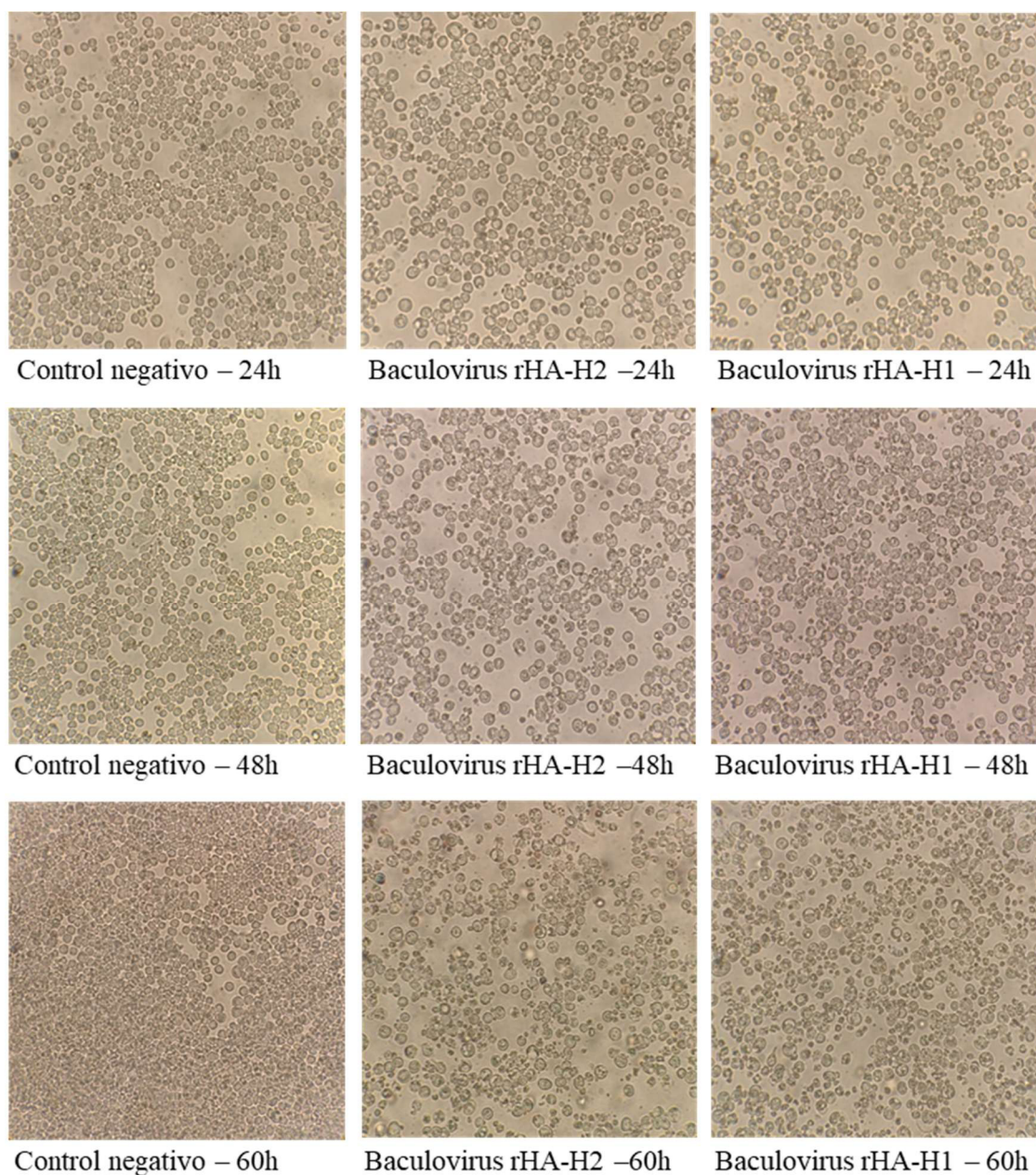


Figura 15. Cultivos de células de insecto *Sf9* infectados con Baculovirus recombinante (40X). Se observó a las 24 postinfección (p.i.) cambios asociados a la infección viral (aumento del tamaño de las células y picnosis) entre los diferentes cultivos en relación al control. Entre las 48h y 60 horas p.i., se puede observar mayor diferencia en el crecimiento de los cultivos y clara evidencia de efecto citopático y muerte celular.

Para corroborar la producción de las proteínas recombinantes en las células de insecto infectadas, se tomaron muestras de los cultivos a las 24, 48 y 72 horas y se procesaron para ser analizadas por citometría de flujo con el objetivo de identificar y cuantificar a las células productoras de las proteínas de interés. Es así que se observó un incremento progresivo en el tiempo en la producción de las proteínas recombinantes. Como se puede observar en la figura 16.A, se presentan los resultados de la identificación de células en producción de proteína rHA-H2. Los histogramas presentados grafican el incremento en la proporción de las células productoras mediante la captación de la fluorescencia emitida por el anticuerpo monoclonal anti-His Tag unido a la proteína de interés en las células positivas.

Así mismo, se presenta la visualización individual de células positivas a la tinción fluorescente (Fig. 16. B). La marcación celular permitió observar y diferenciar a las células productoras de proteína por mostrar una fluorescencia roja. Como se puede apreciar, niveles en la producción no solo se observa en los valores porcentuales en las poblaciones individuales, sino también a nivel de las células positivas, encontrando una mayor positividad individual a 72 horas post transfección. Datos similares fueron obtenidos en el análisis de la producción de proteína rHA-H1, evidenciando la óptima producción de las proteínas recombinantes.

Por lo tanto, se evidenció la producción de las proteínas de interés en las células de insecto *Sf9* mediante detección por anticuerpos monoclonales, permitiendo una cuantificación relativa para determinar el incremento de las proporciones celulares que se infectaron y que, por lo tanto, iniciaron la producción de proteína recombinante.

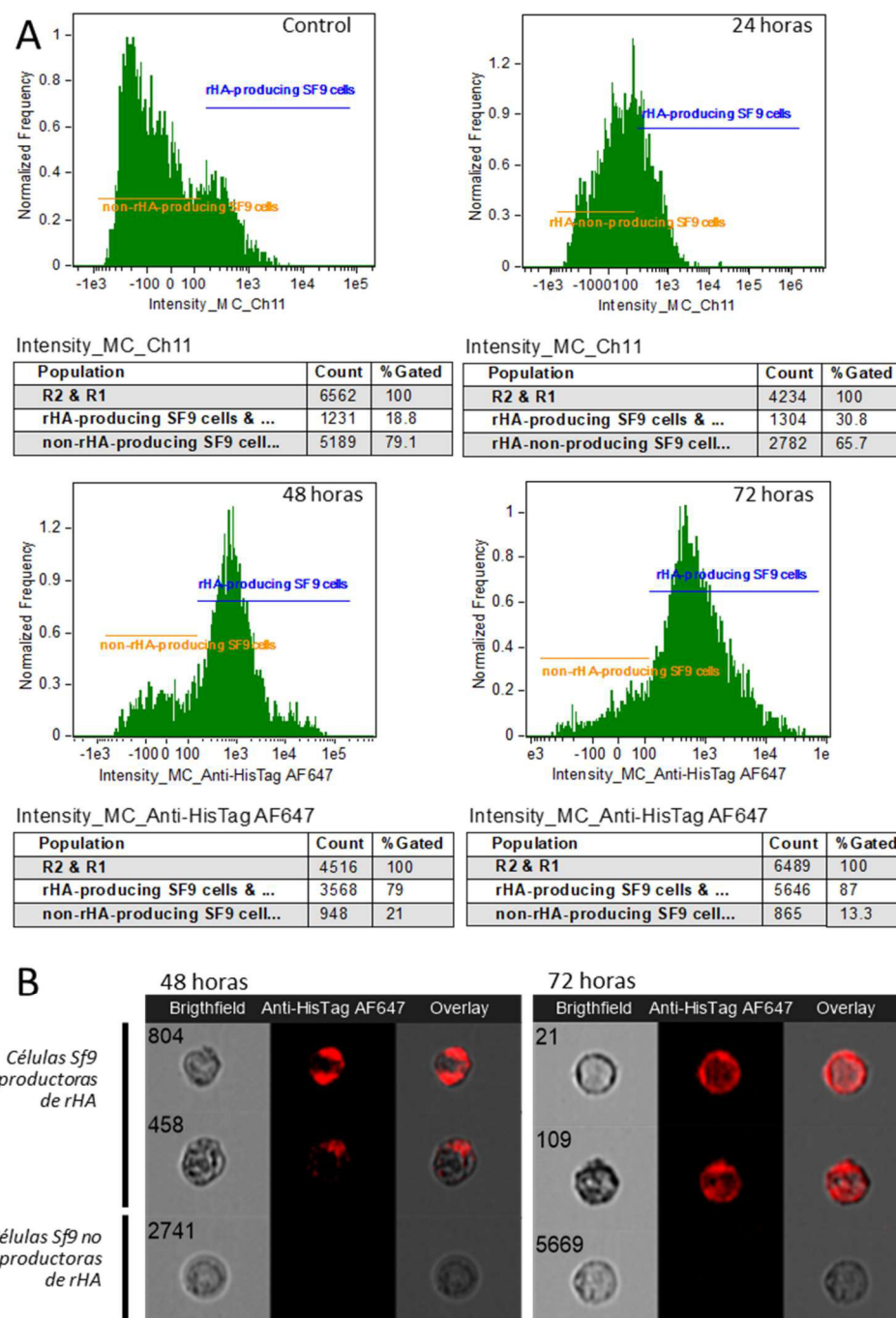


Figura 16. Evaluación de la producción de proteína rHA-H2 en células Sf9 infectadas con Baculovirus recombinante a las 24, 48 y 72 horas. Se cosecharon células inoculadas con Baculovirus recombinante HA-H2 en diferentes tiempos de incubación para evaluar el incremento de la producción de proteína recombinante. A) Se observa en los histogramas el incremento en la fluorescencia de células positivas a medida que transcurre el tiempo (rótulo azul), obteniendo una mayor fluorescencia entre las 48 y 72 horas de incubación. Se evidencia el incremento de los valores relativos con picos de fluorescencia mayores en comparación al control (rótulo amarillo). B) En la parte inferior se observan las imágenes celulares donde se muestra la diferencia entre células Sf9 productoras de proteína recombinante al presentar fluorescencia positiva anti-His Tag (rojo).

De esta manera, se determinaron las proporciones celulares, en valores relativos, que incrementaron la producción de proteína en el tiempo, siendo la mayor producción lograda entre las 48 y 72 horas, con valores del 78.1 y 86.4% de células positivas, respectivamente, en comparación con el grupo de 24 horas y grupo control, los cuales registraron valores del 32.6 y 18.6% de células con fluorescencia positiva, respectivamente. Estos resultados pueden visualizarse en un cuadro de barras (Fig. 17), donde se observa una significativa diferencia en la producción de proteína de interés por parte de las células Sf9 inoculadas a partir de las 48 horas de incubación. No se determinó una diferencia estadística significativa entre el grupo control y el grupo de 24 horas.

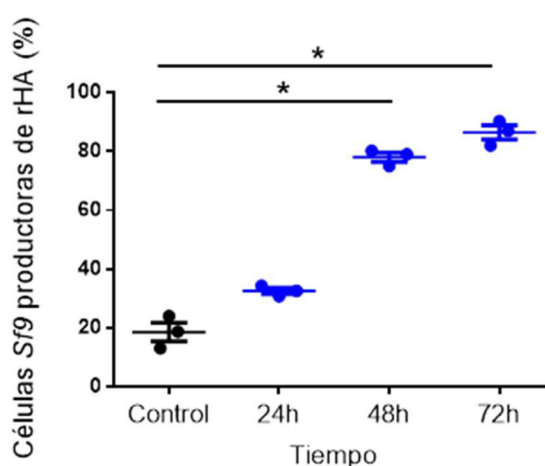


Figura 17. Proporción de células de insecto *Sf9* productoras de proteína rHA-H2. Se observa el incremento en el número de células productoras de proteína a las 24, 48 y 72 horas (azul) y control negativo (negro) post inoculación con Baculovirus recombinante. Se observa un incremento significativo a partir de las 48 horas. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

La presentación del efecto citopático en los cultivos de células Sf9 sumado a los hallazgos de análisis por citometría de flujo, determinó el tiempo de cosecha más adecuado para el presente estudio, el cual se definió entre las 55 y 60 horas post inoculación con Baculovirus recombinante. Posteriormente, se procedió al procesamiento de las cosechas, seguido de la purificación y evaluación de ambas proteínas recombinantes producidas.

4.3.4. Evaluación de proteínas recombinantes purificadas

La evaluación de la producción de las proteínas recombinantes HA se llevó a cabo mediante Western blot. Con respecto a la proteína correspondiente a la proteína rHA-H2, se pudo observar la presencia de una banda de aproximadamente 60 kDa; en el caso de la proteína rHA-H1, se observó una banda de 64 kDa aproximadamente; ello debido a la unión del anticuerpo primario anti-His con la secuencia poli-His presente en el extremo N-terminal de ambas proteínas, a diferencia de los controles negativos (Figura 18). Posterior a la evaluación por Western blot, se realizó la purificación de las proteínas mediante cromatografía de afinidad mediante el kit comercial.

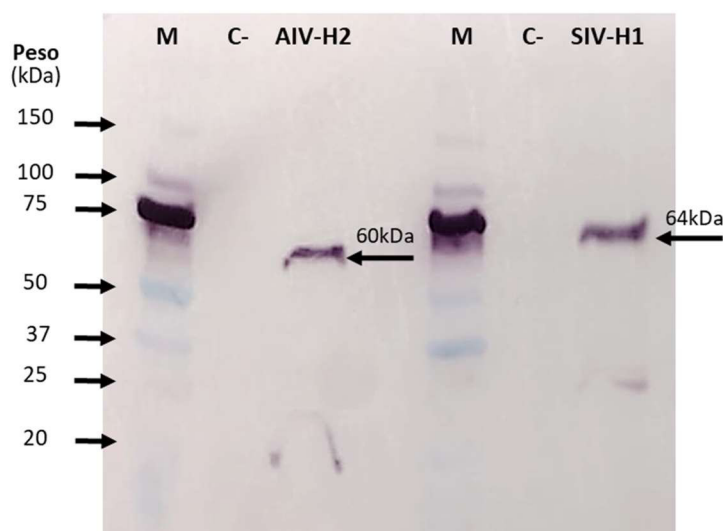


Figura 18. Evaluación de las proteínas recombinantes rHA-H2 y rHA-H1 mediante Western blot. Se observa la presencia de una banda de 60 kDa y 64 kDa correspondientes a las proteínas rHA-H2 de vIA y rHA-H1 de vIP, respectivamente.

Finalmente, se realizó la cuantificación del producto eluido mediante espectrofotometría, obteniéndose valores de concentración mayores a 700 ng/μL, con respecto a rHA-H2 de vIA; y mayores a 600 ng/μL en relación a rHA-H1 de vIP.

Para la realización de las evaluaciones posteriores, se requirió de la producción de mayores cantidades de proteínas recombinantes. Para ello, a partir del sobrenadante del primer cultivo (P0), se realizaron subsecuentes inoculaciones en una siguiente

monocapa celular (P1). De esta manera, se llevaron a cabo los siguientes pasajes mediante el uso de 15 frascos T75 de cultivo de células de insecto Sf9 al 65% de confluencia, e incubados a 28° C sin suplemento de CO₂. Los cultivos fueron monitorizados constantemente (cada 4 a 5 horas) a fin de poder detectar tempranamente el desarrollo de efecto citopático. Estos cambios se observaron entre las 48 y 55 horas p.i., tiempo en el que se procedió a retirar los frascos de la incubación para realizar las cosechas respectivas, así como el procesamiento y purificado posteriores de las proteínas recombinantes producidas. En cada producción “masiva” se lograron colectar aproximadamente 220 mL de cosecha. Dichos volúmenes fueron conservados a -20°C hasta su procesamiento acorde a la descripción previamente indicada y posteriormente evaluados y cuantificados para su uso en los ensayos posteriores.

