



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE
ANIMALES SEROPOSITIVOS Y DEL VIRUS DE
INFLUENZA PORCINA ANTES Y DESPUES DE LA
VACUNACIÓN EN UNA GRANJA PRODUCTORA DE
LECHONES**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO

EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JUAN CARLOS DIAZ FUENTES

TUTOR:

MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA

COMITÉ TUTORAL:

LAURA BATISTA GARCIA

JOSÉ JUAN MARTÍNEZ MAYA

MÉXICO

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Elena Trujillo Ortega por ser guía y formadora pero sobre todo por el apoyo que me brindó para poder concluir mi tesis, le estoy muy agradecido.

A la Dra. Laura Batista García por su apoyo y colaboración para poder llevar a término esta tesis.

Al Dr. José Juan Martínez Maya por el apoyo que ha brindado y su colaboración para concluir este trabajo.

A la Dra. Susana Mendoza Elvira y al Dr. Antonio Morilla González por su valioso tiempo y aportaciones brindadas para llevar a término mi trabajo de tesis.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM especialmente al MVZ Roberto Martínez por toda la disposición y apoyo brindado para desarrollar la fase experimental de mi tesis en este centro.

A los MVZ Mónica, Alector, Lulú, Carolina, Magda y Félix por el esfuerzo y apoyo que me brindaron en el CEIEPP.

Al Departamento de Producción Animal Cerdos de la FMVZ, UNAM por brindarme las herramientas y permitirme llevar a cabo en este lugar las pruebas de laboratorio de mi tesis.

Al Dr. Iván Sánchez Betancourt por tu amistad, tiempo y por los conocimientos que compartiste conmigo.

AL Dr. Mario Haro, a la Dra. Rosalba Carreón y a la Dra Carmen por todo su apoyo.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia y a la Universidad Nacional Autónoma de México por tener siempre las puertas abiertas para los pumas que regresamos a casa.

Al Dr. Francisco Rosales por el apoyo brindado para la realización del presente estudio.

A mi familia por la confianza, apoyo y amor que me han brindado.

INDICE

RESUMEN	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Etiología	3
2.2 Estructura viral	4
2.3 Replicación viral	6
2.4 Cambios genéticos	7
2.5 Epidemiología	9
2.6 Patogenia	11
2.7 Signos clínicos	13
2.8 Lesiones macroscópicas y microscópicas	15
2.9 Respuesta inmune	17
2.10 Diagnóstico	19
2.10.1 Aislamiento viral	19
2.10.2 Pruebas serológicas:	20
2.10.2.1 Inhibición de la hemoaglutinación	20
2.10.2.2 ELISA	22
2.10.3 Inmunofluorescencia:	23
2.10.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	23
2.11 Tratamiento	25
2.12 Prevención y Control	25
2.13 Vacunación	26

2.13.1 Vacunas convencionales	27
2.13.2 Vacunas de virus inactivado	28
2.13.3 Vacunas de nueva generación	29
2.14 Justificación	31
III. HIPÓTESIS	32
IV. OBJETIVOS	33
V. MATERIAL Y MÉTODOS	34
5.1 Programa de vacunación	34
5.2 Bioseguridad	34
5.3 Estatus sanitario	35
5.4 Metodología	39
VI. RESULTADOS	45
6.1 Etapa I. Primer Muestreo	45
6.1.1 Porcentaje de cerdas serológicamente positivas al virus de influenza porcina tipo a subtipo H1N1.	45
6.1.2 Porcentaje de cerdas serológicamente positivas al virus de influenza porcina tipo a subtipo H3N2.	46
6.1.3 Porcentaje de cerdos en el destete serológicamente positivos al virus de influenza porcina tipo a subtipo H1N1.	47
6.1.4 Porcentaje de cerdos en el destete serológicamente positivos al virus de influenza porcina tipo a subtipo H3N2.	48
6.2 Segundo muestreo	49
6.2.1 Porcentaje de cerdas serológicamente positivas al virus de influenza porcina tipo a subtipo H1N1.	49
6.2.2 Porcentaje de cerdas serológicamente positivas al virus de influenza porcina tipo a subtipo H3N2.	50
6.2.3 Porcentaje de cerdos en el destete serológicamente positivos al virus de influenza porcina tipo a subtipo H1N1.	51
6.2.4 Porcentaje de cerdos en el destete serológicamente positivos al virus de influenza porcina tipo a subtipo H3N2.	52
6.3 Etapa I. RT PCR	58
6.3.1 Resultados de la prueba de RT - PCR múltiple, a partir de sueros.	58

6.3.2 Resultados de la prueba de RT - PCR múltiple a partir de hisopos nasales.	60
6.4 Etapa II. Seroconversión de la aplicación de una vacuna bivalente inactivada del virus de influenza porcina.	61
6.4.1 Títulos serológicos de hembras vacunadas, no vacunadas y sus respectivos lechones hacia el subtipo H1N1.	61
6.4.2 Títulos serológicos de hembras vacunadas, no vacunadas y sus respectivos lechones hacia el subtipo H3N2.	66
6.5 Etapa II. RT - PCR	71
6.5.1 Resultados de la prueba de RT - PCR múltiple, de sueros de hembras vacunadas y no vacunadas.	71
6.5.2 Resultados de la prueba de RT - PCR múltiple, de hisopos de hembras vacunadas y no vacunadas.	72
6.5.3 Resultados de la prueba de RT - PCR múltiple, de SUEROS de lechones provenientes de hembras vacunadas y no vacunadas.	73
6.5.4 Resultados de la prueba de RT - PCR múltiple, de hisopos de lechones provenientes de hembras vacunadas y no vacunadas.	74
6.6 Etapa III. Parámetros reproductivo de las hembras	77
VII. DISCUSIÓN	79
VIII. CONCLUSIONES	86
IX. BIBLIOGRAFÍA	88
X. ANEXOS	95

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Títulos serológicos del virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1 en hembras de diferentes partos.	46
Cuadro 2. Títulos serológicos del virus de influenza porcina tipo A subtipo H3N2 en hembras de diferentes partos. 1er. Muestreo serológico.	47
Cuadro 3. Títulos serológicos del virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1 en cerdos destetados.	48
Cuadro 4. Títulos serológicos del virus de influenza porcina tipo A subtipo H3N2 en cerdos destetados.	49
Cuadro 5. Títulos serológicos del virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1 en hembras de diferentes partos.	50
Cuadro 6. Títulos serológicos del virus de influenza porcina tipo A subtipo H3N2 en hembras de diferentes partos.	51
Cuadro 7. Títulos serológicos del virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1 en cerdos destetados.	52
Cuadro 8. Títulos serológicos del virus de influenza porcina tipo A subtipo H3N2 en cerdos destetados.	53
Cuadro 9. Resultados de la prueba de RT - PCR para identificar el material genético del virus de influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2 a partir de sueros.	58
Cuadro 10. Resultados de la prueba de RT - PCR para identificar el material genético del virus de influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2 a partir de sueros.	59
Cuadro 11. Resultados de la prueba de RT - PCR para identificar el material genético del virus de influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2 a partir de hisopos nasales.	60

Cuadro 12. Porcentaje de cerdas seropositivas al virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1 en hembras vacunadas y sus lechones.	62
Cuadro 13. Porcentaje de cerdas seropositivas al virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1 en hembras no vacunadas y sus lechones.	63
Cuadro 14. Porcentaje de cerdas seropositivas al virus de influenza porcina tipo A subtipo H3N2 en hembras vacunadas y sus lechones.	67
Cuadro 15. Porcentaje de cerdas seropositivas al virus de influenza porcina tipo A subtipo H3N2 en hembras no vacunadas y sus lechones.	68
Cuadro 16. Resultados de la prueba de RT - PCR múltiple, de sueros de hembras Vacunadas y No Vacunadas.	72
Cuadro 17. Resultados de la prueba de RT - PCR múltiple, de hisopos de hembras vacunadas y no vacunadas.	73
Cuadro 18. Resultados de la prueba de RT - PCR múltiple, de sueros de lechones provenientes de hembras vacunadas y no vacunadas.	74
Cuadro 19. Resultados de la prueba de RT - PCR múltiple, de hisopos de lechones provenientes de hembras vacunadas y no vacunadas.	75
Cuadro 20. Integración de resultados serológicos y resultados de RT PCR	76
Cuadro 21. Parámetros Productivos	77

LISTA DE GRÁFICAS

Grafica 1 Porcentaje de cerdas seropositivas al virus de Influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2.	54
Grafica 2 Porcentaje de cerdos destetados seropositivos al virus de influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2.	55
Grafica 3 Títulos serológicos del pié de cría en Log 2 en el 1er y 2º muestreo de la etapa I.	56
Grafica 4 Títulos serológicos de cerdos destetados en Log 2 en el 1er y 2º muestreo de la etapa I.	57
Grafica 5 Porcentaje de hembras vacunadas, no vacunadas y sus lechones seropositivos al virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1.	64
Grafica 6 Títulos serológicos de hembras vacunadas, no vacunadas y sus lechones contra el virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1.	65
Grafica 7 Porcentaje de hembras vacunadas, no vacunadas y sus lechones seropositivos al virus de influenza porcina tipo A subtipo H3N2.	69
Grafica 8 Títulos serológicos de hembras no vacunadas, vacunadas y sus lechones hacia el subtipo H3N2	70
Grafica 9 Comparación de los parámetros reproductivos en hembras vacunadas y no vacunadas.	78