4.3.5. Evaluación de la capacidad inmunogénica de las proteínas recombinantes

4.3.5.1. Ensayo *in vitro* de respuesta de activación de monocitos/macrófagos porcinos.

En los ensayos *in vitro*, se evaluó la exposición directa de monocitos/macrófagos porcinos a diferentes concentraciones de proteína rHA-H1 e incubadas durante una hora. Como resultado se observó un mayor incremento de la proporción de células activadas productoras de especies reactivas de oxígeno (superiores al 80%) en los grupos expuestos a las diferentes concentraciones de proteína, y similares a la respuesta observada en el control positivo (estimulados con antígeno *E. coli* inactivado) con un valor promedio de 91.18% de células activadas (Figura 19). A su vez el control negativo presentó un valor medio de 57.6%.

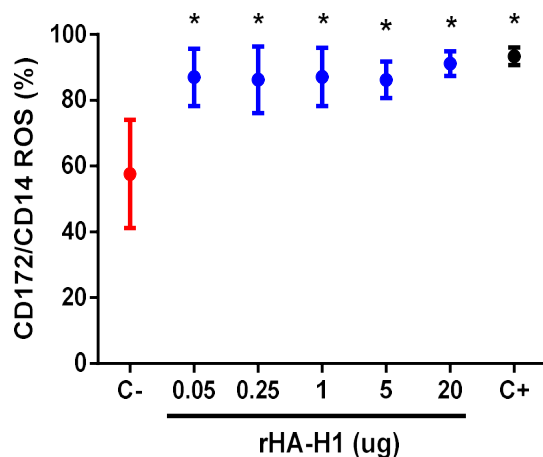


Figura 19. Evaluación de la activación celular mediante ensayo *in vitro* de monocitos/macrófagos porcinos ante exposición a la proteína rHA-H1. Se observa la respuesta incrementada de producción de ROS en los grupos celulares expuestos. Control negativo (rojo), proteína rHA-H1 (azul), control positivo (negro). Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

El análisis por citometría de flujo permitió visualizar la diferencia marcada en la positividad de células activadas (Fig. 20), evidenciado en los valores expuestos en el histograma presentado, así como en la visualización de las células marcadas con los fluoróforos respectivos. El fluoróforo marcador de activación CellRox Deep Red es identificado en mayor cuantía en los grupos celulares expuestos a diferencia del grupo control donde el porcentaje de activación es significativamente menor.

En la figura 20.A se observa un histograma de células control contrastadas con un histograma correspondiente a células expuestas a 20 μ g de proteína rHA-H1, donde se observa una clara diferencia en la emisión de fluorescencia asociada a la activación celular (etiquetado como R5). Es así que se visualiza un pico de alta intensidad en el grupo tratado. Esta disposición procede del conteo de células CD172a positivas donde se puede diferenciar aquellas que son productoras de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la tinción violeta en células activadas. La figura 20.B presenta imágenes celulares individuales de células monocitos/macrófagos (CD172a positivas) analizados.

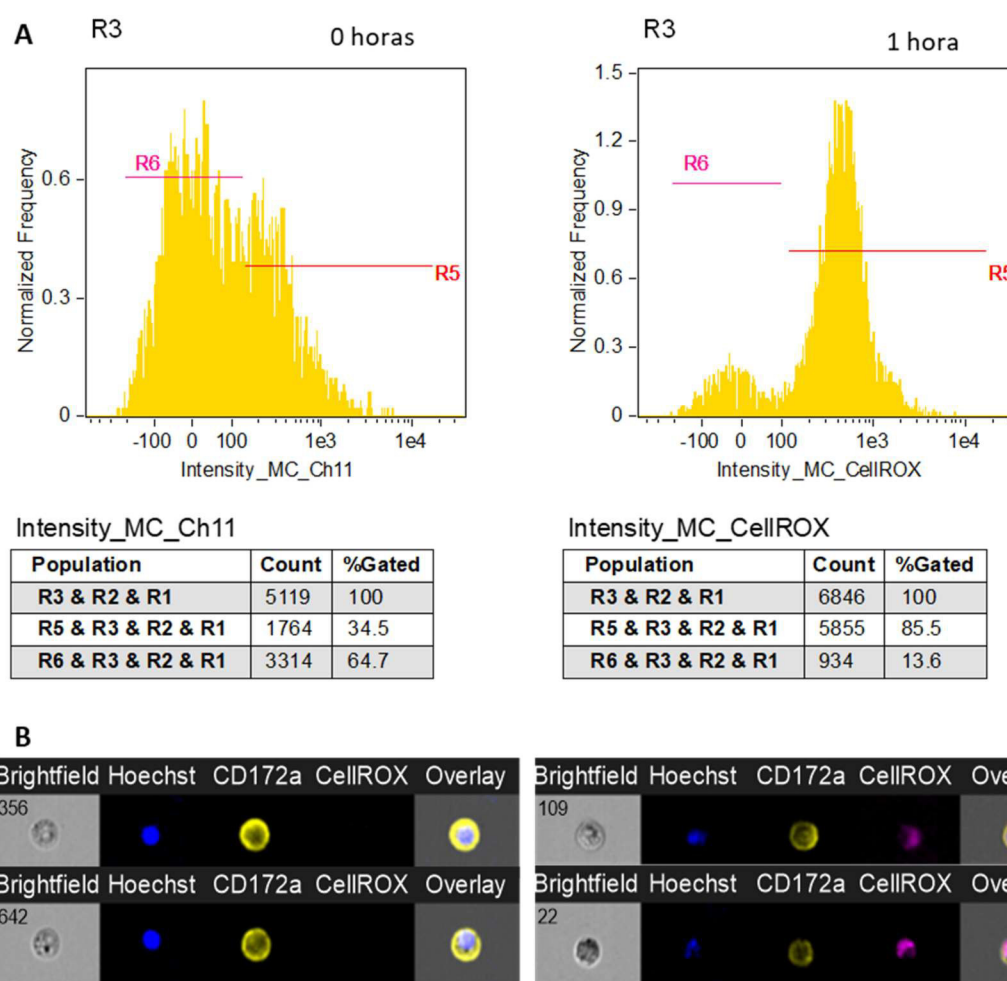


Figura 20. Evaluación de la activación de monocito/macrófagos porcinos ante exposición a la proteína rHA-H1 mediante citometría de flujo. A. Se observa en los histogramas la diferencia marcada en la respuesta de producción de ROS en el grupo control (0 horas) y los grupos expuestos a proteínas rHA-H1 (1 hora), donde se observa una clara diferenciación en la frecuencia de células que presentan positividad (se observa pico en R5). B. En la parte inferior se observan imágenes celulares donde se visualiza la diferencia entre las poblaciones activadas al presentar fluorescencia positiva en la producción de ROS (violeta) en células monocitos/macrófagos activados. Tinción nuclear (azul), CD172+ (amarillo), CellRox (violeta).

4.3.5.2. Ensayos *in vivo* de exposición a proteína rHA-H2 en pollos

Realizados los experimentos de exposición a la proteína rHA-H2 mediante la inoculación de 5 y 20 μg vía intraperitoneal en pollos de carne, se llevaron a cabo las evaluaciones a las 24 horas p.i. Se realizaron los lavados peritoneales, donde se logró recuperar un volumen de 12 a 15 mL por cada ave.

Los resultados evidenciaron una gran proporción de leucocitos infiltrados detectados a las 24 horas post inoculación, que incluso se evidenció al análisis visual, donde se observó mayor turbidez de los lavados correspondientes a los animales estimulados (mayor turbidez del grupo Control positivo y, en segundo lugar, los estimulados con proteína recombinante). Los análisis de cuantificación evidenciaron el incremento de los valores absolutos de las células totales peritoneales en las aves expuestas a la proteína rHA-H2 (figura 21, cuadro 13). Se observó diferencia significativa en el grupo de 20 μ g y control positivo con respecto al grupo control negativo, lo cual se puede apreciar en el incremento numérico en el componente celular de los grupos inoculados (células totales), a la vez que concordó con la mayor turbidez observada en las colectas de las aves estimuladas.

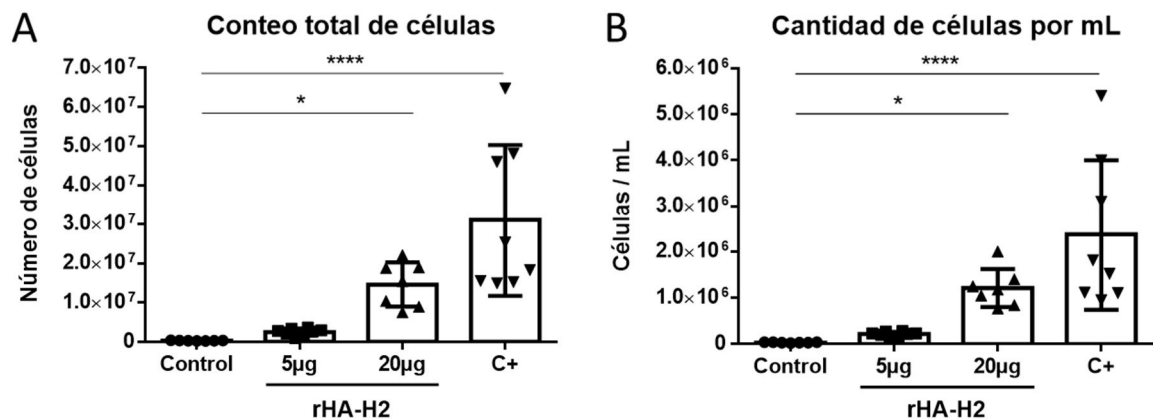


Figura 21. Valores absolutos de células en cavidad abdominal de pollos inoculados con 5 y 20 μ g de proteína rHA-H2. Se observa infiltración celular (A) y concentración celular incrementada (B) en los grupos estimulados con proteína recombinante a las 24 horas post inoculación. Se observa un incremento marcado del control positivo en relación al negativo y tratamiento de 5 μ g. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

Cuadro 13. Evaluación de la infiltración celular calculado en valores absolutos y concentración celular a las 24 horas post inoculación intraperitoneal de la proteína rHA-H2 en pollos de 3 semanas de edad.

Grupo experimental	Valor absoluto (células totales)	Concentración (células/mL)
Control negativo	$3.36 \times 10^5 \pm 4.51 \times 10^4$	$3.29 \times 10^4 \pm 5.60 \times 10^3$
Tratamiento 5 µg proteína rHA-H2	$2.50 \times 10^6 \pm 6.28 \times 10^5$	$2.16 \times 10^5 \pm 3.37 \times 10^4$
Tratamiento 20 µg proteína rHA-H2	$1.46 \times 10^7 \pm 4.18 \times 10^6$	$1.21 \times 10^6 \pm 3.05 \times 10^5$
Control positivo (<i>E. coli</i> inactivado)	$3.10 \times 10^7 \pm 1.34 \times 10^7$	$2.37 \times 10^6 \pm 1.13 \times 10^6$

En la figura 22 se observa la representación gráfica de las subpoblaciones leucocitarias analizadas por citometría de flujo, en el grupo control (A), Grupo estimulado con 20µg de proteína recombinante (B) y grupo control positivo (C). Las poblaciones leucocitarias infiltradas en la cavidad peritoneal estuvieron compuestas principalmente por heterófilos a las 24 horas post inoculación (representados en amarillo).

Acorde a los diagramas de puntos obtenidos por citometría de flujo (Fig. 22), se puede observar que los grupos estimulados con la proteína recombinante y control positivo muestran un incremento en la cantidad de células (en términos absolutos) debido a la migración tras el estímulo antigénico. Analizando los valores relativos, se puede observar el gran incremento proporcional de las poblaciones de heterófilos (representados en amarillo), que se observa como la población predominante en ambos grupos dada la migración celular a las 24 horas. Este incremento proporcional se observa en el cuadro 14, principalmente en el grupo tratado con 20 µg de rHA-H2 con un $34.82 \pm 12.21\%$ de heterófilos comparable con lo observado en el control positivo con un $58.38 \pm 15.41\%$, a diferencia del control negativo, donde la proporción se conservó en un $13.58 \pm 10.20\%$. El incremento es significativo en el grupo tratado con 20 µg de proteína.

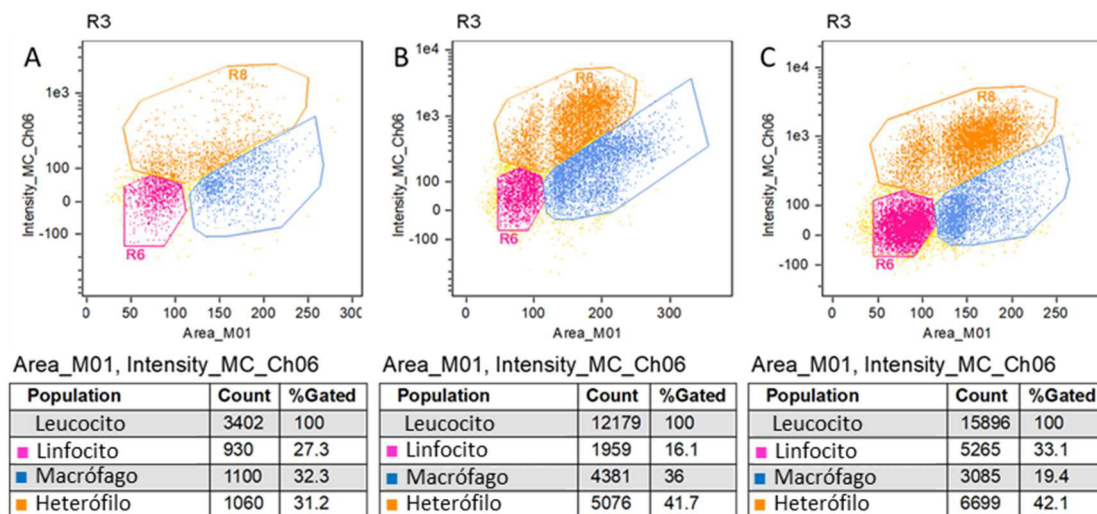


Figura 22. Análisis de subpoblaciones leucocitarias aviares a las 24 horas post inoculación intraperitoneal con la proteína recombinante HA-H2 mediante citometría de flujo. (A) Control negativo (no estimulado); (B) Grupo expuesto a la rHA-H2 dosis 20 µg; (C) Control positivo. Se muestran las poblaciones de heterófilos (amarillo), linfocitos (rosado) y monocitos/macrófagos (azul). Se observa mayor infiltración celular ante la exposición a la proteína rHA-H2 a las 24 horas. Se evidencia el incremento de los valores relativos de heterófilos y monocitos/macrófagos en los animales tratados en comparación con el grupo control.

Cuadro 14. Proporción de poblaciones leucocitarias en cavidad abdominal de pollos de carne estimulados con proteína rHA-H2 a las 24 horas, evaluados por citometría de flujo.

Grupo experimental	Monocitos/ macrófagos (%)	Heterófilos (%)	Linfocitos (%)
Control negativo	36.88 ± 20.81	13.58 ± 10.20	37.7 ± 21.39
Tratamiento 5 µg	20.20 ± 12.33	17.84 ± 12.62	35.2 ± 13.87
Tratamiento 20 µg	28.34 ± 15.53	34.82 ± 12.21	19.75 ± 9.93
Control positivo	18.93 ± 6.73	58.38 ± 15.41	18.29 ± 10.57

Paralelamente, se realizó la evaluación de las poblaciones de monocitos/macrófagos de pollo mediante su identificación con el marcador celular KUL-01. Como parámetro de análisis de activación celular tras el estímulo antigénico, se evaluó el nivel de respuesta de estas células aviares, mediante la medición de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) utilizando el marcador CellRox Deep Red. Los resultados evidenciaron el incremento en los valores absolutos de células monocitos/macrófagos presentes en cavidad peritoneal, así como la gran proporción de macrófagos productores de ROS tras 24 horas post inoculación, en comparación al grupo no estimulado (Figura 23).

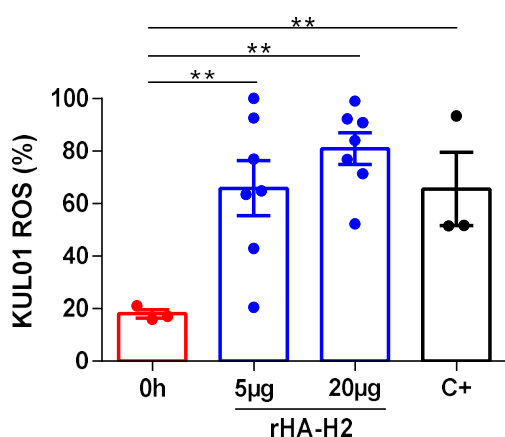


Figura 23. Proporción de poblaciones de macrófagos aviares estimulados que incrementaron la producción de ROS a las 24 horas post exposición a la proteína rHA-H2. Se observa diferencia estadística entre los grupos estimulados en comparación al grupo control (no estimulado). Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

Ambas dosis de proteína recombinante promovieron la activación de una alta proporción de macrófagos, por encima del 60% comparable con el control positivo ($65.53 \pm 27.31\%$), sin evidenciarse diferencia estadística significativa entre los tratamientos. El control negativo presentó una proporción de células activadas del 18.0% ($\pm 3.10\%$), encontrando una diferencia estadística significativa en todos los grupos estimulados en relación al control negativo. Por lo tanto, se consideró que la proteína rHA-H2, en las dosis de 5 y 20 µg, generó un marcado estímulo inmunogénico en el organismo aviar a las 24 horas post exposición, evidenciado por la gran migración de leucocitos a la cavidad abdominal, caracterizada por un marcado incremento de la subpoblación de heterófilos, así como por la activación del grupo de monocitos/macrófagos.

4.3.5.3. Ensayos *in vivo* de exposición a proteína rHA-H1 en lechones

Resultados similares pudieron observarse en el estudio realizado en los porcinos. En los lechones se procedió a evaluar la proliferación de células en cavidad abdominal posterior al estímulo utilizando la proteína rHA-H1. Se realizaron las colecciones de células mediante lavados peritoneales, recuperándose aproximadamente 35-40 mL de volumen donde pudo observarse mayor turbidez en las colecciones correspondientes al grupo tratamiento y control positivo.

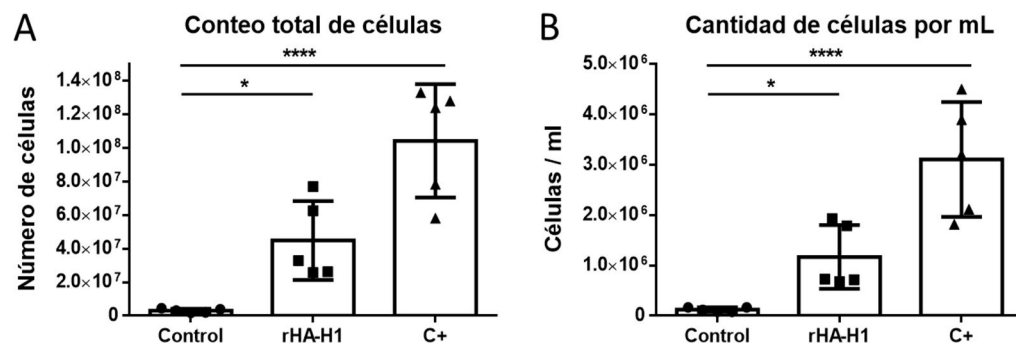


Figura 24. Valores absolutos de células en cavidad abdominal de porcinos inoculados con 50 μ g de proteína rHA-H1. Se observa una marcada infiltración celular (A) y concentración celular incrementada (B) en los grupos estimulados con proteína recombinante a las 24 horas post inoculación y control positivo. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

Cuadro 15. Evaluación de la infiltración celular calculado en valores absolutos y concentración celular a las 24 horas post inoculación intraperitoneal de la proteína rHA-H1 en lechones de 3 semanas de edad.

Grupo experimental	Valor absoluto (células totales)	Concentración (células/mL)
Control negativo	$3.11 \times 10^6 \pm 1.00 \times 10^6$	$1.24 \times 10^5 \pm 3.95 \times 10^4$
Tratamiento 50 μ g proteína rHA-H1	$4.49 \times 10^7 \pm 2.06 \times 10^7$	$1.17 \times 10^6 \pm 5.54 \times 10^5$
Control positivo (<i>E. coli</i> inactivado)	$1.04 \times 10^8 \pm 2.96 \times 10^7$	$3.11 \times 10^6 \pm 1.00 \times 10^6$

Los resultados evidenciaron la infiltración marcada de leucocitos porcinos en cavidad abdominal a las 24 horas post inoculación en los animales estimulados. El cálculo de los valores absolutos evidenció el incremento de las células totales en los animales expuestos a la proteína rHA-H1, así como su concentración a nivel de cavidad tras 24 horas post inoculación (figura 24, Cuadro 15). Similar al ensayo en pollos, se determinó una diferencia estadística significativa entre el grupo tratado y el control positivo en relación al control negativo, concordando con la mayor turbidez de los lavados correspondientes a los grupos estimulados.

La figura 25 esquematiza la distribución de las subpoblaciones leucocitarias analizadas por morfometría mediante citometría de flujo en el control negativo (A), grupo estimulado con 50 µg de proteína recombinante (B) y control positivo (C). Las poblaciones de neutrófilos son las que predominan a las 24 horas post inoculación (representados en color rojo).

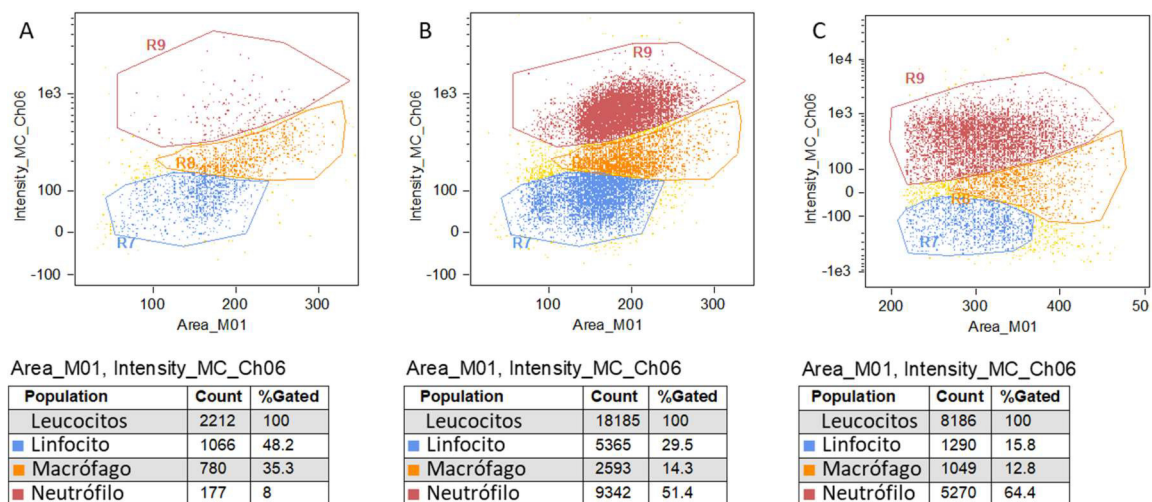


Figura 25. Análisis de subpoblaciones leucocitarias porcinas a las 24 horas post inoculación intraperitoneal con la proteína recombinante HA-H1 mediante evaluación morfológica por citometría de flujo. (A) Control negativo (no estimulado); (B) Grupo expuesto a la rHA-H1 dosis 20 µg. Se observa la distribución de las poblaciones de polimorfonucleares (rosado), monocitos/macrófagos (amarillo) y linfocitos (azul). Se evidencia la mayor presencia de células ante la exposición a la proteína rHA-H1 a las 24 horas. Existe un incremento marcado de la proporción de polimorfonucleares en el grupo tratado en comparación con el grupo control negativo.

En el análisis morfométrico se logró visualizar la mayor proporción del componente polimorfonuclear en términos absolutos. En el análisis relativo se evidenció el incremento marcado en esta población leucocitaria, encontrando valores basales del $8.75 \pm 1.83\%$ en el grupo control, y observándose valores en las mediciones del grupo tratado y control positivo del $54.87 \pm 4.28\%$ y del $66 \pm 5.02\%$, respectivamente (Cuadro 16). El incremento en las proporciones de la población de neutrófilos correspondientes al grupo tratado con $50 \mu\text{g}$ de rHA-H1 demostró diferencia estadística significativa con respecto al control negativo.

Cuadro 16. Proporción de poblaciones leucocitarias en cavidad peritoneal de lechones estimulados con proteína rHA-H1 a las 24 horas, evaluados por citometría de flujo.

Grupo experimental	Monocitos/ macrófagos (%)	Neutrófilos (%)	Linfocitos (%)
Control negativo	38.70 ± 31.64	8.75 ± 1.83	3.95 ± 6.37
Tratamiento $50\mu\text{g}$	15.20 ± 1.76	54.87 ± 4.28	2.28 ± 2.43
Control positivo	12.70 ± 1.31	66.00 ± 5.02	1.5 ± 2.27

De igual forma, para la identificación y evaluación de las poblaciones de monocitos/macrófagos, se utilizaron los marcadores celulares CD172a y CD14. Como parámetro de análisis de activación celular tras el estímulo antigénico, se evaluó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como parte de la respuesta de estas células porcinas mediante el uso del marcador CellRox Deep Red. Los resultados evidenciaron el incremento en los valores absolutos de monocitos/macrófagos presentes en cavidad peritoneal, que produjeron ROS a las 24 horas post inoculación, en comparación al grupo control. La proporción de células activadas en el grupo tratamiento y control positivo, presentaron valores del $80.37 \pm 18.40\%$, y $95.47 \pm 4.40\%$, respectivamente, a diferencia del observado en el control negativo con un valor del $54.0 \pm 10.98\%$, (Figura 26). Se encontró diferencia significativa entre el control negativo y los grupos tratamiento y control positivo.

Es así que, se evidencia un incremento en los valores absolutos de las subpoblaciones leucocitarias porcinas observándose un aumento en la proporción de polimorfonucleares. Entre otros hallazgos se observa un incremento considerable de los valores absolutos de monocitos/macrófagos, así como la activación de los mismos, en respuesta al estímulo en las primeras 24 horas en comparación al grupo control. Es por ello que se considera que la proteína rHA-H1 en dosis de 50µg genera un estímulo inmunogénico marcado en el modelo porcino.

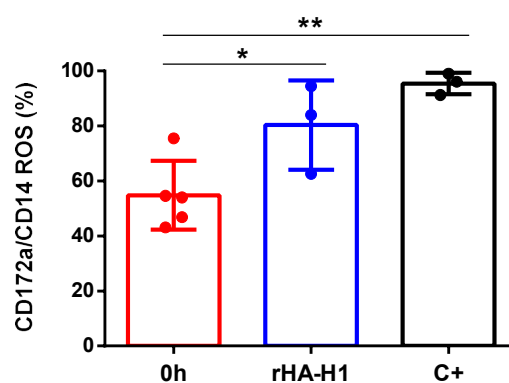


Figura 26. Poblaciones de macrófagos porcinos productores de ROS en los grupos de estudio. Se observa el incremento de la activación celular a las 24 horas post exposición a la proteína rHA-H1. Se observa diferencia estadística entre los grupos estimulados en comparación al grupo control (no estimulado). Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

V. DISCUSIÓN

Esta tesis buscó la identificación, aislamiento y caracterización del genoma completo del virus de Influenza A que circuló en aves silvestres en territorio peruano, en un periodo previo a la emergencia de la forma altamente patogénica. Se tuvo como propósito evaluar cepas circulantes con un enfoque de desarrollo de metodología orientada a la búsqueda de candidatos vacunales.

La búsqueda de candidatos vacunales implica el conocimiento de la diversidad genética de un patógeno en una región. Esta data constituye el punto de partida desde donde se desarrollan estudios genéticos y experimentales con el fin de ir seleccionando proteínas promisorias en la búsqueda de candidatos vacunales propios. En nuestro Laboratorio, si bien se tiene como fin mayor la búsqueda de candidatos vacunales contra el VIA, en el presente estudio se abarcó parte inicial de estos esfuerzos, donde se esperó poder ampliar la información de los distintos subtipos circulantes. Posteriormente, los estudios de caracterización permitieron evaluar los aislados de VIA con la perspectiva de seleccionar subtipos con características particulares relacionadas a esta zona geográfica, como base para el desarrollo de proteínas recombinantes que fueron evaluadas con miras a ser seleccionados como potenciales candidatos vacunales propios. Así mismo, su capacidad inmunogénica fue evaluada mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* permitiendo así, obtener una visión más amplia de las características del virus en nuestro país y que puedan servir a futuro para seleccionar los mejores candidatos e implementando las herramientas metodológicas para su desarrollo en el laboratorio, las cuales podrán ser adaptadas, a su vez, a la investigación de otros patógenos relacionados o de importancia en medicina veterinaria y salud pública.

La primera fase de este trabajo se enmarcó dentro de las actividades de vigilancia activa del Virus de Influenza A que se realizan en el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Nuestro laboratorio ha trabajado en esta línea desde el año 2006 en respuesta a la emergencia del virus de alta patogenicidad en aves domésticas en Chile en el año 2002, producto del contacto de aves silvestres acuáticas con pavos

comerciales (Suarez *et al.*, 2004; Senne, 2007). Este evento evidenció la importancia del monitoreo de las cepas circulantes en nuestro territorio como respaldo de la sanidad animal del Perú, así como, de los países de la región. De esta manera, nuestro laboratorio realiza la vigilancia activa del vIA, aislando y reportando múltiples subtipos presentes en poblaciones aviares silvestres de la costa peruana, y realizando las caracterizaciones genéticas respectivas (Gherzi *et al.*, 2009; Gherzi *et al.*, 2011; Segovia *et al.*, 2013; Nelson *et al.*, 2016).

En esta tesis, se realizaron visitas a 5 áreas naturales costeras ubicadas en el departamento de Lima. Estas áreas corresponden a hábitats de amplia fauna aviar y a la vez, constituyen zonas de descanso para aves migratorias. Durante este periodo se colectaron y evaluaron 421 muestras de heces frescas de aves silvestres en la costa del departamento de Lima como son los Pantanos de Villa, Laguna la Encantada, humedales de Puerto Viejo y la Poza de la Arenilla; estos lugares se consideran estratégicos en cuanto que en ellos se observa confluencia de diversas especies aviares en cada época de migración. Es en estos sitios donde convergen subtipos locales y aquellos que provienen del hemisferio norte en cada época de primavera/verano durante el desplazamiento por la ruta migratoria del Pacífico. Es así que ocurre la exposición de aves locales a subtipos foráneos, promoviendo el intercambio y con ello se incrementa el riesgo de emergencia de distintos subtipos virales de características patogénicas diversas.

Con respecto a las especies aviares, la tesis abarcó el muestreo de aves silvestres pertenecientes principalmente a los órdenes Charadriiformes y Anseriformes, debido a su importancia como reservorios naturales de todos los subtipos ampliamente conocida (van Borm *et al.*, 2012; Afanador-Villamizar *et al.*, 2017). Además, teniendo en cuenta la capacidad del virus de transmitirse fácilmente a otras especies, la toma de muestra consideró la evaluación de otros órdenes aviares que cohabitan en los mismos medios acuáticos y que constituyen parte de la fauna aviar residente. Dentro de otros órdenes de importancia, se encuentran Ciconiiformes, Gaviiformes, Gruiformes, Pelecaniformes, Podicipediformes y Procellariiformes, cuyas especies miembros se han descrito como importantes fuentes de diversos subtipos (Stallknecht y Brown, 2017).

Es así que la mayor parte de las muestras colectadas efectivamente fueron obtenidas de especies aviarias pertenecientes a las Charadriiformes y Anseriformes, representando el 47.5% (200/421) y 7.1% (30/421) de las muestras, respectivamente. El resto de muestras fueron obtenidas de especies acuáticas pertenecientes a los órdenes Pelecaniformes 13.1% (55/421 aves); Suliformes 21.6% (55/421 aves); Gruiformes 9.0% (38/421 aves); y Podicipediformes 0.5% (2/421 aves). Por otro lado, se incluyeron también especies no acuáticas presentes en dichas zonas como Passeriformes 0.5% (2/421 aves) y Cathartiformes 0.7% (3/421 aves) (Cuadro 5).

Así, los resultados de la tesis contribuyen con la información genética descrita propia de la región lo cual busca, en el futuro, lograr una perspectiva amplia respecto a la dinámica de la circulación del virus en aves silvestres de nuestro país, teniendo un enfoque hacia su comportamiento en hospederos residentes principalmente. Es importante resaltar la gran diferencia de información producida a este nivel en la región de Sudamérica en comparación con América del Norte, Europa y Asia. Si bien la información local es limitada, es prioritario incrementar los esfuerzos para obtener mayor información sobre los subtipos circulantes en Sudamérica.