RESUMEN

JUAN CARLOS DÍAZ FUENTES. **Determinación de la Prevalencia de Animales Seropositivos y del Virus de Influenza Porcina Antes y Después de la Vacunación en una Granja Productora de Lechones.** Se realizaron dos muestreos con la finalidad de determinar la prevalencia serológica e identificar los subtipos del virus de influenza porcina presentes en una granja productora de lechones, se aplicó una vacuna bivalente (H1N1 y H3N2) en cerdas antes del parto, con la finalidad de determinar la curva de anticuerpos generados, además conocer la inmunidad pasiva que presentan los lechones y evaluar los parámetros reproductivos, utilizando las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (IH), Transcriptasa Reversa - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los registros de desempeño reproductivo (Pig Champ). Se llevó a cabo en varias etapas: I) dos muestreos transversales al 100% de la población con un intervalo de tres meses entre ellos. II) formación de dos grupos, control y experimental, con un muestreo a las 11 y 14 semanas de gestación y 1 semana posterior al parto en las hembras y a la 1ª y 4ª semana de vida en los lechones. Resultados: I) Se encontró 100% de hembras seropositivas a los subtipos H1N1 y H3N2 y fueron identificados por medio de RT-PCR; 96% de cerdos destetados seropositivos a H1N1 y 6% a H3N2 y ambos fueron identificados con RT-PCR. En el 2do muestreo se encontró 100% de cerdas seropositivas a H1N1 confirmando su presencia por RT-PCR y 96% a H3N2 pero este no se identificó por RT-PCR con las muestras provenientes de suero, sin embargo en la muestra de exudado nasal se encontró positiva; 98% de cerdos destetados seropositivos a H1N1, no se confirmó con la RT-PCR y 80% contra H3N2 y positivo en la RT-PCR y para las muestras de hisopos nasales H1N1 y H3N2 amplificaron. II) G1 a 11 Semanas 43.10% para H1N1 y 18.18% para H3N2 en ambos casos solo amplificaron las muestras de suero. G2 56% para H1N1 confirmado en RT-PCR de suero y 4% para H3N2 no amplificó ninguna muestra. A 14 Semanas G1 59.26% para H1N1 y 72.22% para H3N2 y en ningún caso se confirmó con RT-PCR. G2 37.5% para H1N1 confirmado con RT-PCR y 10.53% para H3N2. Posparto G1 84.62% para H1N1 confirmado por PCR y 78.43 % para H3N2. G2 60.87% para H1N1 y 13.04% para H3N2, sin identificación. Lechones 1 Semana G1, 29.56% para H1N1 no confirmado y 78.88% para H3N2 confirmado con RT-PCR. G2 26.09% para H1N1 y 10.29% para H3N2. Lechones 4 Semanas G1. 28.21% para H1N1 y 48.72% para H3N2 sin identificación. G2 15.15% para H1N1 y 0% para H3N2 identificados por PCR. III) No se observó diferencia significativa en los parámetros reproductivos del Grupo 1 con respecto al Grupo 2. En este estudio se identificó un incremento en los títulos serológicos y una mayor duración de la inmunidad materna en las hembras vacunadas y sus lechones respectivamente.

Palabras clave: *Influenzavirus* porcino, prevalencia serológica, PCR

I. INTRODUCCIÓN

El término “**Malathia Influenzae per le stelle**” se utilizó para describir a una de las primeras epidemias respiratorias que se presentó en humanos en Italia, durante el siglo XV y se refería a que la enfermedad se originaba por la influencia de las estrellas y los planetas (Madec, 2004).

El virus de influenza porcina ha recibido especial atención desde que se describió por primera vez en 1918 en Estados Unidos a finales del verano en granjas al Oeste de Illinois, en donde se presentó una epizootia con signos clínicos y lesiones patológicas similares a la enfermedad de influenza en humanos mejor conocida como “Gripe Española”, que fue responsable de 30 millones de muertos en todo el mundo (Karasin, 2002).

El virus se aisló en 1930 y se clasificó como un *influenzavirus* tipo A (Song *et al.*, 2003) subtipo H1N1, perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*; desde entonces el virus y la enfermedad son considerados endémicos en América del Norte (Schlutz U *et al.*, 1991 y Gorman OT *et al.*, 1991).

Los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2 de los virus de influenza porcina han sido aislados de cerdos en Estados Unidos, Europa y Asia (Marozin, 2002; Song, 2003).

La influenza porcina es una enfermedad infecciosa respiratoria aguda de los cerdos que se caracteriza por un repentino comienzo de secreción nasal, estornudos, tos, disnea, fiebre y postración, seguido de una rápida recuperación. (Song *et al.*, 2003)

La importancia de esta enfermedad radica en que genera grandes pérdidas económicas debido al retraso en la ganancia de peso y a los tratamientos administrados para prevenir infecciones secundarias generadas por bacterias además de la preocupación que crece por el potencial sinérgico con otras infecciones virales como lo es el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (Song *et al.*, 2003).

Hoy en día se han reportado brotes de influenza porcina en Bélgica, Brasil, Canadá, República de China, Colombia, Checoslovaquia, Dinamarca, Francia, Alemania, Gran Bretaña, Hong Kong, Korea, Irán, Italia, Japón, Kenya, Holanda, Polonia, Unión Soviética, Sudán, Taiwan y en Estados Unidos (Bikour, 1994; Morilla, 2002; Song, 2003).

En México se reveló la presencia y difusión serológica de los subtipos H1N1 y H3N2. En un estudio de campo realizado en 2005 se encontró que el subtipo H3N2 se encuentra ampliamente distribuido en nuestro país y el estado de Puebla presentó el mayor número de cerdos seropositivos, enseguida se encontró el estado de Veracruz y el estado de Jalisco ocupó un tercer sitio (Chávez, 2005).

En la actualidad se realiza profilaxis contra esta enfermedad con el uso de vacunas bivalentes, constituidas de virus atenuado, para prevenir o reducir los signos clínicos y el impacto económico generado por la infección con el virus de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 (Rapp *et al.*, 2003)

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Etiología

La Familia *Orthomyxoviridae* está formada por tres géneros del virus de influenza, el A, B y C que pueden ser diferenciados por las bases antigénicas de su nucleocápside (NP) y su proteína matriz (M), Thogotovirus ha sido incluido y llamado en ocasiones virus de influenza tipo D (Ito *et al.*, 1998).

El influenzavirus tipo A, es un virus RNA de cadena simple negativa, esférico, pleomórfico, de tamaño medio (80 – 120 nm), envuelto por una bicapa lipídica y de genoma segmentado ligado a nucleoproteínas (NPs). La envoltura está cubierta con dos tipos de glucoproteínas o antígenos de superficie: Hemoaglutininas (H) y Neuraminidasas (N), que determinan el subtipo del virus (Pensae, 1989; Morilla A *et al.*, 2002).

Rhom C *et al.*, (1996) mencionan que los virus de influenza se clasifican en base a las glucoproteínas (hemoaglutinina y neuraminidasa) expresadas en su superficie, hoy en día 15 Hemoaglutininas y 9 Neuraminidasas han sido detectadas en aves silvestres y gallinas en el mundo. Sin embargo Fouchier *et al.*, en 2005 utilizando secuenciaciones genéticas, análisis filogenéticos y el clásico ensayo de inmunodifusión doble llevaron a cabo la identificación de la hemoaglutinina 16 del virus de influenza en la gaviota de cabeza negra ubicada en Suecia.

En cerdos, tres subtipos del virus de influenza tipo A, (H1N1, H1N2 y H3N2) han sido consistentemente identificados en diferentes países. En Estados Unidos de Norteamérica la enfermedad clínica había sido asociada principalmente con el subtipo H1N1 (Chambers *et al.*, 1991), sin embargo, a finales de 1998 varias granjas de cerdos, al oeste de ese país experimentaron severos problemas respiratorios y reproductivos ocasionados por la infección del virus de influenza porcina subtipo H3N2 (SIV), que fue aislado de cerdos clínicamente afectados (Zhou *et al.*, 1999; Webby *et al.*, 2000) y en noviembre de 1999 en el estado de Indiana se reportó el aislamiento del subtipo H1N2 a partir de muestras obtenidas de un brote en donde se observaron problemas respiratorios y abortos.

En la actualidad, los subtipos H1N1 y H3N2 del virus de influenza porcina coexisten en las poblaciones de cerdos en los Estados Unidos y se demostró que el virus H1N2 es una segunda generación de los subtipos H1N1 y H3N2 (Karasin *et al.*, 2000).

2.2 Estructura viral

Murphy y Webster, en 1996 reportaron que el genoma del virus de Influenza tipo A está constituido por 8 segmentos de una cadena simple de RNA que codifican 10 proteínas (Taylor, 1999).

Los segmentos 1, 2, y 3 de la cadena simple del RNA codifican las proteínas PB1, PB2 y PA, que tienen actividad polimerasa y son las responsables de la replicación y transcripción del RNA viral (Taylor, 1999).

El segmento 4 del RNA codifica para las Hemoaglutininas (HA), las cuales son glucoproteínas que se localizan en la superficie del virus, tienen forma de barra, miden de 10 a 15 nm de largo y son aproximadamente 500 HA las que revisten al virus.

En estudios realizados por Celedón *et al.*, (2000) sugieren que las epidemias de influenza están asociadas con los cambios antigénicos de esta estructura.

Principales características y funciones de la hemaglutinina:

1. En ella radica la especificidad de infección de especie y tejido.
2. La secuencia de aminoácidos o regiones de su estructura está asociado con la virulencia del subtipo viral.
3. Se une a receptores específicos que contienen ácido siálico localizado en la superficie de la célula.
4. Es el mayor antígeno del virus e induce la producción de anticuerpos neutralizantes.

El segmento 5 del RNA codifica la nucleoproteína o nucleocápside (NP), que es uno de los antígenos específicos para cada tipo del virus de influenza (A, B o C), además es la proteína que tiene mayor interacción con el RNA viral.

El segmento 6 del RNA codifica las neuraminidasas (NA). Estas son las segundas glucoproteínas del virus de influenza tipo A y son aproximadamente 100 las NA presentes en la envoltura del virus, cada una de ellas está conformada por una cabeza que es enzimáticamente activa y una región en forma de tallo que le permite acoplarse a la membrana de la célula. La actividad enzimática de la NA remueve el ácido siálico presente en la membrana celular de las hemoaglutininas del virus para liberar la progenie de viriones a partir de la célula huésped facilitando la propagación del virus.

El segmento 7 del RNA codifica dos tipos de proteínas la M1 y M2. La primera proteína M1 ó proteína de Matriz es el polipéptido mas abundante del virus, constituye la base de la envoltura lipídica y provee de rigidez a la membrana viral ya que se localiza dentro de la envoltura lipídica, además interactúa con las glucoproteínas HA, NA, proteína M2 y con las ribonucleoproteínas (RNPs).

La proteína M2 es una proteína integral de membrana del virus que se expresa de manera abundante en la superficie de la célula que ha sido infectada. La proteína M2 forma canales de iones activos los cuales son altamente específicos para protones (H⁺) (Hay, 1992).