Los 5 aislados del Virus de Influenza A obtenidos en este estudio provinieron de aves silvestres migratorias. Posteriormente, los aislados fueron procesados para su secuenciación y la realización de los análisis genéticos respectivos. Estos resultados permitieron determinar que la metodología empleada desde el muestreo de heces frescas permite la caracterización genómica del virus luego de un proceso de propagación en un sistema vivo como es el aislamiento en huevos embrionados. Previos estudios habían logrado la subtipificación viral sin llegar a la caracterización del genoma completo del agente (Ghera *et al.*, 2009; Ghera *et al.*, 2011; Segovia *et al.*, 2013); por este motivo, esta tesis representa el primer reporte de identificación genómica del virus de influenza A de baja patogenicidad en aves silvestres de nuestro país.

Cabe mencionar que los planes de muestreo fueron alterados dadas las restricciones establecidas en el control de la Enfermedad por Coronavirus de 2019 (COVID-19), durante el periodo 2020-2021, por lo que no fue posible abarcar otras áreas en la costa norte y costa sur del país contempladas en el estudio. Sin embargo, a

pesar de la limitante, se lograron realizar los muestreos en zonas de costa como humedales y playas poseedoras de una importante avifauna.

Con respecto a las muestras porcinas, se colectaron y evaluaron 206 muestras de hisopados nasofaríngeos de porcinos jóvenes provenientes de granjas tecnificadas, semitecnificadas y traspatio. A pesar de realizar metodología de aislamiento en cultivo celular y mediante huevos embrionados SPF, no se obtuvieron resultados exitosos.

Debido a la dificultad en el aislamiento a partir de muestras porcinas, se consideró la ocurrencia de problemas que pudieron afectar los resultados, y estas pueden considerarse multifactoriales. Si bien, los animales seleccionados fueron aquellos que presentaron signos de procesos respiratorios leves a moderados, problemas en la toma de muestra, baja carga viral en las mismas o toma fuera del periodo de eliminación del agente, pudieron afectar la recuperación de virus viable. Por otro lado, es posible, aunque menos probable, que el sistema de aislamiento en cultivo celular MDCK no haya sido la óptima alternativa para su propagación. Si bien estas células constituyen la línea comúnmente utilizada, en algunos casos, procedimientos adicionales de aislamiento viral en otro soporte vivo podrían ofrecer mayor sensibilidad al virus en relación a una posible permisibilidad diferencial descrita en otras líneas celulares e incluso en cultivos primarios (Zhang y Gauger, 2020).

Lamentablemente no contamos con la capacidad de realizar pruebas diagnósticas complementarias en relación a otros agentes causales de enfermedad respiratoria en porcinos. Patógenos importantes se consideran al Circovirus porcino tipo 2 (PCV2), Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), y agentes bacterianos como *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, entre otros, comúnmente descritos como agentes primarios parte del Complejo Respiratorio Porcino (CRP) además del vIP (Dobrescu *et al.*, 2014; Chae, 2016; Hernandez-Garcia *et al.*, 2017). Tanto agentes primarios como secundarios interactúan desarrollándose cuadros infecciosos de coinfección, donde se consideran a PRRSv y vIP como los de detección en mayor frecuencia (Dobrescu *et al.*, 2014). Sin embargo, durante las coinfecciones, la incrementada contaminación bacteriana secundaria sumada a la fuerte respuesta inflamatoria local y la excesiva secreción respiratoria podrían enmascarar y reducir la detección del vIP viable.

Por otro lado, se debe mencionar las causas relacionadas al momento de la toma de muestra debido a que, en el caso del virus de Influenza, el periodo de eliminación viral suele considerarse relativamente corto (6-10 días) en comparación a otros agentes virales (Canini *et al.*, 2020), por lo que una toma de muestra fuera del rango de tiempo puede implicar dificultad en la recuperación de virus viable en muestras tomadas de la mucosa respiratoria. Finalmente, es importante mencionar los problemas a la toma de muestra por la dificultad de acceder a la zona nasofaríngea. Si bien, muchas muestras fueron tomadas por el equipo de investigación, muchas otras muestras fueron tomadas por el personal de los planteles, por lo que no es posible asegurar la adecuada toma de muestra en aquellos animales.

Los resultados observados tras los análisis genéticos permitieron subtipificar los 5 aislados de vIA, determinando que estas pertenecen a los subtipos de baja patogenicidad H6N8, H2N6, H6N2 (2 aislados) y H13N6, provenientes de las especies zarapito trinador (*Numenius phaeopus*), pato silvestre (*Anas platyrhynchos*), gaviota de Franklin (*Leucophaeus pipixcan*), y gaviota dominicana (*Larus dominicanus*), respetivamente. Esta tesis permitió determinar por primera vez en nuestro país los subtipos H2N6, H6N2 y H13N6, mientras que el subtipo restante H6N8 ha sido reportado previamente en un Playero aliblanco (*Tringa semipalmata*) (Nelson *et al.*, 2016), entre otros. El subtipo H6N8 ha sido reportado principalmente en Anseriformes en Norteamérica (patos y gansos silvestres) y en algunas especies de gaviotas como la gaviota reidora (*Leucophaeus atricilla*) y las arenarias como el vuelvepiedras común (*Arenaria interpres*). En el presente estudio, este subtipo fue encontrado en un Zarapito trinador (*Numenius phaeopus*), especie relacionada a las arenarias y a los playeros, manteniendo una permanencia constante en la misma familia de aves silvestres (Familia *Scolopacidae*). Así, la tesis permite identificar por primera vez el subtipo H6N8 en un Zarapito trinador en nuestro país. Estudios similares a este se requieren para analizar el rol que cumplen los diferentes grupos de aves silvestres en la ecología viral de los subtipos circulantes en el Perú.

El análisis genético no solo permitió subtipificar los aislados del virus de Influenza A sino también determinar el origen evolutivo viral, desde cada uno de los segmentos genéticos. Esto se pudo realizar a través de un análisis de cercanía evolutiva entre nuestros aislados y los reportados previamente en otras áreas geográficas,

principalmente enfocado al análisis de las secuencias de hemaglutinina y neuraminidasa.

En el caso del análisis del aislado PE-01 (H6N8) proveniente de la especie zarapito trinador, este presenta el gen de la HA y NA ambas de origen norteamericano. En el caso del aislado PE-02 (H2N6), el análisis filogenético de las secuencias genómicas evidenció que este subtipo corresponde a una recombinación de HA y NA de origen sudamericano, ambos reportados en Chile, con el resto de secuencias de origen norteamericano. Con respecto al aislado PE-04 (H13N6), se observa que la mayoría de segmentos corresponden a un origen similar de cepas reportadas en Minnesota en el 2017. Los cambios de secuencias obedecen a la recombinación del segmento PB1, el cual corresponde a cepas de origen canadiense. Este hallazgo pone en evidencia una mayor conservación o estabilidad en el tiempo de este subtipo. Los análisis de los aislados correspondientes al subtipo H6N2 evidenciaron que el segmento de la NA de PE-03 posee un origen sudamericano mientras que el resto de segmentos poseen un origen norteamericano. En el caso del aislado PE-05, este evidenció que todos sus segmentos corresponden a cepas norteamericanas. Estos hallazgos son un reflejo de los procesos de recombinación que han de tener lugar en territorio sudamericano, donde cepas de origen norteamericano toman contacto con cepas circulantes locales, dando lugar a nuevos subtipos de múltiples características patogénicas. Los hallazgos logrados en el presente estudio ponen en evidencia una reserva genética importante presente en territorio peruano, la cual se caracteriza por singulares eventos de recombinación de subtipos de origen norteamericano y sudamericano, por lo que se resalta que el Perú debe considerarse como un territorio estratégico para el monitoreo de estos eventos de rearrreglo genético viral.

En el análisis de secuencias de aminoácidos, llamaron particularmente la atención las características observadas en el aislado PE-02, subtipo H2N6. En las secuencias de la Hemaglutinina y Neuraminidasa se encontró la mayor acumulación de sustituciones. En el caso de la Hemaglutinina, a lo largo de toda esta secuencia se observaron 21 sustituciones aminoacídicas en relación a la cepa referencial cercana, A/common goldeneye/Michigan/18OS3858/2018(H2N1) (QGT49557.1), significando un 96.2% de identidad con esta. Paralelamente, esta referencia es ancestro común del subtipo H2 A/blackish oystercatcher/Chile/C6534/2016 (H2N2)

(AQY18215.1), con quien el aislado PE-02 comparte una identidad nucleotídica de 94.2%, siendo esta la secuencia más idéntica. De igual manera, en la secuencia de la Neuraminidasa N6 se identificaron 10 sustituciones en relación a su pariente más cercano, A/Meleagris gallopavo/Valparaiso/10_2_10/2017 (H7N6) (MK424190.1), compartiendo un 97.8% de identidad. Cabe mencionar que esta cepa de referencia (H7N6) corresponde a un subtipo aislado en Chile a partir de un brote en pavos domésticos en 2016, cuyo análisis reveló que es una cepa muy relacionada al subtipo causante del primer brote de VIA en Sudamérica ocurrido en Chile el año 2002 (Mathieu *et al.*, 2021), evidenciando cómo este subtipo se mantiene circulante en la región, interactuando con otros virus y que reemergió afectando a la misma especie doméstica.

Así mismo, el aislado PE02 que fue obtenido de un pato silvestre (Mallard) y corresponde al subtipo H2N6, toma una mayor importancia debido a que es un subtipo altamente difundido en el mundo y ha sido aislado de diversas especies aviares silvestres acuáticas y domésticas. Estudios a nivel filogenético en vIA H2 han determinado la clasificación de los linajes norteamericano y euroasiático, con evidencia de intercambios intercontinentales (Beau Reneer y Ross, 2019). Siendo un subtipo de baja patogenicidad, el ingreso a granjas podría generar enfermedad moderada con baja mortalidad, significando grandes pérdidas económicas.

Teniendo en cuenta que se mantiene circulando activamente en las especies aviares silvestres, el subtipo H2 es considerado de gran preocupación para la salud pública, ya que podría transmitirse directamente o a través de brotes en aves domésticas infectadas. Es importante mencionar que el subtipo H2 fue causante de la pandemia de 1957 (H2N2), emergiendo producto de la recombinación de virus aviares y humanos, y ocasionando alta mortalidad en los humanos. Posteriormente, a fines de los 60s el subtipo H3N2 emergió como un virus predominante en las poblaciones humanas, desplazando al subtipo H2N2. Desde esta perspectiva, una posible emergencia de un virus subtipo H2 en humanos causa preocupación en la comunidad científica debido a que se considera como una población libre de inmunidad contra este subtipo por más de 40 años. De esta manera se piensa que el subtipo H2 ha de ser potencial causante de la siguiente pandemia (Ryu 2017; Beau Reneer y Ross, 2019), por lo que su atención ha tomado prioridad.

En el caso del aislado PE02, interesantemente, se puede apreciar que los segmentos corresponden a diversos subtipos de diferente origen, tanto de cepas norteamericanas como cepas sudamericanas. Así se puede apreciar que este es el aislado que ha evidenciado mayores interacciones e intercambios con múltiples subtipos, que puede considerarse como producto de una serie de reordenamientos acumulados en diferentes tiempos. Es en este punto que la limitada información recabada en la región de Sudamérica limita el mayor análisis sobre la evolución de este aislado dadas las características descritas.

El presente estudio obtuvo 3 aislados del subtipo H6 (PE01, PE03 y PE05). Cabe mencionar que el subtipo H6 del vIA es considerado el más detectado en aves silvestres, aunque principalmente en especies Anseriformes como patos silvestres, además de aves domésticas (Lin *et al.*, 2020). Sin embargo, en nuestro trabajo se aislaron estos subtipos provenientes de especies miembro del orden Charadriiformes (Zarapito trinador y gaviotas de Franklin), lo cual puede evidenciar cambios importantes producto de la adaptación y el potencial rol de estas especies en la diseminación viral. En aves silvestres, el subtipo H6 presenta una distribución global y puede infectar a una gran cantidad de especies que incluyen aves y mamíferos (Everest *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2023). Estudios evidencian la capacidad de infectar mamíferos como ratones y hurones causando enfermedad sin requerir adaptación previa. Así mismo, ha sido detectado en porcinos en China en 2010, así como una detección en humano en Taiwan en 2013 (Wang *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2023). Si bien es un virus de IABP este se considera relacionado a procesos de recombinación en los que ha transferido genes importantes siendo considerado precursor del brote H5N1 humano de Hong Kong de 1997; de esta manera, cepas H6 son consideradas como donadoras de genes internos para los subtipos H5 y H9N2 de vIA y se mantienen circulando en países asiáticos mediante la migración de aves silvestres y el comercio avícola tradicional. Sin embargo, se ha determinado la evidencia de intercambios intercontinentales, donde se observan intercambios de genes entre cepas euroasiáticas y norteamericanas (Hu *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2020). Ciertas formas H6 han demostrado tener capacidad de reconocer y unirse a los receptores de ácido siálico α 2,3, pero manteniendo su alta afinidad por los de tipo α 2,6 (Wang *et al.*, 2014). Por

esto, el subtipo H6 es considerado de riesgo para la salud pública y se describe como un subtipo de prioridad en las investigaciones sobre Influenza A.

En el continente americano, si bien en los Estados Unidos se ha detectado la presencia de todos los subtipos H6, en la región de Sudamérica se han detectado los subtipos H6N2 y H6N8 en diferentes países. Con respecto a H6N2, esta ha sido ampliamente detectado en los Estados Unidos desde la década de los 80s, mientras que en México, Argentina y Chile los hallazgos han sido más recientes. Por otro lado, el subtipo H6N8 ha permanecido circulando desde 1977 en los Estados Unidos, siendo recientemente detectado en Chile, Argentina y Perú entre los años 2016 y 2021 (Everest *et al.*, 2020). Sin embargo, esta información es muy limitada para conocer mayores detalles del potencial evolutivo de los virus H6 en Sudamérica.

En el estudio se detectó el aislado PE 04 que corresponde al subtipo H13N6, un subtipo infrecuente. Los H13 han emergido con menor frecuencia en comparación con los otros subtipos. Fue aislado por primera vez en gaviotas en Norte América en 1977. Desde entonces otros aislados H13 han sido reportados globalmente casi exclusivamente en gaviotas y gaviotines o charranes, y rara vez en otras especies, y no ha sido reportado en aves domésticas (Sun *et al.*, 2023). En el presente estudio este subtipo fue aislado de una Gaviota dominicana (*Larus dominicanus*), coincidiendo con esta descripción. Por otro lado, existen reportes de su aislamiento en patos silvestres (Wang *et al.*, 2018) y ballenas, siendo estas últimas afectadas por subtipos muy relacionados a cepas H13 circulantes en gaviotas (Wallensten, 2007; Fereidouni *et al.*, 2016). Estudios experimentales evidenciaron la capacidad de algunos virus H13 de infectar pollos jóvenes y de adaptarse al cultivo en células de fibroblasto de pollo, pero producir títulos bajos en cultivos celulares primarios humanos (Sun *et al.*, 2023).

Debido a la presencia de nuevos subtipos reportados de características propias, así como la presencia de una amplia acumulación de sustituciones aminoacídicas, además de la presencia de subtipos considerados de prioridad para la salud pública y la salud animal, el presente estudio constituye una muestra que pone en evidencia un gran reservorio genético existente en nuestro territorio y que le otorga a Perú importancia geográfica y ecológica para la generación de nuevos subtipos de diversa capacidad patogénica. Esta situación es la que se considera como un escenario de

potencial riesgo de emergencia de subtipos de impacto para la salud animal y la salud pública, y al considerarse al Perú como un lugar estratégico para la ocurrencia de estos eventos, debe considerarse como estratégico para el desarrollo de actividades de vigilancia genómica viral.

Desde esta perspectiva, se reitera la figura de cómo en Sudamérica están ocurriendo procesos de cambio genético propios, asociados a una gran variedad de especies hospederas locales, que adicionarán factores de selección por presión inmune del hospedero. Para entender la transmisión y evolución global del VIA es necesaria la existencia de amplia información proveniente de todas las regiones del mundo. Sin embargo, hoy en día el mayor conocimiento sobre el Virus de Influenza proviene de estudios de vigilancia llevados a cabo principalmente en el hemisferio norte, mientras la información recopilada y publicada en el hemisferio sur es aún considerada muy limitada (Hill y Runstadler, 2016). Es por ello que se resalta la importancia de plantear el establecimiento sostenible de los programas de monitoreo y vigilancia genómica de cepas circulantes del Virus de Influenza aviar y porcino en el Perú, desde una perspectiva más integral y bajo el enfoque de Una Salud, ya que los diferentes subtipos de diferente origen pueden estar interactuando en una zona geográfica establecida donde confluyan aves, porcinos y humanos. Así mismo, las acumulaciones de cambios pueden asociarse a los diversos procesos de adaptación del virus en nuevos hospederos aviares producto del contacto de aves migratorias y residentes. El conocimiento de las cepas circulantes en nuestro territorio, así como en el resto de Sudamérica permitirán tener la herramienta para poder predecir potenciales subtipos de diversa capacidad patogénica en la región sur del continente.

Dadas las características halladas en el aislado PE-02 (H2N6) a nivel de la proteína HA ([OL355026.1](#)), así como la importancia de este subtipo en la epidemiología global y su potencial impacto para la salud aviar y la salud humana, se eligió esta secuencia para su evaluación como un potencial candidato vacunal de un subtipo H2 local, procediéndose al desarrollo de la metodología de elaboración de proteína recombinante descrita previamente. Con respecto al vIP, debido a que las muestras porcinas resultaron negativas en la detección y aislamiento viral, se decidió hacer una revisión de secuencias de HA ya publicados y disponibles en GenBank a fin de realizar los experimentos con una secuencia altamente distribuida en diferentes regiones. Se

eligió la secuencia HA del virus H1N1 A/swine/Shandong/1207/2016 ([MN416643.1](#)) (Sun *et al.*, 2020), correspondiente a una cepa muy relacionada al virus pandémico H1N1 del año 2009 (pdm/09), causante de múltiples muertes tras su emergencia en humanos. El virus seleccionado es un subtipo H1 genotipo 4 (G4), producto del reordenamiento de virus de linaje euroasiático (EA), virus pdm/09 y reordenamiento triple norteamericano (TR), siendo predominante en poblaciones porcinas desde 2016 (Sun *et al.*, 2020; Meng *et al.*, 2022). Ha evidenciado capacidad de unirse a receptores humanos y producir alta carga viral en células epiteliales respiratorias humanas. Así mismo, se ha identificado seropositividad en trabajadores del sector porcino en China y países asiáticos (Sun *et al.*, 2020). Estas características evidencian la capacidad infectiva y de adaptación de este virus en humanos, lo que incrementa la preocupación de la posible emergencia de un virus pandémico.

Las vacunas comerciales actuales se basan en virus inactivado, virus vivo atenuado y otras tecnologías. La propagación en huevos embrionados SPF ha sido muy utilizada para la elaboración de la mayoría de vacunas comerciales dirigidas a humanos. A partir de los viriones cosechados del fluido alantoideo se producen vacunas inactivadas, de virus completo o subunidades vacunales. Si bien este sistema se ha utilizado por más de 50 años, presenta muchas limitantes, principalmente relacionadas a las altas demandas de vacunas en la actualidad. Además, las vacunas suelen actualizarse frecuentemente para coincidir con las características antigénicas de los virus de campo (Cox y Hashimoto, 2011; Kang *et al.*, 2012). Es por ello que tecnologías modernas recombinantes han surgido para generar vacunas a mayores escalas y que son, sobre todo, de menor riesgo al estar dirigidos en la fabricación de proteína o proteínas específicas del agente, sin necesidad de la realización de cultivos virales (Kang *et al.*, 2012).

El uso de vectores virales, como el sistema vector de expresión de Baculovirus (BEVS, *Baculovirus Expression Vector System*) para la producción de proteínas, han evolucionado como una herramienta versátil y segura. El sistema Baculovirus/células de insecto ha demostrado su alta eficiencia como vector viral para la expresión de genes foráneos, muy utilizado en el desarrollo de vacunas (Prabakaran y Kwang, 2014). Es así que en el presente estudio se utilizó este sistema para la elaboración de las proteínas HA recombinantes. Para este objetivo se utilizó el sistema de Baculovirus

comercial ProFold™-ER1, cuyo genoma linearizado de Baculovirus ha incluido secuencias que promueven la síntesis de las moléculas chaperonas, calreticulina y disulfuro isomerasas, las cuales tienen un rol primordial en el plegamiento de las proteínas en el retículo endoplasmático de células eucariotas (Hong *et al.*, 2022). La expresión paralela de estas chaperonas incrementa la proporción de proteínas producidas (en el sitio MCS) con adecuado plegamiento en un sistema celular de insecto. Por lo tanto, este sistema nos permite obtener una gran producción de proteína de interés, altamente pura, de adecuada conformación estructural e inocua, apta para el desarrollo aplicado de evaluación de su capacidad inmunogénica en estudio *in vitro* e *in vivo*. La producción de las proteínas pudo corroborarse mediante Western blot, así como por citometría de flujo. La primera nos permitió visualizar la elaboración final de un solo producto en el peso esperado, mientras que, por citometría de flujo se logró corroborar el proceso de producción identificando a las células de insecto *Sf9* productoras de la proteína que fueron reconocidas con un fluoróforo Anti His Tag (Fig. 16). De esta manera se obtuvo una alta concentración de proteína producida (mayores a los 600 ng/μL) que permitieron realizar los diferentes ensayos necesarios.

Con respecto al proceso de producción de proteína recombinante en los cultivos *Sf9*, era necesario poder determinar el tiempo ideal para la realización de las cosechas con el fin de obtener una buena cantidad de proteína de buena calidad. Para ello, se requirió de lograr la adaptación del cultivo a las condiciones del Laboratorio, evaluar la infección mediante Baculovirus y determinar el tiempo adecuado de incubación para lograr niveles altos de proteína recombinante, evitando la degradación del cultivo en perjuicio de las proteínas. Diversos estudios realizados bajo el mismo sistema señalan diferentes tiempos de incubación, siendo estos desde 50 horas hasta 6 días p.i. (Margine *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2019). Sin embargo, en el presente estudio el tiempo de cosecha fue definido en función a la observación de efecto citopático en los cultivos y a la medición de la expresión o producción de la proteína por parte de las células *Sf9* mediante citometría de flujo. Estas células fueron fácilmente reconocidas por el anticuerpo monoclonal fluorescente anti His-Tag utilizado. De esta manera se pudieron apreciar imágenes como las presentadas en la figura 16, donde las células *Sf9* mostraron la fluorescencia positiva. Estas detecciones fueron incrementándose a mayor tiempo de incubación, donde la mayor proporción de

células productoras se determinó entre las 48 y 72 horas. El efecto citopático se observó desde las 48 horas p.i., considerándose leve a moderado hasta las 60 horas (observación de agrandamiento celular, leve cantidad de células picnóticas y leve cantidad de células desprendidas de la monocapa). Finalmente, en la evaluación por Western blot, se observó degradación de proteína cuando los cultivos superaron las 60 horas de incubación. De esta manera se determinó el tiempo adecuado de cosecha de 55 a 60 horas p.i.

Para evaluar a las proteínas recombinantes se realizaron los primeros análisis de respuesta de inmunidad innata, asociado a las primeras respuestas inespecíficas producidas en el organismo ante la exposición. Es así que se practicaron ensayos *in vivo*, donde se realizó la inoculación de dosis de proteína recombinante por vía intraperitoneal en cada modelo animal, para posteriormente evaluar la respuesta inflamatoria en función a la migración de células inmunológicas, la proporción de las subpoblaciones leucocitarias y, la activación celular en función a la respuesta de la subpoblación de monocitos/macrófagos en ambos modelos animales.

Los macrófagos constituyen parte de la primera línea de defensa del organismo contra las infecciones. Conforman un grupo de células que se encuentra presente en la mayoría de tejidos con el objetivo de detectar, fagocitar y destruir rápidamente a microorganismos y sustancias extrañas que han ingresado al organismo. A nivel de circulación, los monocitos migran a los tejidos afectados donde se diferencian en macrófagos. Como células efectoras su función es primordial en la homeostasis de los sistemas, en la inmunidad innata y adquirida y en los procesos de inflamación (Kaspers y Kaiser, 2013). Por otro lado, los neutrófilos y, su contraparte aviar, los heterófilos también constituyen parte de la primera línea de defensa celular contra agentes infecciosos. Presentes en el torrente sanguíneo, se desplazan a las zonas afectadas donde su función corresponde a la detección y destrucción de agentes microbianos que ingresan al organismo (Genovese *et al.*, 2013; Juul-Madsen *et al.*, 2013), y cuya acción puede ser evaluada mediante diferentes vías.

De esta manera en el presente estudio se abarcó un primer análisis de la capacidad inmunogénica de ambas proteínas recombinantes mediante la evaluación de los cambios en las poblaciones leucocitarias en ambos modelos animales,

principalmente en relación a los grupos de macrófagos. Se practicaron ensayos *in vivo*, donde las proteínas fueron inoculadas en cavidad peritoneal con el fin de poder evaluar los cambios en las poblaciones leucocitarias a partir del abordaje a una zona de fácil acceso para la inoculación de las proteínas producidas tanto como para la colección posterior mediante lavados con PBS.

En los ensayos *in vivo* aviares, se inocularon concentraciones de 5 y 20 µg de proteína rHA-H2 en pollos de carne de 3 semanas de edad aparentemente sanos. A las 24 horas se practicaron los lavados peritoneales para colectar las células totales presentes en la cavidad peritoneal. Los resultados de cuantificación permitieron observar un incremento en los valores absolutos de leucocitos presentes en cavidad abdominal, así como un incremento en el cálculo de concentración celular en ambos grupos tratados (Fig. 19). Similar resultado se desarrolló en los porcinos, evaluando únicamente la dosis de 50 µg de proteína rHA-H1. La proteína exógena generó una masiva infiltración leucocitaria a las 24 horas post inoculación, marcada por una subpoblación neutrofílica predominante.

Como control positivo se utilizó una bacteria *E. coli* patogénica inactivada por calor (heat-killed), la cual evidenció un gran incremento en la migración celular. En este punto es importante resaltar la presencia del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de bacteriana, el cual constituye un potente inductor inflamatorio que estimula fuertemente a la migración de neutrófilos y macrófagos hacia la zona afectada (Genovese *et al.*, 2013; French *et al.*, 2020). Este fuerte estímulo se observó en la gran diferencia de los valores hallados entre el grupo control y los grupos tratados en ambos modelos animales, predominando los polimorfonucleares. A la vez, los resultados permitieron visualizar un incremento de las poblaciones de monocitos/macrófagos, en menor proporción que los neutrófilos/heterófilos a las 24 horas p.i.

En el caso de las aves, se observó una tendencia elevada en el conteo de leucocitos a las 24 horas post inoculación de 5 y 20 µg de proteína recombinante, comparado con el control negativo. Sin embargo, esta elevación fue significativa en la inoculación de 20 µg. Al realizar el análisis de subpoblaciones se observó un marcado incremento de la proporción de heterófilos en los grupos tratados, lo cual corresponde a la gran movilización de estas células tras las primeras 24 horas del estímulo.

Paralelamente, se resalta el leve incremento de los valores absolutos de monocitos/macrófagos de los grupos tratados en relación al control negativo, que contrasta con la reducción en su proporción con respecto a la presencia incrementada de heterófilos. Este hallazgo se asocia a la diferencia natural en la tasa de infiltración de monocitos y heterófilos ante un estímulo antigénico, donde los monocitos son reclutados desde la vía sanguínea en una proporción menor y ritmo mucho más lento que los polimorfonucleares (French *et al.*, 2020). Por otro lado, el estímulo de los monocitos/macrófagos inició mecanismos de respuesta de activación, por ejemplo, por incremento del estrés oxidativo, por lo que el reconocimiento de la producción de ROS constituye un marcador de la inducción de la respuesta inflamatoria (Kaspers y Kaiser, 2013; More Bayona *et al.*, 2017). De esta manera, se observó un incremento marcado de la proporción de células activadas en los grupos tratados. Por lo tanto, se consideró la potencial capacidad de estimulación de los fagocitos por reconocimiento de la proteína viral rHA-H2.

En el ensayo *in vivo* porcino, similar a lo observado en las aves, se encontró un marcado incremento de leucocitos infiltrados en la cavidad abdominal, con una mayor proporción de neutrófilos presentes, mucho mayor a lo observado en su contraparte aviar. La proporción de neutrófilos en el grupo tratado y control positivo fue mucho mayor a la de monocitos/macrófagos, sin embargo, al análisis en valores absolutos evidenció el incremento de esta población también. Adicionalmente, en el análisis de activación de monocitos/macrófagos se observó el incremento en la estimulación en el grupo tratado y grupo control positivo. Por lo tanto, se observó la potencial inmunogenicidad de la proteína rHA-H1 dado el marcado incremento en la respuesta inflamatoria por identificación de células productoras de ROS.

Paralelamente, se desarrolló un ensayo *in vitro* para la evaluación de los leucocitos porcinos, los cuales fueron colectados y cuantificados, a fin de ser directamente expuestos a diferentes dosis de proteína rHA-H1 en el Laboratorio. En este ensayo se evaluó la respuesta de activación en las poblaciones de monocitos/macrófagos porcinos expuestas a 0.05, 0.25, 1.0, 5.0, 20.0 µg de la proteína rHA-H1. Los resultados en esta fase demostraron la alta estimulación lograda en los macrófagos porcinos, donde se obtuvieron niveles de activación celular (evidenciada por la producción de ROS) similares en todas las concentraciones de proteína

utilizadas. Es así que los resultados presentados demostraron la estimulación de la respuesta innata temprana por parte de la proteína rHA-H1. Cabe mencionar que, en condiciones normales, la recuperación de leucocitos peritoneales en el caso de mamíferos (porcinos) es óptima, en vista que existe mayor presencia de monocitos y macrófagos circulantes y locales, respectivamente. Esto dista de la contraparte aviar, donde este componente celular es muy reducido. Es por ello que el análisis *in vitro* solo pudo desarrollarse en el modelo porcino.

Con estos resultados se propone que las proteínas rHA-H2 y rHA-H1 sean consideradas aptas para continuar con la evaluación de su inmunogenicidad y así, su potencial uso como candidatas vacunales. De esta manera, se requiere de continuidad de los análisis a niveles más profundos de la medición de la capacidad inmunogénica, recurriendo al uso de diferentes marcadores celulares asociados a la respuesta inmune innata como activación de vías de señalización intracelular, en conjunto con el estudio de expresión de factores proinflamatorios como son citoquinas y quimiocinas en respuesta a la activación de las subpoblaciones de células polimorfonucleares y monocitos/macrófagos, considerando adicionalmente el incremento en los tiempos de evaluación y ampliando las dosis utilizadas. Los estudios de respuesta de la inmunidad innata son considerados cruciales para el desarrollo de una vacuna, sin embargo, estas metodologías deben ser adecuadamente implementadas en nuestro medio con el fin de complementar las evaluaciones de eficacia vacunal que se desarrollan en medicina veterinaria, los cuales generalmente se basan en análisis de respuesta serológica.

Finalmente, la presente tesis establece la implementación de una plataforma que permite la producción de proteínas recombinantes en función a la evaluación de antígenos de interés, enlazado con un sistema de evaluación inmunológica para analizar y cuantificar la capacidad de estimular la respuesta inmune innata en las poblaciones de neutrófilos y macrófagos aviares y porcinos. Estas herramientas permitirán no solo el desarrollo de las investigaciones relacionadas al virus de Influenza A, sino también adecuarlas a otros patógenos de relevancia en la salud animal y la salud pública.