El segmento 8 del RNA codifica para las proteínas NS1 y NS2. Para este segmento Wang *et al.*, (2000) reportan que la proteína NS1 inhibe la síntesis de interferones y Richardson *et al.*, (1991) indican que la proteína NS2 se expresa en grandes cantidades en el núcleo de las células infectadas regulando la exportación de proteínas a partir de su núcleo.

2.3 Replicación viral

Las hemoaglutininas del virus de influenza se unen a receptores específicos presentes en la membrana celular del huésped, estos receptores son: el ácido N – acetilneuramínico α 2,3 galactosa para las aves, el ácido N – acetilneuramínico α 2,6 galactosa para el ser humano y ambos el ácido N – acetilneuramínico α 2,3 y α 2,6 galactosa para el caso del cerdo, dichos receptores son una llave determinante en la restricción de la transmisión del virus de influenza directamente de las aves a los seres humanos sin mutaciones en el sitio de unión de las hemoaglutininas del virus con el ácido siálico presente en la membrana celular (Rogers *et al.*, 1983).

Después de que las hemoaglutininas se unen y con un alto grado de especificidad a los receptores de la membrana celular comienza el proceso de endocitosis, la endocitosis se lleva a cabo por medio de cavidades denominadas endosomas, las cuales se caracterizan por tener un pH cercano a 5.0, pH que estimula los canales de iones activos del virus asociados a la proteína M2, para permitir el flujo de iones del endosoma hacia el interior del virus para desestabilizar la unión proteína – proteína y liberar las ribonucleoproteínas (RNPs) de la Proteína Matriz (M1). Las RNPs virales liberadas en el citosol se dirigen y entran al núcleo celular a través de poros para iniciar la transcripción del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) la cual comienza cuando la endonucleasa de la RNA polimerasa segmenta o corta en el extremo 5' preferentemente en un residuo purina pequeñas ribonucleoproteínas de 12 – 15 nucleótidos de un mRNA celular o de un mRNA precursor en el núcleo, dicho oligonucleótido tendrá la función de cebador para la RNA polimerasa del virus, posteriormente los mRNA viajan al citosol llevando información genética para la síntesis de la Nucleoproteína (NP) y la Proteína M1 de manera directa. Los mRNA codifican en la mayoría de los casos una proteína, sin embargo algunos mRNA pueden ser leídos para producir dos proteínas distintas. (Taylor, 1999)

La síntesis de proteínas virales externas se llevan a cabo en el retículo endoplásmico rugoso y progresa a través del aparato de Golgi, para después ser expulsadas en una sola vesícula hacia la superficie de la célula infectada. (Pensae, 1989; Majno *et al.*, 1999; Taylor, 1999).

En el núcleo, el genoma viral negativo (-) produce copias de su mismo genoma positivo (+), con la finalidad de multiplicar su gen (RNA), después se une a NP's y a la proteína M1, para formar segmentos individuales que darán origen a la nucleocápside. A partir de este momento la partícula viral puede tomar forma y brotar a través de la membrana celular que ya ha sido cubierta por glucoproteínas o antígenos de superficie (HA y NA) y a su paso hacia el exterior adquirirlas para poder infectar otras células (Pensae, 1989; Majno *et al.*, 1999; Taylor, 1999).

2.4 Cambios genéticos

El estudio antigénico y genético del virus de influenza revela en la mayoría de los casos, una variación en la secuencia amínica de los antígenos de superficie HA y NA, siendo las primeras mas susceptibles (Celedón *et al.*, 2000).

Estas variaciones son producto de la baja fidelidad de la enzima ARN polimerasa durante el proceso de multiplicación en la etapa de lectura del genoma viral, esta falla produce una o varias mutaciones puntuales que pueden o no expresarse en el fenotipo de ambas glucoproteínas de superficie, confiriendo al virus la capacidad de evolucionar en cortos periodos de tiempo surgiendo nuevas cepas que

pueden emerger año con año como consecuencia de estos cambios denominados “pequeños cambios”, “deriva” o “drift antigénico” (Heinen, 2000; Savy, 2004).

La ventaja de la lectura del genoma con un alto grado de error se expresa en la habilidad del virus para adaptarse rápidamente al ambiente. Sin embargo el producto resultante de la mutación no proporciona una ventaja para la permanencia del virus en la naturaleza y estos se pierden. Pero si surgiera una mutante con ventajas sobre la cepa nativa, expresada, por ejemplo en un escape de la respuesta inmune generada por la cepa nativa, con la facilidad para multiplicarse en otro tipo de células y en menor o mayor grado de virulencia de la cepa; si el cambio surgido en la cepa variante es muy ventajoso, el nuevo virus podría desplazarse rápidamente entre nuevas especies o circular junto con la cepa preexistente (Celedón *et al.*, 2000).

Por otra parte el genoma del virus de influenza constituido por 8 segmentos de ARN, posibilita la formación de nuevos virus mediante la reasociación o intercambio de segmentos genéticos cuando se producen infecciones mixtas por virus con diferentes subtipos de HA o NA en un único huésped susceptible, este mecanismo denominado “cambio”, “reordenamiento” o “shift” genera nuevos subtipos del virus con hemoaglutininas o neuraminidasas diferentes a las que han estado circulando con anterioridad en alguna población y siendo esta susceptible al nuevo subtipo generado, se puede expandir rápidamente pudiendo producir una pandemia (Heinen, 2000; Savy, 2004).

Marozin *et al.*, en 2002, revelaron en un estudio los paralelismos entre la genética y la deriva antigénica del H1N1 en cerdos y humanos, con relación a la contribución del resurgido genético de la diversidad antigénica y genética de los virus de la Influenza porcina y la importancia del complemento de los genes internos en la evolución de esta epizootia.

2.5 Epidemiología

Autores como Plonait y Bickhardt, (2001) y Savy, (2004) mencionan que en las zonas templadas del hemisferio norte y el hemisferio sur el virus de influenza circula virtualmente todos los inviernos y en las regiones tropicales y subtropicales la enfermedad ocurre generalmente durante todo el año, aunque también pueden observarse picos estacionales.

El cerdo se describe como especie reservoria de los virus de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2, ya que se han detectado en condiciones endémicas en dichas poblaciones (Tang *et al.*, 2002).

Sin embargo, el principal reservorio del virus de influenza tipo A lo constituyen las aves acuáticas de vida silvestre, predominantemente patos, gansos y gaviotas de las cuales se han aislado las 16 HA (H1 a H16) y 9 NA (N1 a N9) descritas hasta el momento y con un gran número de combinaciones.

El virus infecta a las células que cubren el tracto gastro-intestinal de estas aves sin causarles daño aparente, estas lo excretan en altas concentraciones en heces hasta por 30 días. La naturaleza avirulenta de la infección por virus influenza en patos y aves acuáticas es el resultado de la adaptación del virus a su huésped por muchos siglos, para crear un reservorio que asegure su perpetuidad. El comportamiento migratorio de las aves acuáticas y la habilidad del virus para persistir en aguas frías de los lagos contribuye a que las aves acuáticas formen un inmenso reservorio del virus de influenza en la naturaleza (Heinen *et al.*, 2000; Savy, 2004).

La transmisión del virus se realiza por vía fecal-oral y el momento de mayor excreción ocurre cuando las aves dejan el lugar de nidada y comienzan su migración anual (Bachmann, 1989; Savy, 2004) infectando lagos y reservas naturales. A partir de los reservorios naturales algunas veces los virus son transmitidos a huéspedes de otras especies como son las aves de corral, cerdos, caballos, mamíferos marinos y el ser humano produciéndoles infecciones.

Rogers *et al.*, (1983) reportaron que el virus de influenza de las aves y humanos reconocen y se unen a receptores específicos que contienen moléculas de ácido siálico presentes en la superficie de la membrana celular en el epitelio respiratorio, estos receptores son el Ácido N-acetilneuramínico α 2,3 galactosa en las aves y el Ácido N-acetilneuramínico α 2,6 galactosa en los humanos.

Kawaoka *et al.*, (1989) reportaron que el virus que ocasionó las pandemias de 1957 y 1968, tenía genes provenientes de virus de aves y humanos. Ito *et al.*, en 1998., determinaron la presencia o ausencia de los receptores NeuAc α 2, 3Gal y NeuAc α 2, 6Gal en el colon de un pato F1 (Pekín, *Anas platyrhynchos* domésticos y Mallard, *Anas platyrhynchos platyrhynchos*) y en la traquea de un cerdo F1 (líneas Landrace y Duroc) haciendo reaccionar específicamente la lectina *Sambucus nigra* con el receptor NeuAc α 2, 6Gal y la lectina *Maackia amurensis* con el receptor NeuAc α 2, 3Gal.

Los resultados mostraron que el intestino de los patos generó una fuerte reacción en el sitio de unión con M. amurensis lectina (específica para NeuAc α 2, 3Gal) y no con S. nigra lectina (específica para NeuAc α 2, 6Gal) mientras que la traquea de los cerdos mostró una fuerte reacción en los dos sitios de unión (NeuAc α 2, 3Gal y NeuAc α 2, 6Gal) evidenciando que los cerdos pueden ejercer la función de mezcladores biológicos y crear nuevos subtipos del virus de influenza que pudieran tener la capacidad de infectar a las aves-humanos y generar nuevas pandemias, debido a que la traquea de los cerdos posee los receptores de virus de aves y humanos, esto explica la posibilidad de infección con virus de distintos orígenes, como la transmisión ocasional de virus de cerdo al humano que raramente se propaga de humano a humano (Claas *et al.*, 1994).

En México es probable que el subtipo H3N2 se introdujera por medio de la importación de pie de cría desde Estados Unidos, en el año 2001 se importaron 34,900 cerdos y el año 2003 solo 19,500 (Chávez, 2005).

2.6 Patogenia

El epitelio del tracto respiratorio superior, de forma normal está recubierto por células de la membrana basal, también conocidas como células de reserva, células secretoras de moco y células ciliadas. La principal función es dar revestimiento a la mucosa del tracto respiratorio, proteger y capturar a las partículas extrañas (bacterias, virus y desechos celulares) inhaladas en el moco y arrastrarlas hacia el exterior a través de los movimientos brownianos generados por los cilios (Majno *et al.*, 1999; Morilla *et al.*, 2002).

El virus de influenza porcina se encuentra principalmente en las secreciones del tracto respiratorio de los cerdos, que presentan un curso agudo de la enfermedad.