VI. CONCLUSIONES

Como conclusiones, el presente estudio planteó lo siguiente:

- Se lograron identificar 4 subtipos del virus de Influenza aviar H6N8, H2N6, H6N2 y H13N6. Siendo 3 subtipos reportados por primera vez en el Perú. Estos hallazgos evidencian la variabilidad de subtipos del virus descrita en diferentes especies de aves silvestres costeras en el Perú.
- Los VIA en Perú poseen una fuente genética principalmente de virus de origen norteamericano, con una menor fuente genética regional. Esto evidencia que Perú representa una zona geográfica y ecológica potencial de reordenamiento génico de los virus de Influenza A y generación de nuevos subtipos de diversa capacidad patogénica.
- Las proteínas recombinantes diseñadas de la hemaglutinina de los Virus de Influenza A H2N6 aviar y H1N1 porcino generaron una respuesta inmunogénica a corto plazo que fue evaluada, detectada y cuantificada mediante ensayos funcionales celulares, conocimiento que es limitado en la preparación de vacunas comerciales.
- Los resultados evidenciaron que las proteínas recombinantes desarrolladas constituyen potenciales candidatas vacunales frente al virus de Influenza A en ambos modelos animales.

VII. RECOMENDACIONES

Dados los alcances de este estudio, y acorde a los resultados obtenidos, se plantearon como recomendaciones posteriores las siguientes:

- Con respecto a la vigilancia, es importante mantener un sistema de monitoreo sostenible que permitan llevar a cabo estudios estables en los diferentes periodos. De esta manera se podrá alimentar de manera adecuada una base de datos genómicos importante para el país, la región y el mundo. En relación a las aves silvestres, este monitoreo deberá abarcar diversos órdenes aviares más allá de los Anseriformes y Charadriiformes, mientras que, desde la perspectiva de la avicultura, deberá considerar la inclusión de aves Columbiformes y Passeriformes, que abarca aquellas especies que suelen hallarse a los alrededores de las granjas avícolas como son las palomas, cuculíes, tórtola, gorriones, etc. Por otro lado, se podrían ampliar los tipos de muestras involucrando capturas, hisopados de vías respiratorias de aves contenidas o muertas encontradas en locaciones de interés.
- Se requiere de estudios para dar continuidad con las evaluaciones de inmunogenicidad de las proteínas elaboradas en relación a la respuesta inmune innata y adaptativa a fin de evaluar la respuesta protectora a largo plazo en pollos de carne y porcinos. Como siguientes pasos se requiere de la realización de análisis de expresión de genes de la respuesta inmune innata como son las interleucinas IL1, IL2, IL6, así como otros factores de respuesta como TNF α e IFN-I, para complementar las evaluaciones, así como el diseño de un estudio serológico basado en estas proteínas recombinantes.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelwhab EM, Abdel-Moneim AS. 2019.** Orthomyxoviruses. In: Recent Advances in Animal Virology. Springer Nature Singapore Pte Ltd. p. 351–378. doi: 10.1007/978-981-13-9073-9_19.
- Abdelwhab EM, Veits J, Ulrich R, Kasbohm E, Teifke JP, Mettenleiter TC. 2016.** Composition of the Hemagglutinin Polybasic Proteolytic Cleavage Motif Mediates Variable Virulence of H7N7 Avian Influenza Viruses. *Sci Rep.* 6:1–14. doi:10.1038/srep39505.
- Afanador-Villamizar A, Gomez-Romero C, Diaz A, Ruiz-Saenz J. 2017.** Avian influenza in Latin America: A systematic review of serological and molecular studies from 2000-2015. *PLoS One.* 12(6):1–21. doi:10.1371/journal.pone.0179573.
- Aganovic A. 2023.** pH-dependent endocytosis mechanisms for influenza A and SARS-coronavirus. *Front Microbiol.* 14(May):1–10. doi:10.3389/fmicb.2023.1190463.
- Agüero M, Monne I, Sánchez A, Zecchin B, Fusaro A, Ruano MJ, del Valle Arrojo M, Fernández-Antonio R, Souto AM, Tordable P, et al., 2023.** Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus infection in farmed minks, Spain, October 2022. *Eurosurveillance.* 28(3). doi:10.2807/1560-7917.es.2023.28.3.2300001.
- Álvarez B, Gómez N, José Garrido J, Yerle M, Revilla C, Chamorro S, Alonso F, Domínguez J, Ezquerro A. 2007.** Molecular cloning characterization and expression of porcine immunoreceptor SIRP α . *Dev Comp Immunol.* 31(3):307–318. doi:10.1016/j.dci.2006.06.001.
- Álvarez B, Revilla C, Poderoso T, Ezquerro A, Domínguez J. 2023.** Porcine Macrophage Markers and Populations: An Update. *Cells.* 12(16). doi:10.3390/cells12162103.
- Arai Y, Ibrahim MS, Elgendy EM, Daidoji T, Ono T, Suzuki Y, Nakaya T, Matsumoto K, Watanabe Y. 2018.** Genetic Compatibility of Reassortants between Avian H5N1 and H9N2 Influenza Viruses with Higher Pathogenicity in Mammals. *J Virol.* 93(4):1–17. doi:10.1128/jvi.01969-18.
- Baudon E, Peyre M, Peiris M, Cowling BJ. 2017.** Epidemiological features of influenza circulation in swine populations: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 12(6):1–25. doi:10.1371/journal.pone.0179044.
- Beau Reneer Z, Ross TM. 2019.** H2 influenza viruses: Designing vaccines against future H2 pandemics. *Biochem Soc Trans.* 47(1):251–264. doi:10.1042/BST20180602.
- Bevins SN, Shriner SA, Cumbee JC, Dilione KE, Douglass KE, Ellis JW, Killian ML, Torchetti MK, Lenocho JB. 2022.** Intercontinental Movement of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Clade 2.3.4.4 Virus to the United States, 2021. *Emerg Infect Dis.* 28(5):1006–1011. doi:10.3201/eid2805.220318.
- Biswas SK, Boutz PL, Nayak DP. 1998.** Influenza Virus Nucleoprotein Interacts with Influenza Virus Polymerase Proteins. *J Virol.* 72(7):5493–5501. doi:10.1128/jvi.72.7.5493-5501.1998.
- Blagodatski A, Trutneva K, Glazova O, Mityaeva O, Shevkova L, Kegeles E, Onyanov N, Fede K, Maznina A, Khavina E, et al., 2021.** Avian influenza in wild birds and poultry: Dissemination pathways, monitoring methods, and virus ecology. *Pathogens.* 10(5):1–23. doi:10.3390/pathogens10050630.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 30(15):2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.

van Borm S, Rosseel T, Vangeluwe D, Vandenbussche F, van den Berg T, Lambrecht B. 2012. Phylogeographic analysis of avian influenza viruses isolated from Charadriiformes in Belgium confirms intercontinental reassortment in gulls. *Arch Virol*. 157(8):1509–1522. doi:10.1007/s00705-012-1323-x.

Bui CHT, Kuok DIT, Yeung HW, Ng KC, Chu DKW, Webby RJ, Nicholls JM, Peiris JSM, Hui KPY, Chan MCW. 2021. Risk assessment for highly pathogenic avian influenza A(H5N6/H5N8) Clade 2.3.4.4 Viruses. *Emerg Infect Dis*. 27(10):2619–2627. doi:10.3201/eid2710.210297.

Callupe Leyva JA. 2022. Prevalencia de anticuerpos contra el virus de Influenza tipo A en aves reproductoras del departamento de Lima [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/20362>.

Canini L, Holzer B, Morgan S, Hemmink JD, Clark B, Woolhouse MEJ, Tchilian E, Charleston B. 2020. Timelines of infection and transmission dynamics of H1N1pdm09 in swine. *PLoS Pathog*. 16(7):1–20. doi:10.1371/journal.ppat.1008628.

Castro-Sanguinetti GR, González-Veliz R, Callupe-Leyva A, Apaza-Chiara AP, Jara J, Silva W, Icochea E, More-Bayona JA. 2024. Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 clade 2.3.4.4b from Peru forms a monophyletic group with Chilean isolates in South America. *Sci Rep*. 14(1):3635. doi:10.1038/s41598-024-54072-2.

Chae C. 2016. Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet J*. 212:1–6. doi:10.1016/j.tvjl.2015.10.030.

Chauhan RP, Gordon ML. 2022. Review of genome sequencing technologies in molecular characterization of influenza A viruses in swine. *J Vet Diagnostic Investig*. 34(2):177–189. doi:10.1177/10406387211068023.

Chen BJ, Leser GP, Morita E, Lamb RA. 2007. Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase, but Not the Matrix Protein, Are Required for Assembly and Budding of Plasmid-Derived Virus-Like Particles. *J Virol*. 81(13):7111–7123. doi:10.1128/jvi.00361-07.

Cho A, Wrammert J. 2016. Implications of broadly neutralizing antibodies in the development of a universal influenza vaccine. *Curr Opin Virol*. 17:110–115. doi:10.1016/j.coviro.2016.03.002.

Chu Y, Dietert RR. 1988. The chicken macrophage response to carbohydrate-based irritants: Temporal changes in peritoneal cell populations. *Dev Comp Immunol*. 12(1):109–119. doi:10.1016/0145-305X(88)90029-8.

Chua T-H, Leung CYH, Fang HE, Chow C-K, Ma S-K, Sia S-F, Ng IHY, Fenwick SG, James CM, Chua S Bin, et al., 2010. Evaluation of a Subunit H5 Vaccine and an Inactivated H5N2 Avian Influenza Marker Vaccine in Ducks Challenged with Vietnamese H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus. *Influenza Res Treat*. 2010:1–10. doi:10.1155/2010/489213.

Cline TD, Karlsson EA, Seufzer BJ, Schultz-Cherry S. 2013. The Hemagglutinin Protein of Highly Pathogenic H5N1 Influenza Viruses Overcomes an Early Block in the Replication Cycle to Promote

Productive Replication in Macrophages. *J Virol.* 87(3):1411–1419. doi:10.1128/jvi.02682-12.

Cox MMJ, Hashimoto Y. 2011. A fast track influenza virus vaccine produced in insect cells. *J Invertebr Pathol.* 107:S31–S41. doi:10.1016/j.jip.2011.05.003.

Crisci E, Mussá T, Fraile L, Montoya M. 2013. Review: Influenza virus in pigs. *Mol Immunol.* 55:200–211. doi:10.1016/j.molimm.2013.02.008.

Dadonaite B, Gilbertson B, Knight ML, Trifkovic S, Rockman S, Laederach A, Brown LE, Fodor E, Bauer DLV. 2019. The structure of the influenza A virus genome. *Nat Microbiol.* 4(11):1781–1789. doi:10.1038/s41564-019-0513-7.

Das SR, Puigbo P, Hensley SE, Hurt DE, Bennink JR, Yewdell JW. 2010. Glycosylation focuses sequence variation in the influenza A virus H1 hemagglutinin globular domain. *PLoS Pathog.* 6(11):1–13. doi:10.1371/journal.ppat.1001211.

Dey P, Ahuja A, Panwar J, Choudhary P, Rani S, Kaur M, Sharma A, Kaur J, Yadav AK, Sood V, et al., 2023. Immune Control of Avian Influenza Virus Infection and Its Vaccine Development. *Vaccines.* 11(3). doi:10.3390/vaccines11030593.

Dietert RR, Golemboski KA. 1998. Avian Macrophage Metabolism. *Poult Sci.* 77:990–997. doi:10.1093/ps/77.7.990.

Dobrescu I, Levast B, Lai K, Delgado-Ortega M, Walker S, Banman S, Townsend H, Simon G, Zhou Y, Gerdts V, et al., 2014. In vitro and ex vivo analyses of co-infections with swine influenza and porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Vet Microbiol.* 169:18–32. doi:10.1016/j.vetmic.2013.11.037.

Dou D, Revol R, Østbye H, Wang H, Daniels R. 2018. Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Front Immunol.* 9(1581). doi:10.3389/fimmu.2018.01581.

Dugan HL, Henry C, Wilson PC. 2020. Aging and influenza vaccine-induced immunity. *Cell Immunol.* 348:103998. doi:10.1016/j.cellimm.2019.103998.

Elton D, Simpson-Holley M, Archer K, Medcalf L, Hallam R, McCauley J, Digard P. 2001. Interaction of the Influenza Virus Nucleoprotein with the Cellular CRM1-Mediated Nuclear Export Pathway. *J Virol.* 75(1):408–419. doi:10.1128/jvi.75.1.408-419.2001.

Everest H, Hill SC, Daines R, Sealy JE, James J, Hansen R, Iqbal M. 2020. The Evolution, Spread and Global Threat of H6Nx Avian Influenza Viruses. *Viruses.* 12(6). doi:10.3390/v12060673.

Ewing B, Green P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8(3):186–194. doi:10.1101/gr.8.3.186.

Ezquerro A, Revilla C, Alvarez B, Pérez C, Alonso F, Domínguez J. 2009. Porcine myelomonocytic markers and cell populations. *Dev Comp Immunol.* 33(3):284–298. doi:10.1016/j.dci.2008.06.002.

Fairbairn L, Kapetanovic R, Beraldi D, Sester DP, Tuggle CK, Archibald AL, Hume DA. 2013. Comparative Analysis of Monocyte Subsets in the Pig. *J Immunol.* 190(12):6389–6396. doi:10.4049/jimmunol.1300365.

Fellah JS, Jaffredo T, Nagy N, Dunon D. 2013. Development of the Avian Immune System. In: *Avian Immunology: Second edition.* Elsevier Inc. p. 45–63. doi: 10.1016/B978-0-12-396965-

1.00003-0.

Fereidouni S, Munoz O, Von Dobschuetz S, De Nardi M. 2016. Influenza virus infection of marine mammals. *Ecohealth*. 13:161–170. doi:10.1007/s10393-014-0968-1.

Flores Lava L, Jurado Pucllas J, Navarro Mamani D, Gonzales-Gustavson E, Gavidia Chucán C, González Véliz R, Icochea D'Arrigo E, More-Bayona JA, Rivera Gerónimo H, Ramírez Velásquez M. 2023. Frequency of antibodies against Influenza A virus in well-managed pig farms with a history of respiratory clinical signs in the regions of Lima, Ica and Arequipa. *Rev Investig Vet del Peru*. 34(1):1–9. doi:10.15381/rivep.v34i1.24610.

French CE, Sales MA, Rochell SJ, Rodriguez A, Erf GF. 2020. Local and systemic inflammatory responses to lipopolysaccharide in broilers: new insights using a two-window approach. *Poult Sci*. 99(12):6593–6605. doi:10.1016/j.psj.2020.09.078.

Ge J, An Q, Gao D, Liu Y, Ping W. 2016. Construction of recombinant baculoviruses expressing hemagglutinin of H5N1 avian influenza and research on the immunogenicity. *Sci Rep*. 6:1–6. doi:10.1038/srep24290.

Genovese KJ, He H, Swaggerty CL, Kogut MH. 2013. The avian heterophil. *Dev Comp Immunol*. 41(3):334–340. doi:10.1016/j.dci.2013.03.021.

Gerber PF, Dawson L, Strugnell B, Burgess R, Brown H, Opriessnig T. 2017. Using oral fluids samples for indirect influenza A virus surveillance in farmed UK pigs. *Vet Med Sci*. 3(1):3–12. doi:10.1002/vms3.51.

Gherzi BM, Blazes DL, Icochea E, Gonzalez RI, Kochel T, Tinoco YO, Sovero MM, Lindstrom S, Shu B, Klimov A, et al., 2009. Avian influenza in wild birds, central coast of Peru. *Emerg Infect Dis*. 15(6):935–938. doi:10.3201/eid1506.080981.

Gherzi BM, Sovero MM, Icochea E, Gonzalez RI, Blazes DL, Gonzalez AE, Montgomery JM. 2011. Isolation of low-pathogenic H7N3 avian influenza from wild birds in Peru. *J Wildl Dis*. 47(3):792–795. doi:10.7589/0090-3558-47.3.792.

Han Y, Hou G, Jiang W, Han C, Liu S, Chen Jie, Li J, Zhang P, Huang B, Liu Y, et al., 2012. A survey of avian influenza in tree sparrows in china in 2011. *PLoS One*. 7(4):3–7. doi:10.1371/journal.pone.0033092.

Hao W, Wang L, Li S. 2020. Roles of the non-structural proteins of influenza a virus. *Pathogens*. 9(10):1–19. doi:10.3390/pathogens9100812.

Henritzi D, Zhao N, Starick E, Simon G, Krog JS, Larsen LE, Reid SM, Brown IH, Chiapponi C, Foni E, et al., 2016. Rapid detection and subtyping of European swine influenza viruses in porcine clinical samples by haemagglutinin- and neuraminidase-specific tetra- and triplex real-time RT-PCRs. *Influenza Other Respi Viruses*. 10(6):504–517. doi:10.1111/irv.12407.

Hernandez-Garcia J, Robben N, Magnée D, Eley T, Dennis I, Kayes SM, Thomson JR, Tucker AW. 2017. The use of oral fluids to monitor key pathogens in porcine respiratory disease complex. *Porc Heal Manag*. 3:1–13. doi:10.1186/s40813-017-0055-4.

Hill NJ, Runstadler JA. 2016. A Bird's Eye View of Influenza A Virus Transmission: Challenges with Characterizing Both Sides of a Co-Evolutionary Dynamic. *Integr Comp Biol*. 56(2):304–316. doi:10.1093/icb/icw055.

Hillman AE, Smith RP, Batey N, Verheyen KL, Pittman M, Brown IH, Breed AC. 2020. Serological surveillance reveals patterns of exposure to H5 and H7 influenza A viruses in European poultry. *Transbound Emerg Dis.* 67(2):592–603. doi:10.1111/tbed.13371.

Hoeffel G, Ginhoux F. 2015. Ontogeny of tissue-resident macrophages. *Front Immunol.* 6:486. doi:10.3389/fimmu.2015.00486.

Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol.* 146(12):2275–2289. doi:10.1007/s007050170002.

Hong M, Li T, Xue W, Zhang S, Cui L, Wang H, Zhang Y, Zhou L, Gu Y, Xia N, et al., 2022. Genetic engineering of baculovirus-insect cell system to improve protein production. *Front Bioeng Biotechnol.* 10(September):1–15. doi:10.3389/fbioe.2022.994743.

Hu C, Li X, Zhu C, Zhou F, Tang W, Wu D, Li Z, Zhou L, Liu J, Wei X, et al., 2020. Co-circulation of multiple reassortant H6 subtype avian influenza viruses in wild birds in eastern China, 2016–2017. *Virol J.* 17:62. doi:10.1186/s12985-020-01331-z.

Hu J, Liang Y, Hu Z, Wang X, Gu M, Li R, Ma C, Liu Xiaowen, Hu S, Chen S, et al., 2019. Recombinant baculovirus vaccine expressing hemagglutinin of H7N9 avian influenza virus confers full protection against lethal highly pathogenic H7N9 virus infection in chickens. *Arch Virol.* 164(3):807–817. doi:10.1007/s00705-018-04142-4. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-04142-4>.

Hurt AC, Su YCF, Aban M, Peck H, Lau H, Baas C, Deng Y-M, Spirason N, Ellström P, Hernandez J, et al., 2016. Evidence for the Introduction, Reassortment, and Persistence of Diverse Influenza A Viruses in Antarctica. *J Virol.* 90(21):9674–9682. doi:10.1128/jvi.01404-16.

ICTV. 2023. Current ICTV Taxonomy Release. International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://ictv.global/taxonomy>.

Inoue E, Wang X, Osawa Y, Okazaki K. 2010. Full genomic amplification and subtyping of influenza a virus using a single set of universal primers. *Microbiol Immunol.* 54(3):129–134. doi:10.1111/j.1348-0421.2009.00193.x.

Isoda N, Onuma M, Hiono T, Sobolev I, Lim HY, Nabeshima K, Honjyo H, Yokoyama M, Shestopalov A, Sakoda Y. 2022. Detection of New H5N1 High Pathogenicity Avian Influenza Viruses in Winter 2021–2022 in the Far East, Which Are Genetically Close to Those in Europe. *Viruses.* 14(10). doi:10.3390/v14102168.

Iwasaki A, Pillai PS. 2014. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol.* 14(5):315–328. doi:10.1038/nri3665.

Jiménez-Bluhm P, Karlsson EA, Ciuoderis KA, Cortez V, Marvin SA, Hamilton-West C, Schultz-Cherry S, Osorio JE. 2016. Avian H11 influenza virus isolated from domestic poultry in a Colombian live animal market. *Emerg Microbes Infect.* 5(12). doi:10.1038/emi.2016.121.

Juul-Madsen HR, Viertlböck B, Härtle S, Smith AL, Göbel TW. 2013. Innate Immune Responses. In: *Avian Immunology, Second Edition.* Elsevier Ltd. p. 121–147. doi: 10.1016/B978-0-12-396965-1.00007-8.

Kang SM, Kim MC, Compans RW. 2012. Virus-like particles as universal influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 11(8):995–1007. doi:10.1586/erv.12.70.

- Kapczynski DR, Swayne DE. 2009.** Influenza vaccines for avian species. In: *Vaccines for Pandemic Influenza*. Springer Dordrecht Heidelberg. p. 133–152. doi: 10.1007/978-3-540-92165-3_6.
- Kaspers B, Kaiser P. 2013.** Avian Antigen-Presenting Cells. In: *Avian Immunology*, Second Edition. Elsevier Ltd. p. 169–188. doi:10.1016/B978-0-12-396965-1.00009-1.
- Kerstetter LJ, Buckley S, Bliss CM, Coughlan L. 2021.** Adenoviral Vectors as Vaccines for Emerging Avian Influenza Viruses. *Front Immunol.* 11:1–27. doi:10.3389/fimmu.2020.607333.
- Kida Y, Okuya K, Saito T, Yamagishi J, Ohnuma A, Hattori T, Miyamoto H, Manzoor R, Yoshida R, Nao N, et al., 2021.** Structural requirements in the hemagglutinin cleavage site-coding rna region for the generation of highly pathogenic avian influenza virus. *Pathogens.* 10(12):1–15. doi:10.3390/pathogens10121597.
- Kim P, Jang YH, Kwon S Bin, Lee CM, Han G, Seong BL. 2018.** Glycosylation of hemagglutinin and neuraminidase of influenza a virus as signature for ecological spillover and adaptation among influenza reservoirs. *Viruses.* 10(4):1–18. doi:10.3390/v10040183.
- Kirkpatrick E, Qiu X, Wilson PC, Bahl J, Krammer F. 2018.** The influenza virus hemagglutinin head evolves faster than the stalk domain. *Sci Rep.* 8(1):1–14. doi:10.1038/s41598-018-28706-1.
- Klasing KC. 1998.** Avian Macrophages: Regulators of Local and Systemic Immune Responses. *Poult Sci.* 77(7):983–989. doi:10.1093/ps/77.7.983.
- Koutsakos M, Kedzierska K, Subbarao K. 2019.** Immune Responses to Avian Influenza Viruses. *J Immunol.* 202(2):382–391. doi:10.4049/jimmunol.1801070.
- Lebarbenchon C, Jaeger A, Feare C, Bastien M, Dietrich M, Larose C, Lagadec E, Rocamora G, Shah N, Pascalis H, et al., 2015.** Influenza A Virus on Oceanic Islands: Host and Viral Diversity in Seabirds in the Western Indian Ocean. *PLoS Pathog.* 11(5):e1004925. doi:10.1371/journal.ppat.1004925.
- Lee J, Li Yonghai, Li Yuhao, Cino-Ozuna AG, Duff M, Lang Y, Ma J, Sunwoo S, Richt JA, Ma W. 2021.** Bat influenza vectored NS1-truncated live vaccine protects pigs against heterologous virus challenge. *Vaccine.* 39(14):1943–1950. doi:10.1016/j.vaccine.2021.02.077.
- Lin M, Yao QC, Liu J, Huo M, Zhou Y, Chen M, Li Y, Gao Y, Ge Y. 2023.** Evolution and Reassortment of H6 Subtype Avian Influenza Viruses. *Viruses.* 15(7):1–14. doi:10.3390/v15071547.
- Lin TY, Brass AL. 2013.** Host genetic determinants of influenza pathogenicity. *Curr Opin Virol.* 3(5):531–536. doi:10.1016/j.coviro.2013.07.005.
- Lin W, Cui H, Teng Q, Li L, Shi Y, Li X, Yang J, Liu Q, Deng J, Li Z. 2020.** Evolution and pathogenicity of H6 avian influenza viruses isolated from Southern China during 2011 to 2017 in mice and chickens. *Sci Rep.* 10(1):1–12. doi:10.1038/s41598-020-76541-0.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. 2012.** Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012:1–11. doi:10.1155/2012/251364.
- Liu STH, Behzadi MA, Sun W, Freyn AW, Liu WC, Broecker F, Albrecht RA, Bouvier NM, Simon V, Nachbagauer R, et al., 2018.** Antigenic sites in influenza H1 hemagglutinin display species-specific immunodominance. *J Clin Invest.* 128(11):4992–4996. doi:10.1172/JCI122895.

Lo CY, Tang YS, Shaw PC. 2018. Structure and function of influenza virus ribonucleoprotein. In: Virus Protein and Nucleoprotein Complexes. Subcellular Biochemistry. Vol. 88. Springer Nature Singapore Pte Ltd. p. 95–128. doi: 10.1007/978-981-10-8456-0_5.

Love RR, Weisenfeld NI, Jaffe DB, Besansky NJ, Neafsey DE. 2016. Evaluation of DISCOVAR de novo using a mosquito sample for cost-effective short-read genome assembly. BMC Genomics. 17(1):1–10. doi:10.1186/s12864-016-2531-7.

Lowen AC. 2017. Constraints, Drivers, and Implications of Influenza A Virus Reassortment. Annu Rev Virol. 4:105–121. doi:10.1146/annurev-virology-101416-041726.

Lycett SJ, Duchatel F, Digard P. 2019. A brief history of bird flu. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 374:20180257. doi:10.1098/rstb.2018.0257.

Ma J, Shen H, McDowell C, Liu Q, Duff M, Lee J, Lang Y, Hesse D, Richt JA, Ma W. 2019. Virus survival and fitness when multiple genotypes and subtypes of influenza A viruses exist and circulate in swine. Virology. 532:30–38. doi:10.1016/j.virol.2019.03.016.

Ma X, Xie L, Wartchow C, Warne R, Xu Y, Rivkin A, Tully D, Shia S, Uehara K, Baldwin DM, et al., 2017. Structural basis for therapeutic inhibition of influenza A polymerase PB2 subunit. Sci Rep. 7(1):1–8. doi:10.1038/s41598-017-09538-x.

Margine I, Palese P, Krammer F. 2013. Expression of functional recombinant hemagglutinin and neuraminidase proteins from the novel H7N9 influenza virus using the baculovirus expression system. J Vis Exp.(81):1–10. doi:10.3791/51112.

Mast J, Goddeeris BM, Peeters K, Vandesande F, Berghman LR. 1998. Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01. Vet Immunol Immunopathol. 61(2–4):343–357. doi:10.1016/S0165-2427(97)00152-9.

Mathew NR, Angeletti D. 2020. Recombinant Influenza Vaccines: Saviors to Overcome Immunodominance. Front Immunol. 10:2997. doi:10.3389/fimmu.2019.02997.

Mathieu C, Gonzalez A, Garcia A, Johow M, Badia C, Jara C, Nuñez P, Neira V, Montiel NA, Killian ML, et al., 2021. H7N6 low pathogenic avian influenza outbreak in commercial turkey farms in Chile caused by a native South American Lineage. Transbound Emerg Dis. 68(1):2–12. doi:10.1111/tbed.13166.

McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, Brown LE, McKimm-Breschkin JL. 2019. Influenza virus neuraminidase structure and functions. Front Microbiol. 10(39). doi:10.3389/fmicb.2019.00039.

McCune S, Arriola CS, Gilman RH, Romero MA, Ayvar V, Cama VA, Montgomery JM, Gonzales AE, Bayer AM. 2012. Interspecies interactions and potential Influenza A virus risk in small swine farms in Peru. BMC Infect Dis. 12. doi:10.1186/1471-2334-12-58.

McKinnon KM. 2018. Flow cytometry: An overview. Curr Protoc Immunol. 120:5.1.1-5.1.11. doi:10.1002/cpim.40.

Meng F, Yang H, Qu Z, Chen Y, Zhang Yijie, Zhang Yaping, Liu L, Zeng X, Li C, Kawaoka Y, et al., 2022. A Eurasian avian-like H1N1 swine influenza reassortant virus became pathogenic and highly transmissible due to mutations in its PA gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 119(34):1–11. doi:10.1073/pnas.2203919119.

Metzker ML. 2010. Sequencing technologies the next generation. *Nat Rev Genet.* 11:31–46. doi:10.1038/nrg2626.

Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L, Gerdtts V. 2012. The pig: A model for human infectious diseases. *Trends Microbiol.* 20(1):50–57. doi:10.1016/j.tim.2011.11.002.

MIDAGRI. 2023. Anuario estadístico “Producción Ganadera y Avícola 2022”. N°7. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. Lima, Perú. <https://www.gob.pe/institucion/midagri/informes-publicaciones/2730346-compendio-anual-de-produccion-ganadera-y-avicola>.

Monasi F. L, Icochea D. E. 1999. Seroprevalencia del virus de la influenza aviar en broilers en la provincia de huaral, Lima. *Rev Investig Vet del Peru.* 10(2):68–70. doi:10.15381/rivep.v10i2.6744.

More Bayona JA, Karupppannan AK, Trites MJ, Barreda DR. 2017. Application of imaging flow cytometry for characterization of acute inflammation in non-classical animal model systems. *Methods.* 112:167–174. doi:10.1016/j.ymeth.2016.06.013.

Mostafa A, Abdelwhab EM, Mettenleiter TC, Pleschka S. 2018. Zoonotic potential of influenza A viruses: A comprehensive overview. *Viruses.* 10(9):1–38. doi:10.3390/v10090497.

Nao N, Yamagishi J, Miyamoto H, Igarashi M, Manzoor R, Ohnuma A, Tsuda Y, Furuyama W, Shigeno A, Kajihara M, et al., 2017. Genetic Predisposition To Acquire a Polybasic Cleavage Site for Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Hemagglutinin. *MBio.* 8(1):e02298-16. doi:10.1128/mBio.02298-16.

Nelson MI, Pollett S, Gherzi B, Silva M, Simons MP, Icochea E, Gonzalez AE, Segovia K, Kasper MR, Montgomery JM, et al., 2016. The genetic diversity of influenza A viruses in wild birds in Peru. *PLoS One.* 11(1):1–10. doi:10.1371/journal.pone.0146059.

Neumann G, Kawaoka Y. 2019. Predicting the Next Influenza Pandemics. *J Infect Dis.* 219:S14–S20. doi:10.1093/infdis/jiz040.

Nuñez IA, Ross TM. 2019. A review of H5Nx avian influenza viruses. *Ther Adv Vaccines Immunother.* 7:1–15. doi:10.1177/2515135518821625.

Nurzijah I, Elbohy OA, Kanyuka K, Daly JM, Dunham S. 2022. Development of Plant-Based Vaccines for Prevention of Avian Influenza and Newcastle Disease in Poultry. *Vaccines.* 10(3):1–21. doi:10.3390/vaccines10030478.

Okabe Y. 2018. Molecular control of the identity of tissue-resident macrophages. *Int Immunol.* 30(11):485–491. doi:10.1093/intimm/dxy019.

Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenström J, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. 2006. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science.* 312:384–388. doi:10.1126/science.1122438.

Ozawa M, Kawaoka Y. 2013. Cross talk between animal and human influenza viruses. *Annu Rev Anim Biosci.* 1:21–42. doi:10.1146/annurev-animal-031412-103733.

Petrova VN, Russell CA. 2018. The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat Rev Microbiol.* 16(1):47–60. doi:10.1038/nrmicro.2017.118.

Piriou-Guzylack L, Salmon H. 2008. Membrane markers of the immune cells in swine: an update.

Vet Res. 39(6):54. doi:10.1051/vetres:2008030.

Poen MJ, Venkatesh D, Bestebroer TM, Vuong O, Scheuer RD, Oude Munnink BB, de Meulder D, Richard M, Kuiken T, Koopmans MPG, et al., 2019. Co-circulation of genetically distinct highly pathogenic avian influenza A clade 2.3.4.4 (H5N6) viruses in wild waterfowl and poultry in Europe and East Asia, 2017–18. *Virus Evol.* 5(1):1–12. doi:10.1093/ve/vez004.

Prabakaran M, Kwang J. 2014. Recombinant baculovirus displayed vaccine. *Bioengineered.* 5(1):45–48. doi:10.4161/bioe.26001.

Putri K, Wibowo MH, Tarigan S, Wawegama N, Ignjatovic J, Noormohammadi AH. 2020. Analysis of antibody response to an epitope in the haemagglutinin subunit 2 of avian influenza virus H5N1 for differentiation of infected and vaccinated chickens. *Avian Pathol.* 49(2):161–170. doi:10.1080/03079457.2019.1694635.