Se transmite por vía aerógena o por contacto directo y se absorbe por vía oro nasal. Las partículas virales (100,000 – 1, 000,000 por gota) presentes en los aerosoles expulsados de cerdos infectados son inhaladas y atrapadas en la carpeta mucociliar de cerdos susceptibles en donde, a través de receptores especiales, las partículas virales penetran a las células para replicarse en su interior, se replican en las células de la mucosa nasal, tonsilas, traquea, linfonodos traqueobronquiales y pulmones, siendo estos últimos el principal órgano blanco.

En el periodo de incubación que tarda entre 18 – 72 horas se ha observado que el virus mata rápidamente a las células ciliadas y a las células productoras de moco, la lámina propia se inflama y el exudado supura a través del espacio de las células basales, explicando la característica secreción cristalina y el sonido de moqueo en esta fase, cabe mencionar que en esta etapa, entre las 24 – 48 horas después de la infección, los títulos virales presentes en la tráquea y secreciones nasales de cerdos infectados son elevados, existiendo suficientes viriones para dar inicio a una nueva infección (Straw *et al.*, 1999; Majno y Joris, 1999; Plonait y Bickhardt, 2001).

Entre 5 y 10 días después de la infección, las células basales se diferencian en células productoras de moco y no habiendo suficiente cantidad de cilios para remover el moco se escucha un resoplido, se observa escurrimiento nasal y tos en esta etapa, la reparación completa del tejido dura aproximadamente 2 semanas o un poco antes, en pacientes que han sufrido una infección previa (Plonait y Bickhardt, 2001).

Estudios de inmunofluorescencia en muestras de tejido pulmonar demostraron la rápida replicación del virus y su alto tropismo para el epitelio bronquial, a 2 horas post-infección el antígeno se detecta en las células del epitelio bronquial, a 4 horas en el septo alveolar, a 16 horas en las células del epitelio bronquial y en un periodo de 24 – 72 horas el virus alcanza su máxima concentración en los bronquios, ductos alveolares y alvéolos. Después de 72 horas la concentración del virus empieza a disminuir y al noveno día post-infección no se observa fluorescencia en bronquios, bronquiolos, ductos alveolares y alvéolos (Straw *et al.*, 1999; Plonait y Bickhardt, 2001).

Es en este momento que se observa la máxima respuesta celular del epitelio bronquial, septo alveolar, área peribronquial y perivascular; después de 2 semanas post-infección los cerdos llegan a recuperarse de la enfermedad (Pensae, 1989; Straw *et al.*, 1999).

2.7 Signos clínicos

El virus de influenza ocasiona una común pero importante enfermedad respiratoria en los cerdos de todo el mundo, generando de manera súbita fiebre, anorexia, letargia, escurrimiento nasal, estornudos, tos y disnea principalmente (Easterday y Hinshaw, 1992), la muerte de algunos cerdos se puede presentar de manera esporádica, pero lo que si se hace evidente es el retraso en el crecimiento de los cerdos que han sido infectados (Janke, 1998).

Múltiples factores como el estado inmunológico, edad, nutrición, presión de infección, condiciones climáticas y las características de las casetas que albergan a los cerdos pueden determinar la severidad de los signos clínicos ocasionados por el virus de influenza, sin embargo se ha corroborado que los signos clínicos observados actualmente son los mismos que fueron descritos en el año de 1920. Después de un periodo de incubación de 1 a 3 días, los signos de enfermedad aparecen rápidamente en todos o la mayoría de los cerdos, la postración la apatía y la anorexia son comunes en todas las edades, los animales no se mueven y tienden a estar juntos, Pueden presentar fiebre de 41 a 42.5°C.

Los animales enfermos tosen especialmente cuando los alteran, su respiración es arrítmica y es común ver un tipo de respiración abdominal. En la auscultación se encuentra un ruido bronquial en los periodos de exhalación y cuando los animales tosen se colocan en una posición xifocica. Presentan rinitis, descarga nasal, estornudos y en ocasiones conjuntivitis. Generalmente tienen debilidad muscular y dolor acompañado con malestar. La pérdida de peso es aparente en todos los cerdos enfermos. Después de estar enfermos de 3 a 6 días, los cerdos se recuperan tan rápidamente como se enfermaron, normalmente el hato esta de pie y alimentándose normalmente 7 días después de la aparición de el primer signo de la enfermedad. (Pensae, 1989; Taylor, 1999).

Productores y veterinarios ocasionalmente han reportado problemas reproductivos como abortos, lechones nacidos muertos e infertilidad, especialmente cuando se encuentra el virus de influenza subtipo H3N2, sin embargo no existe información suficiente que concluya que el virus de influenza tiene un efecto específico y significativo en estos parámetros reproductivos (Plonait y Bickhardt, 2001; Morilla *et al.*, 2002).

En 1996 un estudio longitudinal en Holanda, demostró que la infección y los signos clínicos de la enfermedad predominantemente ocurrían cuando los cerdos pesaban 50 kg o tenían alrededor de 18 semanas de edad, que la mayoría de los cerdos que habían adquirido inmunidad como resultado de una infección previa no se veían afectados por la enfermedad o la cursaban de manera subclínica debido a la presencia de anticuerpos y que las infecciones con los subtipos H1N1 y H3N2 son clínicamente parecidas (Laval *et al.*, 1991; Castro *et al.*, 1988).

Se sabe que la morbilidad es del 100% pero la mortalidad es baja, comúnmente menor al 1% (Taylor, 1999), a menos de que los cerdos sean muy jóvenes o existan infecciones secundarias ocasionadas por bacterias como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* y

Streptococcus suis tipo 2 y compliquen la severidad y curso de la infección con influenza porcina tipo A subtipos H1N1 ó H3N2 (Pensae, 1989).

A nivel experimental cerdos de aproximadamente 100 kg de peso fueron inoculados intratraquealmente con cualquiera de los dos subtipos virales (H1N1 o H3N2) 24 horas después de la infección se observaron signos clínicos como fiebre, anorexia y disnea, después de un periodo de 5 – 8 días los cerdos perdieron en promedio de 5 – 6 kg y también observaron que los cerdos inoculados por vía oro nasal manifestaron la enfermedad de manera subclínica y que ambos virus de influenza utilizaron el mismo sitio de replicación en el tejido pulmonar (Maes *et al.*,1984).

Choi *et al.*, (2004) examinaron los signos clínicos de la infección viral y transmisión de la influenza porcina subtipo H1N2 en cerdos seropositivos, lo inoculó intranasalmente, observó tos y aumento de temperatura en los cerdos que inoculo pero no en los que estuvieron en contacto con estos, detectó la eliminación del virus por 3 a 5 días encontró virus e traquea, pulmón y linfonodos. Y los títulos de anticuerpos contra los tres subtipos fueron decreciendo, concluyendo que no se observó protección contra la infección viral en aquellos cerdos con anticuerpos maternos, sin embargo no se desarrollo la enfermedad clínica, por lo que recomienda las buenas prácticas de manejo y la vacunación contra el subtipo H1N2 deben ser considerados.

2.8 Lesiones macroscópicas y microscópicas

La lesión más característica encontrada en una infección por el virus de influenza no complicada es una neumonía de tipo viral, la cual con mucha frecuencia está limitada con una línea bien definida a los lóbulos apicales y cardiacos de los pulmones, aunque en algunos casos más de la mitad de los pulmones pueden verse afectados. Las áreas afectadas de los pulmones presentan depresiones con áreas de consolidación que van de color rojo oscuro a púrpura contrastando marcadamente con el tejido normal con evidente edema interlobulillar claramente las vías aéreas superiores están dilatadas, llenas de fluidos sanguinolentos y exudado fibrinoso y los nódulos linfáticos, bronquiales y mediastínicos se observan incrementados de tamaño, en casos severos más de la mitad del pulmón se puede ver afectado y existir pleuritis fibrinosa (Easterday, 1999).

Morin *et al.*, 1990; Girard *et al.*, 1992; Dea *et al.*,1992 reportan que las lesiones de los pulmones de cerdos afectados con el virus de influenza porcina subtipo H1N1 se mostraban de color gris o rojo con una confluyente consolidación del lóbulo craneal, lóbulo medio y la parte media baja de los lóbulos caudales, sin embargo Bikour *et al.*,

1994, describe que el virus aislado a partir de los pulmones de cerdos con este tipo de lesiones fue el virus de influenza subtipo H3N2, por lo que el factor responsable de esta patología no es claro todavía.

Diferencias en el grado de lesión y severidad han sido observadas con diferentes variantes de los virus de influenza circulantes en Europa, los subtipos H1N1 y H3N2 que circularon en 1986 produjeron lesiones mínimas macroscópicas, como ligeras neumonías intersticiales, en cambio, la variante más reciente del virus de influenza subtipo H1N1, produjo marcadas lesiones macroscópicas y cambios histopatológicos más severos como la necrosis del epitelio bronquial e infiltración de neutrófilos hacia el alveolo, lo que sugiere un incremento en la patogenicidad del subtipo H1N1 presente en Europa comparado con el clásico subtipo H1N1 circulante en los Estados Unidos (Brown *et al.*, 1993; Done *et al.*, 1994).

Las lesiones microscópicas ocasionadas por el virus de influenza en el tejido pulmonar consisten en una degeneración y necrosis de bronquios y bronquiolos, presencia de exudado formado por células descamadas, neutrófilos, y monolitos en el lumen alveolar, variable hiperemia con dilatación de los capilares e infiltración de linfocitos, histiocitos y células plasmáticas al septo alveolar, atelectasia alveolar diseminada, neumonía intersticial y enfisema (Bachmann, 1989).

Pravina K. *et al.*, (2006) encontraron que los lechones que fueron vacunados a las 3 y 5 semanas de edad con una vacuna bivalente de virus completo inactivado y desafiados a las 7 semanas de edad con 10 ml of $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml de un virus heterólogo de influenza porcina subtipo H1N1 por vía intratraqueal y que nacieron de cerdas vacunadas con dos dosis de una vacuna bivalente de virus inactivado antes del parto fueron sacrificados para la necropsia 14 días después de la infección. Encontrando que este grupo de cerdos tenía lesiones (consolidaciones pulmonares que van de un color púrpura a negro con áreas bien demarcadas) pulmonares más severas en comparación con los cerdos que nacieron de hembras no vacunadas pero que si fueron vacunados a las 3 y 5 semanas de edad y de los cerdos que no fueron vacunados pero que nacieron de hembras vacunadas bajo el mismo esquema que el primer grupo.

2.9 Respuesta inmune

La respuesta inmune contra de la infección del virus de influenza porcina no se conoce completamente, se sabe que la mucosa del tracto respiratorio genera la primera barrera de defensa en contra de este agente a partir de la secreción específica de inmunoglobulinas tipo A (IgA) que no permiten que el virus infecte y se replique en este tejido (Taylor y Dimmock, 1985).

El anticuerpo específico contra el virus de influenza porcina presente en infecciones primarias y secundarias es la Inmunoglobulina tipo A por la correlación que existe entre la presencia de IgA y la protección contra la enfermedad. (Clements, 1986)

A través del tiempo se ha observado que cerdos recuperados de la infección con el virus de influenza porcina tipo A, quedan completamente protegidos contra las siguientes infecciones con el mismo subtipo, sin embargo la naturaleza de la respuesta inmune que confiere la protección no ha sido totalmente comprendida, actualmente existen vacunas comerciales de virus completos inactivados, que reducen la severidad de la enfermedad, pero como se ha mencionado en capítulos anteriores las vacunas no proveen una amplia protección como la obtenida después de la infección con el virus de campo (Macklin, 1998).

Larsen *et al.*, (2000) encontraron que la excreción viral a través de las secreciones nasales en 15 cerdos infectados con 2×10^5 de EID₅₀ Sw/IN del virus de influenza porcina subtipo H1N1 alcanzaron títulos de $10^{7.5}$ EID₅₀/ml durante los primeros 5 – 7 días después de la infección, que los cerdos inoculados presentaron signos clínicos ligeros como tos, estornudos y descargas nasales. 42 días después de la primera infección 3 cerdos fueron desafiados nuevamente al virus y no mostraron signos clínicos de la enfermedad ni se identificó excreción viral.

Utilizando las pruebas de ELISA e IH encontraron que los máximos niveles de IgG e IgA se dan 14 días después de la primera infección y que en cada medición realizada los títulos de IgA se encontraron de 2 – 4 veces mas bajos que los títulos de IgG y que ninguna de las dos inmunoglobulinas incrementaron substancialmente sus títulos después de llevara a cabo una re-infección, también reportan que en la mucosa de las vías respiratorias bajas los títulos de IgA fueron consistentemente más elevados que los títulos de IgG, que los títulos máximos de IgA en promedio fueron de 640 en el día 14 y de IgG la máxima concentración de títulos en promedio fue de 56 en el día 21 después de la infección. Los títulos de IgA alcanzaron niveles por arriba de 4,000 en el día 14 después de la primera infección y se redujeron en el día 42 e incrementaron nuevamente a 4,000 después de llevar a cabo una re-infección (Larsen *et al.*, 2000).

Asimismo encontraron que el número de células productoras de IgG en la mucosa nasal alcanzó un nivel máximo de $550/10^6$ en el día 21 después de la

infección mientras que el número de células alcanzadas en otros tejidos no se detectó tan fácilmente o fue marcadamente bajo ($<60/10^6$ cel) y el número de células productoras de IgA en la mucosa nasal alcanzó niveles de $3000/10^6$ células en el día 14 después de la infección mientras que el número de células alcanzados en otros tejidos no excedió de $100/10^6$ células y utilizando la prueba de ELISPOT encontraron que el mayor número de células productoras de Interferones se encuentran predominantemente en los linfonodos traqueobronquiales en el día 21 después de la infección.

2.10 Diagnóstico

Se puede sospechar de influenza cuando una granja de cerdos presenta problemas respiratorios agudos y la mayoría o todos los cerdos del hato se ven afectados especialmente en las estaciones frías o al inicio del invierno, sin embargo el diagnóstico debe ser confirmado a través de pruebas serológicas, aislamiento y/o identificación viral, pues la enfermedad de influenza debe diferenciarse de una variedad de enfermedades respiratorias que afectan a los cerdos, así mismo los signos clínicos generados por la enfermedad, no se asocian a un subtipo en particular, por lo que la subtipificación del virus debe determinarse con pruebas específicas de laboratorio (Álvarez *et al.*, 2004).

2.10.1 Aislamiento viral

El virus puede ser aislado a partir de secreciones nasales y tejido pulmonar proveniente de animales que han muerto o han sido sacrificados en la fase aguda de la enfermedad. El tejido pulmonar se macera con solución salina fisiológica, se centrifuga, se colecta el sobrenadante, se filtra y el inóculo obtenido se utiliza para infectar cultivos celulares de la línea Madin-Darvy Canine Kidney (MDCK), y/o embriones de pollo de 9 – 10 días de edad.

El virus de influenza por lo regular no mata a los embriones de pollo por lo que el líquido alantoideo es colectado después de 72 horas de incubación, para evaluar su habilidad de aglutinar glóbulos rojos de ave, la cual es evidencia presuntiva de la presencia de un virus de influenza, el subtipo de la hemoaglutinina se determina con la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH) y el subtipo de la neuraminidasa es determinada por la prueba de la inhibición de la neuraminidasa (IN), (Murphy *et al.*, 1996). De forma similar Bikour *et al.*, en 1994 describieron la caracterización antigénica de una nueva cadena de el virus de Influenza A (A/swine/Saint-

Hyacinte/150/90), utilizando anticuerpos policlonales cultivados en pollos contra 13 subtipos del virus (Bikour *et al.*, 1994)

El aislamiento viral ha traído muchos avances en el conocimiento de la enfermedad, por ejemplo en Korea ya se había reconocido por medio de serología presencia del subtipo H3N2 pero no se había aislado y en 1996 se logro estandarizar el aislamiento de H1N1 de casos clínicos y H3N2 en cerdos.

2.10.2 Pruebas serológicas:

2.10.2.1 Inhibición de la hemoaglutinación

Las hemoaglutininas presentes en la superficie del virus pueden ser bloqueadas por la presencia de anticuerpos dirigidos contra los determinantes antigénicos específicos responsables de la unión con eritrocitos, evitando el fenómeno de la hemoaglutinación y haciendo evidente la sedimentación de los glóbulos rojos en el fondo del pozo de la placa, formando el característico botón rojo.

La técnica de inhibición de la hemoaglutinación es altamente sensible y específica, debido a que únicamente mide aquellos anticuerpos dirigidos contra la hemoaglutinina viral. La rapidez, sensibilidad, especificidad y costo mínimo de la técnica hace que sea empleada en muchos laboratorios para la caracterización de virus o anticuerpos

Además es la prueba serológica mas común para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de influenza, se basa en la unión del anticuerpo con la hemoaglutinina para evitar que el virus se una a los eritrocitos (Murphy *et al.*, 1996), sin embargo, en el laboratorio se debe considerar la posible presencia de inhibidores y aglutininas no específicas contenidas en el suero que pueden interferir con el resultado, la prueba de IH se considera sensible, específica, simple, barata, rápida y ampliamente utilizada tanto para la identificación de virus como para la identificación y cuantificación de anticuerpos (Burleson *et al.*, 1999).

Pravina K. *et al.*, (2006) utilizaron la prueba de inhibición de la hemoaglutinación para determinar los títulos de anticuerpos presentes en los sueros de lechones que nacieron de cerdas vacunadas con dos dosis de una vacuna bivalente de virus inactivado antes del parto, los títulos de anticuerpos encontrados contra los dos principales subtipos del virus de influenza a las 7 semanas de edad fueron de de 1:80 y que gradualmente fueron declinando a títulos de 1:10 cuando cumplieron 10 semanas de edad.

También observaron que los lechones que nacieron de hembras bajo el esquema de vacunación antes mencionado y que fueron vacunados a las 3 y 5 semanas de edad no mostraron un incremento en los títulos de anticuerpos 1 día antes de la segunda vacunación y en contraste los lechones que tuvieron el mismo manejo pero que provenían de hembras no vacunadas mostraron un incremento significativo en los títulos de anticuerpos identificados con la prueba de IH un día antes (5 semanas de edad) y dos semanas después de la segunda aplicación de la vacuna (7 semanas de edad). También encontraron que después del desafío con el virus de campo incrementaron los títulos de anticuerpos sin importar el manejo que se les haya dado a los cerdos.

2.10.2.2 ELISA

La técnica de ELISA es considerada como la prueba serológica más sensible y precisa. Takimoto *et al.*, (1991) utilizaron un anticuerpo específico para un antígeno específico, puede identificar un anticuerpo desconocido con un antígeno conocido o un antígeno desconocido con anticuerpo conocido, las configuraciones del inmunoensayo están hechas para detectar antígenos o anticuerpos.

Richt *et al.*, (2006) analizaron las propiedades antigénicas y patogénicas de cada grupo de virus, determinó a través de la inhibición de la hemoaglutinación y ensayos de neutralización utilizando suero hiperinmune derivado de cesáreas, cerdos privados de calostro revelaron que el grupo I y grupo III de H3N2 comparten el mismo epitopo, mientras que el grupo II esta limitado a una reacción cruzada. Se observó una correlación entre la edad y la severidad de la enfermedad, estos datos revelan el incremento de la diversidad de los virus de influenza porcina en estados unidos y podrían ser indicadores de que el reconocimiento puede ser intensificado, determinando así los componentes mas adecuados para la vacuna.

Reeth *et al.*, (2006) realizaron un estudio para determinar si la prueba de IH es suficientemente especifica para discriminar entre las infecciones con los tres subtipos de Influenza porcina y concluyeron que la prueba de IH es adecuada para el diagnóstico diferencial de la infecciones por H1N1, H3N2 y H1N2 en una población europea si es usada adecuadamente y si el estado de vacunación es tomado en cuenta, además encontraron que aquellos cerdos que se encontraban infectados con H1N1 pero no con H1N2 desarrollaban una reacción cruzada de anticuerpos para H1N2 después de la vacunación.

2.10.3 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia (IF) se considera un método simple, altamente específico y rápido para identificar y localizar al virus de influenza en el tejido pulmonar o en el epitelio nasal de animales infectados. La IF directa requiere de anticuerpos específicos para cada virus que se quiere identificar, este método es más específico y se requiere de menos experiencia en comparación a la IF indirecta, la IF indirecta requiere de un paso adicional, un antígeno desconocido es incubado con un anticuerpo desconocido (anticuerpo primario) para crear un producto desconocido, posteriormente es incubado con un anti-anticuerpo (anticuerpo secundario) conocido para crear un producto conocido. Este método es más sensible pero menos específico en comparación a la IF directa (Burleson *et al.*, 1999).