Qureshi MA, Heggen CL, Hussain I. 2000. Avian macrophage: Effector functions in health and disease. *Dev Comp Immunol.* 24(2–3):103–119. doi:10.1016/S0145-305X(99)00067-1.

Rajao DS, Vincent AL, Perez DR. 2019. Adaptation of human influenza viruses to swine. *Front Vet Sci.* 5:347. doi:10.3389/fvets.2018.00347.

Ramos I, Fernandez-Sesma A. 2012. Innate immunity to H5N1 influenza viruses in humans. *Viruses.* 4(12):3363–3388. doi:10.3390/v4123363.

Rauw WM, Kanis E, Noordhuizen-Stassen EN, Grommers FJ. 1998. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: A review. *Livest Prod Sci.* 56(1):15–33. doi:10.1016/S0301-6226(98)00147-X.

Rees P, Summers HD, Filby A, Carpenter AE, Doan M. 2022. Imaging flow cytometry. *Nat Rev Methods Prim.* 2(86). doi:10.1038/s43586-022-00167-x.

Van Reeth K. 2018. The post-2009 influenza pandemic era: Time to revisit antibody immunodominance. *J Clin Invest.* 128(11):4751–4754. doi:10.1172/JCI124151.

Van Reeth K, Ma W. 2013. Swine Influenza Virus Vaccines: To Change or Not to Change—That’s the Question. *Curr Top Microbiol Immunol.* 370:173–200. doi:10.1007/82_2012_266.

Reeth K Van, Vincent AL, Lager KM. 2016. Vaccines and vaccination for swine influenza: differing situations in Europe and the USA. In: *Animal Influenza*. Second edition. John Wiley & Sons, Inc. p. 480–501. doi:10.1002/9781118924341.ch19.

Reich S, Guilligay D, Pflug A, Malet H, Berger I, Crepin T, Hart D, Lunardi T, Nanao M, Ruigrok RWH, et al., 2014. Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase. *Nature.* 516(7531):361–366. doi:10.1038/nature14009.

Richards DM, Endres RG. 2014. The mechanism of phagocytosis: Two stages of engulfment. *Biophys J.* 107(7):1542–1553. doi:10.1016/j.bpj.2014.07.070.

Roberts AW, Lee BL, Deguine J, John S, Shlomchik MJ, Barton GM. 2017. Tissue-resident Macrophages are Locally Programmed for Silent Clearance of Apoptotic Cells. *Immunity.* 47(5):913–927.e6. doi:10.1016/j.immuni.2017.10.006.

Rossman JS, Lamb RA. 2011. Influenza Virus Assembly and Budding. *Virology.* 411(2):229–236.

doi:10.1016/j.virol.2010.12.003.

Ruby JG, Bellare P, DeRisi JL. 2013. PRICE: Software for the targeted assembly of components of (Meta) genomic sequence data. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 3(5):865–880. doi:10.1534/g3.113.005967.

Russell CJ, Hu M, Okda FA. 2018. Influenza Hemagglutinin Protein Stability, Activation, and Pandemic Risk. *Trends Microbiol.* 26(10):841–853. doi:10.1016/j.tim.2018.03.005.

Russell RJ, Kerry PS, Stevens DJ, Steinhauer DA, Martin SR, Gamblin SJ, Skehel JJ. 2008. Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(46):17736–17741. doi:10.1073/pnas.0807142105.

Ryu W-S. 2017. Influenza Viruses. In: *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses.* Academic Press. p. 195–211. doi: 10.1016/B978-0-12-800838-6.00015-1.

Sanger F, Nicklen S, Coulson R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry.* 74(12):5463–5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463.

Sato M, Maruyama J, Kondoh T, Nao N, Miyamoto H, Takadate Y, Furuyama W, Kajihara M, Ogawa H, Manzoor R, et al., 2019. Generation of bat-derived influenza viruses and their reassortants. *Sci Rep.* 9(1):1–8. doi:10.1038/s41598-018-37830-x.

Schnitzler SU, Schnitzler P. 2009. An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: A review. *Virus Genes.* 39(3):279–292. doi:10.1007/s11262-009-0404-8.

Segovia K, Icochea D. E, González V. R, Gherzi B, González Z. A. 2013. Presence of avian influenza virus in wild birds in the wetlands of Puerto Viejo, Lima. *Rev Investig Vet del Peru.* 24(1):98–103. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v24n1/a14v24n1.pdf>.

Sempere Borau M, Stertz S. 2021. Entry of influenza A virus into host cells — recent progress and remaining challenges. *Curr Opin Virol.* 48:23–29. doi:10.1016/j.coviro.2021.03.001.

Senne DA. 2007. Avian Influenza in North and South America, 2002–2005. *Avian Dis.* 51:167–173. doi:10.1637/7621-042606R1.1.

Seong MW, Cho SI, Park H, Seo SH, Lee SJ, Kim EC, Park SS. 2016. Genotyping influenza virus by next-generation deep sequencing in clinical specimens. *Ann Lab Med.* 36(3):255–258. doi:10.3343/alm.2016.36.3.255.

Shi J, Zeng X, Cui P, Yan C, Chen H. 2023. Alarming situation of emerging H5 and H7 avian influenza and effective control strategies. *Emerg Microbes Infect.* 12(1):2155072. doi:10.1080/22221751.2022.2155072.

Sims LD, Swayne DE. 2016. Avian influenza control strategies. In: *Animal Influenza.* Second edition. John Wiley & Sons, Inc. p. 363–377. doi: 10.1002/9781118924341.ch14.

Slusher MJ, Wilcox BR, Luttrell MP, Poulson RL, Brown JD, Yabsley MJ, Stallknecht DE. 2014. Are passerine birds reservoirs for influenza A viruses? *J Wildl Dis.* 50(4):792–809. doi:10.7589/2014-02-043.

Smith GE, Flyer DC, Raghunandan R, Liu Y, Wei Z, Wu Y, Kpamegan E, Courbron D, Fries LF, Glenn GM. 2013. Development of influenza H7N9 virus like particle (VLP) vaccine: Homologous

A/Anhui/1/2013 (H7N9) protection and heterologous A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 (H7N3) cross-protection in vaccinated mice challenged with H7N9 virus. *Vaccine*. 31(40):4305–4313. doi:10.1016/j.vaccine.2013.07.043.

Souillard R, Allain V, Dufay-Lefort AC, Rousset N, Amalraj A, Spaans A, Zbikowski A, Piccirillo A, Sevilla-Navarro S, Kovács L, et al., 2024. Biosecurity implementation on large-scale poultry farms in Europe: A qualitative interview study with farmers. *Prev Vet Med*. 224(January). doi:10.1016/j.prevetmed.2024.106119.

Spackman E. 2020. Animal Influenza Virus. Animal Influenza Virus. Third Ed. Humana New York, NY (Methods in Molecular Biology). doi: 10.1007/978-1-0716-0346-8.

Spackman E, Cattoli G, Suarez DL. 2016. Diagnostics and surveillance methods. In: Animal Influenza. Second edition. John Wiley & Sons, Inc. p. 31–44. doi: 10.1002/9781118924341.ch2.

Stallknecht DE, Brown JD. 2017. Wild bird infections and the ecology of avian influenza viruses. In: Animal Influenza. Second edition. John Wiley & Sons, Inc. p. 153–176. doi: 10.1002/9781118924341.ch7.

Suarez DL. 2017. Common aspects of animal influenza. In: Animal Influenza. Second edition. John Wiley & Sons, Inc. p. 3–30. doi: 10.1002/9781118924341.ch1.

Suarez DL, Pantin-Jackwood MJ. 2017. Recombinant viral-vectored vaccines for the control of avian influenza in poultry. *Vet Microbiol*. 206:144–151. doi:10.1016/j.vetmic.2016.11.025.

Suarez DL, Senne DA, Banks J, Brown IH, Essen SC, Lee CW, Manvell RJ, Mathieu-Benson C, Moreno V, Pedersen JC, et al., 2004. Recombination Resulting in Virulence Shift in Avian Influenza Outbreak, Chile. *Emerg Infect Dis*. 10(4):693–699. doi:10.3201/eid1004.030396.

Sun D, Wang X, Wei S, Chen J, Feng L. 2016. Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhea virus in China: a mini-review. *J Vet Med Sci*. 78(3):355–363. doi:10.1292/jvms.15-0446.

Sun Honglei, Xiao Y, Liu Jiyu, Wang D, Li F, Wang C, Li C, Zhu J, Song J, Sun Haoran, et al., 2020. Prevalent Eurasian avian-like H1N1 swine influenza virus with 2009 pandemic viral genes facilitating human infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117(29):17204–17210. doi:10.1073/pnas.1921186117.

Sun W, Zhao M, Yu Z, Li Y, Zhang X, Feng N, Wang T, Wang H, He H, Zhao Y, et al., 2023. Cross-species infection potential of avian influenza H13 viruses isolated from wild aquatic birds to poultry and mammals. *Emerg Microbes Infect*. 12(1):e2184177. doi:10.1080/22221751.2023.2184177.

Suzuki Y, Nei M. 2002. Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes. *Mol Biol Evol*. 19(4):501–509. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a004105.

Swayne DE. 1998. A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. 4th Ed. American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania.

Swayne DE. 2009. Avian influenza vaccines and therapies for poultry. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 32(4):351–363. doi:10.1016/j.cimid.2008.01.006.

Swayne DE. 2012. Impact of vaccines and vaccination on global control of avian influenza. *Avian Dis*. 56:818–828. doi:10.1637/10183-041012-Review.1.

Swayne DE, Kapczynski DR. 2016. Vaccines and vaccination for avian influenza in poultry. In: *Animal Influenza*. Second edition. John Wiley & Sons, Inc. p. 378–434. doi:10.1002/9781118924341.ch15.

Swayne DE, Spackman E, Pantin-Jackwood M. 2014. Success factors for avian influenza vaccine use in poultry and potential impact at the wild bird-agricultural interface. *Ecohealth*. 11(1):94–108. doi:10.1007/s10393-013-0861-3.

Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol*. 38(7):3022–3027. doi:10.1093/molbev/msab120.

Tatsis N, Fitzgerald JC, Reyes-Sandoval A, Harris-McCoy KC, Hensley SE, Zhou D, Lin SW, Bian A, Zhi QX, Iparraguirre A, et al., 2007. Adenoviral vectors persist in vivo and maintain activated CD8⁺ T cells: Implications for their use as vaccines. *Blood*. 110(6):1916–1923. doi:10.1182/blood-2007-02-062117.

Tinoco YO, Montgomery JM, Kasper MR, Nelson MI, Razuri H, Guezala MC, Azziz-Baumgartner E, Widdowson MA, Barnes J, Gilman RH, et al., 2016. Transmission dynamics of pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus in humans and swine in backyard farms in Tumbes, Peru. *Influenza Other Respi Viruses*. 10(1):47–56. doi:10.1111/irv.12329.

Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Alvarez Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, et al., 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(11):4269–4274. doi:10.1073/pnas.1116200109.

Vahey MD, Fletcher DA. 2019. Influenza A virus surface proteins are organized to help penetrate host mucus. *Elife*. 8:1–24. doi:10.7554/eLife.43764.

Valladares J, Icochea E, González R, Silva M. 2018. Surveillance of Avian Influenza type A virus in backyard ducks of the provinces of Huaral and Huaura (Lima, Peru). *Rev Investig Vet del Peru*. 29(4):1493–1499. doi:10.15381/rivep.v29i4.15179.

Vincent AL, Ciacchi-Zanella JR, Lorusso A, Gauger PC, Zanella EL, Kehrli ME, Janke BH, Lager KM. 2010. Efficacy of inactivated swine influenza virus vaccines against the 2009 A/H1N1 influenza virus in pigs. *Vaccine*. 28(15):2782–2787. doi:10.1016/j.vaccine.2010.01.049.

Vittecoq M, Grandhomme V, Simon G, Herve S, Blanchon T, Renaud F, Thomas F, Gauthier-Clerc M, van der Werf S. 2012. Study of influenza A virus in wild boars living in a major duck wintering site. *Infect Genet Evol*. 12(2):483–486. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.003.

Vittecoq M, Thomas F, Renaud F, Gauthier-Clerc M. 2019. Avian influenza viruses. *Ref Modul Earth Syst Environ Sci*:223–230. doi:10.1016/B978-0-12-409548-9.09137-5.

Vreman S, Kik M, Germeaad E, Heutink R, Harders F, Spierenburg M, Engelsma M, Rijks J, van den Brand J, Beerens N. 2023. Zoonotic Mutation of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus Identified in the Brain of Multiple Wild Carnivore Species. *Pathogens*. 12(2):168. doi:10.3390/pathogens12020168.

Wallensten A. 2007. Influenza virus in wild birds and mammals other than man. *Microb Ecol Health Dis*. 19(2):122–139. doi:10.1080/08910600701406786.

Wang G, Deng G, Shi J, Luo W, Zhang G, Zhang Q, Liu L, Jiang Y, Li C, Sriwilaijaroen N, et al., 2014. H6 Influenza Viruses Pose a Potential Threat to Human Health. *J Virol*. 88(8):3953–3964.

doi:10.1128/jvi.03292-13.

Wang ZJ, Kikutani Y, Nguyen LT, Hiono T, Matsuno K, Okamatsu M, Krauss S, Webby R, Lee YJ, Kida H, et al., 2018. H13 influenza viruses in wild birds have undergone genetic and antigenic diversification in nature. *Virus Genes*. 54(4):543–549. doi:10.1007/s11262-018-1573-0.

Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. 1992. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiol Rev*. 56(1):152–179. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1579108/>.

WOAH. 2018. Influenza A virus of swine. In: OIE Terrestrial Manual. Chapter 3.8.7. World Organisation for Animal Health. p. 1594–1607. https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.08.07_INF_A_SWINE.pdf.

Wong SS, Yoon SW, Zanin M, Song MS, Oshansky C, Zaraket H, Sonnberg S, Rubrum A, Seiler P, Ferguson A, et al., 2014. Characterization of an H4N2 influenza virus from Quails with a multibasic motif in the hemagglutinin cleavage site. *Virology*. 468–470:72–80. doi:10.1016/j.virol.2014.07.048.

Wood GW, Banks J, Strong I, Parsons G, Alexander DJ. 1996. An avian influenza virus of H10 subtype that is highly pathogenic for chickens, but lacks multiple basic amino acids at the haemagglutinin cleavage site. *Avian Pathol*. 25(4):799–806. doi:10.1080/03079459608419182.

Wright KE, Wilson GAR, Novosad D, Dimock C, Tan D, Weber JM. 1995. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J Clin Microbiol*. 33(5):1180–1184. doi:10.1128/jcm.33.5.1180-1184.1995.

Wu Ying, Wu Yan, Tefsen B, Shi Y, Gao GF. 2014. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol*. 22(4):183–191. doi:10.1016/j.tim.2014.01.010.

Xu W, Dai Y, Hua C, Wang Q, Zou P, Deng Q, Jiang S, Lu L. 2017. Genomic signature analysis of the recently emerged highly pathogenic A(H5N8) avian influenza virus: implying an evolutionary trend for bird-to-human transmission. *Microbes Infect*. 19(12):597–604. doi:10.1016/j.micinf.2017.08.006.

Yamayoshi S, Watanabe M, Goto H, Kawaoka Y. 2016. Identification of a Novel Viral Protein Expressed from the PB2 Segment of Influenza A Virus. *J Virol*. 90(1):444–456. doi:10.1128/jvi.02175-15.

York IA, Stevens J, Alymova I V. 2019. Influenza virus N-linked glycosylation and innate immunity. *Biosci Rep*. 39(1):1–15. doi:10.1042/BSR20171505.

Zhang M, Huang Y, Godson DL, Fernando C, Alexander TW, Hill JE. 2020. Assessment of Metagenomic Sequencing and qPCR for Detection of Influenza D Virus in Bovine Respiratory Tract Samples. *Viruses*. 12(8):814. doi:10.3390/v12080814.

Zhu WZ, Wen YC, Lin SY, Chen TC, Chen HW. 2020. Anti-influenza protective efficacy of a H6 virus-like particle in chickens. *Vaccines*. 8(3):1–13. doi:10.3390/vaccines8030465.