2.10.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80 (Evans, 2005). Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de DNA específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de DNA. Se basa en la actividad de la enzima polimerasa que fabrica una cadena de DNA complementaria a otra ya existente. Sus requerimientos son: oligonucleótidos, que son la materia base para fabricar el DNA y una pequeña cadena de DNA que pueda unirse a la molécula que se requiera copiar para que sirva como cebadora "primer". Esta reacción continúa en múltiples ciclos con condiciones adecuadas para la síntesis, cada uno dobla la cantidad de DNA sintetizado, es decir que se pueden tener múltiples copias de la región a estudiar a partir de una pequeña muestra. Con la PCR el DNA se puede amplificar o multiplicar de manera exponencial (Dorak, 2006).

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y una alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación (Dorak, 2006). La especificidad se le confiere a la reacción mediante el uso de sondas, en este caso oligonucleótidos de 13-27 nucleótidos que en las condiciones de reacción específicas disparan la síntesis. Los productos de la reacción son posteriormente analizados e identificados mediante un gel de electroforesis (Livak, 2001).

La presencia del virus también puede determinarse por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de exudados nasales (*ante mortem*) y de tejido pulmonar (*pos mortem*), comparado con el aislamiento viral y la detección de

anticuerpos con las técnicas de ELISA o IH, también permite identificar el subtipo o los subtipos presentes en las muestras mediante la técnica de PCR múltiple. Sin embargo, la poca demanda de la técnica y su costo elevado son un inconveniente para que se utilice como una herramienta de diagnóstico rutinaria (Choi *et al.*, 2002).

Choi *et al.*, (2002) realizaron dos ensayos múltiples de PCR en tiempo real (RT PCR), específicos para H1 y H3 y N1 y N2, los productos de RT PCR con tamaños y características únicas de cada subtipo de Influenza A fueron secuenciados y las secuencias fueron demostradas ser específicas para H1N1, H1N2 o H3N2. La amplificación positiva pudo ser visualizada con RNA extraído de una dilución de más de 10^{-5} de cada referencia, y estos resultados coincidieron al 100 % con el aislamiento viral, estos resultados demostraron la utilidad del ensayo de RT PCR para la detección e identificación de los subtipos del virus de la Influenza A.

Landolt *et al.*, (2005) evaluaron por medio de RT PCR un pool de hisopos nasales para la identificación de Influenza porcina antes del aislamiento del virus en cultivo celular. Encontraron que el uso de ensayos de RT PCR con el uso de cebadores y probarlo directamente contra la región conservada del gen M es un método muy sensible y un método específico para la detección de Influenza A en hisopos nasales. De hecho se detectaron cantidades desde 10^{-1} a 10^0 TCID₅₀ de referencias aisladas de influenza porcina incluyendo los virus cH1N1, rH3N2, rH1N2 y avH4N6 y esto es comparable a la sensibilidad reportada para la detección de los virus de influenza A o B por RT PCR anidado usando primers específicos para el gen M.

2.11 Tratamiento

No hay un tratamiento específico en contra de la infección del virus influenza porcina durante los brotes agudos, la terapia se limita a la administración de antipiréticos, antibióticos y en ocasiones expectorantes, así mismo la reducción de estrés, proporcionando una cama limpia, seca y libre de polvo, agua limpia y fresca y de acceso fácil (Pensae *et al.*, 1989; Easterday *et al.*, 1999) contribuyen en la prevención de infecciones secundarias.

2.12 Prevención y Control

Una estrategia adecuada para hacer frente a la enfermedad de influenza porcina debe comprender medidas de vigilancia, diagnóstico, cuarentena y vacunación (Taylor *et al.*, 1999).

- a) Limitar el acceso a personas y vehículos ajenos a la unidad de producción.
- b) Los trabajadores de la granja deben tomar un baño y los camiones de transporte propios deben ser lavados y desinfectados antes de entrar a las instalaciones
- c) Los animales recién llegados deben cuarentenarse antes de ser incorporados a la población de la granja, es decir seguir con las medidas estándares mínimas para prevenir que los animales susceptibles tengan contacto con los animales infectados
- d) Por el conocimiento de la transferencia ínter especie es importante que no haya contacto con otras especies, especialmente con aves, pero también es muy importante que un humano sospechoso de haber tenido influenza se excluya de tener contacto con los cerdos.
- e) Para minimizar las pérdidas reproductivas ocasionadas por la infección del virus de influenza porcina, se recomienda vacunar a las cerdas y verracos de reemplazo, así como a las cerdas preñadas antes del parto (Pensae *et al.*, 1989; Morilla *et al.*, 2002; Straw *et al.*, 1999).
- f) Las prácticas de bioseguridad son fundamentales para la prevención y control de la enfermedad ocasionada por el virus de influenza porcina (Taylor *et al.*, 1999). El manejo “todo dentro, todo fuera” previene la difusión de la enfermedad de un lote a otro, el uso de maya en las naves evita el contacto de los cerdos con las aves, es necesario que el personal y el equipo que entra y sale de las instalaciones, esté desinfectado apropiadamente y no se intercambie entre instalaciones.
- g) Una vez que un lote infectado ha sido removido, las instalaciones y equipo deben limpiarse, lavarse a fondo y desinfectarse.

2.13 Vacunación

Se ha demostrado que diversos tipos de vacunas contra influenza porcina reducen la signología clínica y la mortalidad, sin embargo, el virus de influenza es capaz de infectar y replicarse en cerdos vacunados clínicamente sanos (Soto *et al.*, 2004).

2.13.1 Vacunas convencionales

a) Vacunas vivas atenuadas:

Estas vacunas se encuentran constituidas por uno o varios agentes infecciosos vivos que producen la enfermedad, pero cuya virulencia ha sido atenuada, de tal manera que el virus tiene la capacidad de replicarse en los tejidos sin producir ninguna lesión secundaria y generar una respuesta inmune sólida que protegerá al cerdo cuando sea desafiado por el virus de campo. Los riesgos de este tipo de vacunas son que la atenuación no sea estable y el virus revierta a su forma virulenta o que de manera simultánea, los animales vacunados se vean infectados de manera natural por un virus de campo y el virus atenuado adquiera segmentos del genoma del virus de campo y se lleve a cabo una recombinación genética (Taubenberger *et al.*, 2005). Otro aspecto crítico es que al estar formada por agentes vivos es necesario mantener la cadena fría permanentemente, para evitar que el agente muera parcial o totalmente.

Heinen *et al.*, (2001) y Reeth *et al.*, (2004) han reportado que las vacunas de virus vivo modificado pueden generar protección cruzada entre los diferentes tipos del virus de influenza porcina debido a la síntesis de anticuerpos mediada por linfocitos CD4+, la destrucción de células infectadas a partir de linfocitos CD8+ y por la producción de citocinas (interferones),

Richt *et al.*, (2006) vacunaron cerdos utilizando una vacuna de virus vivo modificado del subtipo H3N2 y encontraron protección parcial después de la inoculación del virus de influenza subtipo H1N1, aunque no existiera reacción cruzada entre los subtipos en las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (IH), sin embargo cuando los cerdos recibieron una vacuna de virus vivo modificado del subtipo H1N1, si observaron una respuesta inmune cruzada en las pruebas de IH, también Heinen *et al.*,(2001) por vía intranasal infectaron cerdos con el virus de influenza subtipo H1N1 posteriormente los desafiaron con el virus de influenza subtipo H3N2 y observaron que los animales no presentaron signos clínicos ni transmitieron el virus a cerdos centinelas que se encontraban en la misma jaula.

2.13.2 Vacunas de virus inactivado

Las vacunas de virus inactivado han sido desarrolladas y probadas experimentalmente por varios investigadores, hay una considerable variación en la respuesta de anticuerpos y de protección ante una infección después de la vacunación.

Estas vacunas contienen agentes inactivados por métodos físicos o químicos, su principal ventaja frente a las vacunas de virus atenuado es su estabilidad y seguridad. En la industria porcina las vacunas bivalentes con virus muerto son las más utilizadas para prevenir o reducir los signos clínicos ocasionados por la infección con el virus de Influenza en los cerdos, las vacunas inactivadas generan una respuesta inmune mediada por linfocitos CD4+ y anticuerpos cuya efectividad en la protección de poblaciones de cerdos adultos jóvenes va del 70 – 90% (Macklin *et al.*, 1998; Lamb *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2002; Celedón *et al.*, 2000).

Otro factor a considerar es que los anticuerpos generados por la aplicación de vacunas de virus atenuado no se pueden diferenciar de los anticuerpos de animales que han sido infectados por el virus de campo, debido a que los biológicos contienen al virus completo y el sistema inmunológico detecta los mismos antígenos de superficie presentes en el virus vacunal y en el virus de campo, por lo tanto, su respuesta inmune es la misma.

2.13.3 Vacunas de nueva generación

a) Proteínas sintéticas o inactivadas (Vacunas de subunidades)

Las vacunas de proteínas sintéticas presentan un patrón de respuesta similar al de las vacunas de virus muerto convencionales, sin embargo requieren de una mayor concentración de antígenos para inducir en el cerdo una respuesta inmunológica semejante, su gran ventaja, es que al no estar formadas por la totalidad de la estructura del agente infeccioso, es posible diferenciar serológicamente los anticuerpos generados por la vacuna de los anticuerpos generados por el virus de campo (Macklin *et al.*, 1998; Landolt *et al.*, 2005, Castro *et al.*, 2004).

b) Vacunas vivas: deleteadas, recombinantes vivas y de ADN.

La particularidad de las vacunas fraccionadas o recombinantes es aún más importante porque al tratarse de vacunas vivas, presentan una mejor respuesta inmune en comparación con las vacunas de proteínas inactivadas, además los anticuerpos generados por estos biológicos también pueden diferenciarse de los anticuerpos generados por el virus de campo (Macklin *et al.*, 1998, Sánchez *et al.*, 2004).

Larsen *et al.*, (2000) utilizaron una vacuna de DNA, no encontraron diferencia significativa en los niveles de excreción viral después de la infección con el virus de campo en cerdos que recibieron dos aplicaciones de una vacuna que contenía el gen de la hemoaglutinina (HA) en un plásmido y cerdos que solo recibieron el plásmido sin el gen HA (Controles), en contraste los cerdos que recibieron el plásmido vector del gen HA como primera dosis y un refuerzo utilizando una vacuna convencional que contenía virus muerto de influenza subtipo H1N1 mostraron una evidente reducción en la excreción del virus, mismos resultados de los cerdos que fueron inmunizados con dos aplicaciones de la vacuna de virus muerto, también encontraron que los cerdos que recibieron dos aplicaciones de virus muerto tenían los títulos mas altos de Ig A e Ig G antes del desafío, seguidos de los cerdos que recibieron una vacuna con el gen HA y la otra con virus muerto y por último los cerdos que recibieron las dos vacunas con el gen HA y los controles.

Las vacunas de DNA inducen una respuesta inmunológica limitada (Macklin *et al.*, (1998) y Olsen *et al.*, 2000) y no reduce la excreción del virus después del desafío comparado con cerdos no vacunados (Ulmer *et al.*, 1993; Ulmer *et al.*, 1994; Deck *et al.*, 1997).

Slepushkin *et al.*, (1995) y Frace *et al.*, (1999) indican que la vacunación con el gen de la proteína M2 reduce la infección viral. Sin embargo Heinen *et al.*, (2001) Reportan que la aplicación de esta vacuna en los cerdos no genera ninguna protección contra la enfermedad ni reduce la excreción del virus después de la infección, al contrario los cerdos inmunizados con este gen presentaron signos clínicos mas severos en comparación con los cerdos no vacunados, por otra parte tampoco observaron diferencia significativa en los títulos serológicos obtenidos mediante la técnica de Inhibición de la hemoaglutinación entre los cerdos vacunados y no vacunados pero a través de ELISA si identificaron un ligero incremento en los anticuerpos dirigidos contra la proteína M2.

c) Vacuna bivalente

Es fundamental conocer la variante antigénica del virus que causa el brote y que la vacuna lo represente porque no hay protección cruzada entre los 15 subtipos de antígenos HA conocidos.

Los cerdos pueden ser vacunados a partir de la 3ra. Semana de edad o mayores, por vía intramuscular. La vacunación de todos los cerdos se recomienda para reforzar la inmunidad de la piara, deben recibir la segunda dosis tres semanas

después. En cerdos jóvenes, vacunar una vez que los anticuerpos maternos contra virus de influenza porcina, hayan declinado. La revacunación es anual con una sola dosis, es recomendada por el laboratorio fabricante.

Pravina *et al.*, (2006) reportaron que los lechones que nacieron de cerdas vacunadas con dos dosis de una vacuna bivalente de virus inactivado antes del parto fueron vacunados a las 3 y 5 semanas de vida y desafiados a las 7 semanas de edad con 10 ml de $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml de un virus heterólogo de influenza porcina subtipo H1N1 por vía intraqueal, 24 horas después de la infección se observaron signos clínicos como respiración abdominal, tos y fiebre (104 °F) durante 4 – 5 días y fueron mas severos en comparación con los signos clínicos observados durante 2 días en lechones que nacieron bajo las mismas condiciones pero que no fueron vacunados.

2.14 JUSTIFICACION

El virus de Influenza porcina tipo A, subtipos H1N1 y H3N2, son los principales causantes de la enfermedad conocida como gripe porcina en México, su importancia se debe a la rápida propagación del agente en el hato una vez que ha sido infectado, además de generar grandes pérdidas económicas debido al retraso en la ganancia de peso y a los tratamientos administrados para prevenir infecciones secundarias generadas por bacterias y virus. Por esta razón es necesario realizar estudios que nos permitan conocer la situación actual en explotaciones porcinas de México y con ello implementar programas de control.

III. HIPÓTESIS

La aplicación de una vacuna bivalente de virus inactivado de influenza porcina en hembras positivas a los dos principales subtipos reportados en México, reduce la presencia de Virus de Influenza Porcina en sus lechones, además de contribuir en la mejora de los parámetros reproductivos.

IV. OBJETIVOS

1. Conocer la prevalencia de animales positivos al virus de influenza porcina en una granja lechonera.
2. Identificar la seroconversión que confiere la aplicación de una vacuna bivalente del virus de influenza porcina.
3. Evaluar los parámetros reproductivos de animales vacunados y no vacunados.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ubicado en el municipio de Jilotepec, Edo. Méx. Se localiza en la zona noroeste del Estado de México, en las coordenadas 99°26'37" mínima y 99°44'02" máxima de longitud oeste; 19°52'02" mínima y 20°12'43" de latitud norte. Limita al norte con el estado de Hidalgo, al sur con los municipios de Chapa de Mota y Timilpan, al sureste con Villa del Carbón, al este con Soyaniquilpan de Juárez y el estado de Hidalgo, y al oeste con Polotitlán, Aculco y Timilpan.

La altura es de 1,670 metros sobre el nivel del mar. El clima está clasificado dentro del grupo de subclimas templados mesotérmicos; su temperatura oscila entre los 14°C y 29 °C, con 77 días de heladas, la precipitación pluvial media anual es de 700 y 800 milímetros cúbicos (INEGI).

5.1 Programa de vacunación

Antes de integrar a las hembras de reemplazo en el hato reproductor se les aplica una vacuna contra *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida*, las hembras del hato reproductor cada cuatro meses en sábana reciben una vacuna triple que las protege de Parvovirus porcino, *Leptospira* spp y *Erysipela rhusiopathiae* y a las hembras de 14 semanas de gestación se dosifican con Ivermectinas, como desparasitante.

5.2 Bioseguridad

La granja se encuentra rodeada por una barda perimetral que limita la entrada de personas y vehículos ajenos a las instalaciones, cuenta con tapetes sanitarios que permiten desinfectar las botas antes de entrar y salir de la granja o de cada una de las diferentes salas de la unidad de producción y las salas están protegidas con malla para evitar la entrada de las aves.

5.3 Estatus sanitario

De forma periódica se llevan a cabo monitoreos serológicos contra la Enfermedad de Aujeszky, Fiebre Porcina Clásica, Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, Enfermedad de Ojo Azul, Leptospirosis y Parvovirus Porcino, los resultados, para oficialmente negativa a la enfermedad de Aujeszky y negativa a las enfermedades antes mencionadas, pero positiva y con brotes esporádicos de salmonelosis, micoplasmosis y pleuroneumonía porcina.

Características y manejo de la unidad de producción.

Inseminación artificial

La granja tiene su propio centro de Inseminación artificial y se sigue el siguiente esquema de inseminación: Si la presentación del estro es en los tres primeros días post destete, la primera dosis de inseminación se aplica 24 horas después de haber iniciado el estro y la segunda dosis se aplica 12 horas después de la primera.

Sin embargo, cuando las cerdas presentan el estro entre los 4 a 6 días después del destete, la primera inseminación se realiza a las doce horas de haber detectado el estro y la segunda 12 horas después; pero si la presentación se retrasa, es decir, se presenta después de 7 días post destete, la primera inseminación se realiza en el momento de la detección del estro y la segunda dosis se aplica 12 horas después de la primera.

Gestación

La caseta de gestación mide 8.20m x 22.30m x 3m de altura en la parte menos alta y 3.40m en la parte más alta, cuenta con áreas de ventilación de 1.70m x 2.30m, tiene 8 jaulas que miden 62cm x 2.8m, cuenta con bebedero y comedero de canoa, con piso "slat" de cemento y una fosa.

La gestación temprana se diagnóstica a los 21 días después de la inseminación por el método de retorno al estro y se corrobora a los 35 días post inseminación utilizando un equipo de ultra sonido tipo doppler.

En el día 45 de la gestación las hembras son colocadas en parejas con un macho durante 6 horas aproximadamente en un corral que mide 6.20m x 5.10m, con el fin de que el macho establezca su jerarquía y las cerdas no peleen por alimento o agua cuando sean trasladadas a los corrales de gestación en donde permanecerán en pareja hasta 5 días antes del parto.

La alimentación de las cerdas gestantes consiste en un sistema restringido en el cual se distribuyen 3Kg de alimento en dos tomas, 1.5kg en la mañana y 1.5kg en la tarde y como último manejo en esta etapa las hembras se desparasitan a los 100 días de gestación con ivermectinas 1 ml /50 kg.

Maternidad

La granja cuenta con cuatro salas de maternidad que utilizan el sistema de manejo “todo-dentro, todo-fuera”, tiene pisos de “slat” de plástico y miden 6.80 m x 10 m; cada una con capacidad para ocho corrales de 2.34 m x 2.15 m, en cada corral se encuentra una jaula convencional de 90 cm x 1.90 con un comedero de 31 cm x 24, un bebedero de chupón y una lechonera de 56 cm x 1.24 m con dos entradas para los lechones de 25 cm x 30.5 y con un foco para proporcionarles calor, cada sala cuenta con dos ventanas de 1.18 m x 2.11 m que se pueden abrir y cerrar para el control de la temperatura interna.

Las hembras gestantes son llevadas a esta sala 5 días antes del parto, al momento del ingreso y a la salida de maternidad se pesan y se les mide la grasa dorsal, a los 113 días de gestación se les induce el parto con la aplicación de un análogo de PGF2 α que desencadena el proceso de parto entre las 24 y 36 horas postaplicación, después del parto se le aplican 2 ml de Lutalyze (10 mg Dinoprost de Pharmacia & Upjon), para estimular la involución uterina y la expulsión del loquios y son monitoreadas durante 3 días siguientes, sobre todo la temperatura corporal para detectar a tiempo, infecciones por retención placentaria o fetos.

Después que todas las hembras de cada sala de maternidad terminan con el proceso de parto, se abren los canales de la fosa del drenaje para eliminar los desechos y se vuelve a cerrar hasta el periodo de destete.

Al momento del nacimiento, a los lechones se les retiró la membrana fetal de la nariz y boca posteriormente se secó por completo, se pusieron en Mistral (Ecocert)

que es un talco secante de celulosa. Se ligó y desinfectó el cordón umbilical, se pesó e identificó por el sistema de muescas y se colocó bajo un foco infrarrojo, y dentro de los primeros 15 minutos posteriores al nacimiento se acercó a la hembra para que mamara calostro. En caso de que se realizaran donaciones, éstas se hicieron después de 12 horas de finalizado el parto y antes de que termine el primer día del mismo.

Al día 3 ó 4 de vida se realizó la castración, por incisión escrotal y se aplicaron 200 mg de hierro en la tabla del cuello y ese mismo día se les cambia el foco infrarrojo por un foco blanco de 200 watts.

A los 7 días se les coloca el comedero con poco alimento preiniciador Nupig 1 (Nutec), con el fin de que los lechones se familiaricen con el comedero y si llegan a probar se acostumbren al olor y sabor.

Destete

Las salas de destete cuentan con un sistema de manejo “todo dentro – todo fuera”, cuentan con 12 corrales cada una, cada corral tiene capacidad para 6 ó 7 lechones máximo, las medidas de la sala son de 5m x 10m, tiene 2 ventanas de 21m x 2.20m con malla pajarera, las dimensiones de la puerta son de 1.8 m x 2.08m, la altura es de 1.60 m en la parte baja y 2.5m en la parte mas alta y el techo es recubierto con poliuretano que sirve de aislante térmico y además cuenta con dos criadoras de gas en cada sala.

Cada corral tiene piso de rejilla, un bebedero de chupón y un comedero de 85cm x 16cm con 6 bocas, cada boca mide 11cm de diámetro, a la entrada de los lechones la fosa se encuentra limpia y seca y se vacía al finalizar destete.

Los lechones se acomodan por peso y talla los más pequeños se colocan alrededor de las criadoras y los más grandes a los extremos, se les pone el plato que tenían en maternidad con Nupig 1 evolution (Nutec) con menos de 50 grs / día /por cabeza para evitar diarreas, se alimentan poco y frecuente (4 veces al día), al agua se le adiciona ampicilina o florfenicol (según instrucciones del producto), vitamina C (instrucciones del producto) y 100 g de azúcar en 200 litros de agua.

La temperatura en esta sala es de 22-28°C, una noche antes se encienden las criadoras para que alcancen los 28°C, las criadoras se apagan a los 14 días por las mañanas se abren las cortinas y puertas para la ventilación y se encienden en la noche y a los 20 días se apaga definitivamente.

El tiempo de duración de los lechones en el destete es de 35 días (5 semanas), ingresan con un peso promedio de 6.5-7 kg y salen con un peso promedio de 20-22kg

5.4 Metodología

El estudio se realizó en varias etapas:

Etapa I. Determinación del número de animales positivos al virus de influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2 en la unidad de producción.

Se realizaron dos muestreos serológicos de tipo transversal, con un intervalo de tres meses. En el primer muestreo se tomaron muestras de sangre y en el segundo, se tomaron muestras de sangre y exudado nasal.

En el primer muestreo se tomaron muestras de 102 hembras y 230 lechones, y en el segundo de 85 hembras y 152 lechones.

Se obtuvieron muestras de sangre, a través de la vena yugular, en el caso de las hembras se utilizó una jeringa de 20 ml con aguja de 20 G y en el caso de los lechones y cerdos destetados se utilizó una jeringa de 10 ml con una aguja de 21 G.

Las muestras de sangre se dejaron coagular en la sombra y a temperatura ambiente, posteriormente se colocaron en una caja térmica con refrigerantes para su transporte al laboratorio en donde se refrigeraron a 4 °C hasta la separación del suero.

En el laboratorio, dentro de la campana de flujo laminar, los sueros contenidos en jeringas se pasaron a tubos de ensayo para centrifugarlos a 1500 rpm durante 10 minutos, de cada tubo se recuperó el suero libre de eritrocitos y se dividió en dos porciones, una para llevar a cabo la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (anexo 1 y 2) y determinar la presencia de anticuerpos específicos contra el virus de influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2 y la otra para determinar la presencia del material genético del virus utilizando la prueba de RT-PCR.

Se realizaron exudados nasales de ambas fosas con hisopos de algodón, los cuales fueron colocados de inmediato en tubos eppendorf de 2.0 ml, que fueron identificados y colocados en una caja térmica a 4°C.

De los hisopos nasales se formaron grupos de muestras, es decir que una vez extraído el RNA, se mezclaban aquellas muestras obtenidas el día del muestreo, número de parto, edad y número de destete en el que se encontraban los animales. Este procedimiento aseguraba la optimización del uso del kit para la prueba de RT - PCR (anexo 3) con el cual se identificó a los subtipos H1N1 y H3N2 del virus de influenza porcina tipo A. Las pruebas de las muestras se llevaron a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico del Departamento de Producción Animal Cerdos de la FMVZ, UNAM.

Primers para PCR diseñados por el Dr. José Iván Sánchez Betancourt

PRIMER H1 FORWARD:	5'GGG ACA TGT TAC CCA GGA GAT3'
PRIMER H1 REVERSE:	3'GCA TTG TAT GTC CAA ATA TCC A5'
PRIMER N1 FORWARD:	5'GGT TCC AAA GGA GAC ATT TTT G3'
PRIMER N1 REVERSE:	3'CTA TCC AAA CAC CAT TGC CAT A5'
PRIMER H3 FORWARD:	5'TAT GCC TGG TTT TCG CTC AA3'
PRIMER H3 REVERSE:	3'TTC GGG ATT ACA GTT TGT TG5'
PRIMER N2 FORWARD:	5'TGC GAT CCT GAC AAG TGT TAT C3'
PRIMER N2 REVERSE:	3'CAG ACA CAT CTG ACA CCA GGA T5'

Las variables de estudio en esta etapa fueron:

1. Proporción de animales positivos con la prueba de IH para los subtipos H1N1 y H3N2 en cada uno de los muestreos.
2. Número de sueros e hisopos positivos con la técnica de RT - PCR.

Etapa II. Determinación de la seroconversión mediante la aplicación de una vacuna bivalente inactivada del virus de influenza porcina.

En esta etapa se formaron dos grupos experimentales. El primer grupo (G1) se integró por 57 hembras las cuales fueron vacunadas y revacunadas a las 11 (1ª dosis) y 14 (2ª dosis) semanas de gestación con “Porcilis® End – FLUence 2” de laboratorios Intervet y el segundo grupo (G2) se formó por 25 hembras que recibieron a las 11 (1ª dosis) y 14 (2ª dosis) semanas de gestación solución salina fisiológica (SSF).

La toma de muestras de sangre e hisopo nasal de las cerdas de ambos grupos se realizó antes de la aplicación de la vacuna o de la solución salina fisiológica.

A los lechones nacidos de los dos grupos de hembras se les tomaron muestras de sangre para detectar anticuerpos y exudado nasal para identificar el material genético del virus, utilizando la prueba de inhibición de la hemoaglutinación y la prueba de RT - PCR respectivamente, a la 1ª y 4ª semana de edad.

Las variables de estudio en esta etapa fueron:

1. Evaluación de la curva de anticuerpos contra el virus de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 en hembras vacunadas y no vacunadas.
 - a. A las 11 semanas de gestación.
 - b. A las 14 semanas de gestación.
 - c. A los 7 días después del parto.

2. Evaluación de la curva de anticuerpos contra el virus de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 en lechones provenientes de hembras vacunadas y no vacunadas.
 - a. A los 7 días de edad
 - b. A los 28 días de edad

3. Número de sueros e hisopos nasales en los que se encuentra presente el virus de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 en hembras vacunadas y no vacunadas.
 - a. A las 11 semanas de gestación
 - b. A las 14 semanas de gestación
 - c. A los 7 días después de parir

4. Número de sueros e hisopos en los que se encuentra presente el virus de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 en lechones provenientes de hembras vacunadas y no vacunadas.

- a. A los 7 días de edad
- b. A los 28 días de edad

Etapa III. Evaluación de los parámetros reproductivos entre el grupo de hembras vacunadas y no vacunadas.

Los parámetros de desempeño reproductivo se obtuvieron a partir del software Pig Champ®.

- a. Numero de lechones por camada
- b. Lechones nacidos vivos (LNV)
- c. Lechones nacidos muertos (LNM)
- d. Fetos momificados (M)
- e. Peso total de la camada
- f. Peso promedio del lechón

A las variables de respuesta: peso, promedio de la camada y peso promedio del lechón se les realizó un análisis de covarianza con un diseño completamente al azar, tomando en cuenta el número de lechones nacidos vivos por camada como covariable.

El modelo empleado fue: $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta(x_{ij} - X_{..}) + E_{ij}$

Donde:

Y_{ij} = valor observado de la respuesta en estudio

μ = efecto de la media general

τ_i = efecto del i-ésimo tratamiento

β = coeficiente de regresión de $(x_{ij} - X_{..})$

x_{ij} = valor observado de la variable concomitante X

$X_{..}$ = valor de la media general de la variable concomitante X

E_{ij} = error experimental

Para las variables de respuesta número de lechones por camada, lechones nacidos vivos (LNV), lechones nacidos muertos (LNM) y fetos momificados (M), se utilizó un diseño completamente al azar.

El modelo empleado fue: $Y_{ij} = \mu + \tau_i + E_{ij}$

Donde:

Y_{ij} = valor observado de la respuesta en estudio

μ = efecto de la media general

τ_i = efecto del i-ésimo tratamiento

E_{ij} = error experimental

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el procedimiento GLM (General Linear Model) y se calcularon las medias de cuadrados mínimos para determinar la mínima diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos, mediante el paquete estadístico SAS® para Windows.

VI. RESULTADOS

6.1 Etapa I. Primer Muestreo

6.1.1 PORCENTAJE DE CERDAS SEROLÓGICAMENTE POSITIVAS AL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA TIPO A SUBTIPO H1N1.

A partir de los sueros analizados utilizando la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, se encontraron los siguientes resultados en el pié de cría: 100% de cerdas positivas al subtipo H1N1 (Gráfica 1).

Para determinar estadísticamente los valores de tendencia central, los títulos serológicos se transformaron en su equivalente utilizando Log base 2

Los títulos serológicos obtenidos tuvieron un rango de 1:80 hasta 1:5,120 con una media de $1:319.82 \pm 1:2.521$ para el subtipo H1N1 (Cuadro 1), los valores logarítmicos se encuentran en la Gráfica 3.

Cuadro 1. Títulos serológicos del virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1 en hembras de diferentes partos.

1er. Muestreo serológico.

Número de parto	Hembras	No. Positivas	% Animales positivos	Media		Desviación estándar	
				Título*	Log 2	DE. Tit	Log 2
0	14	14	100	1:263.03	8.04	1:2.376	1.25
1	8	8	100	1:223.87	7.81	1:2.429	1.28
2	20	20	100	1:426.58	8.74	1:2.625	1.39
3	23	23	100	1:309.03	8.27	1:2.492	1.32
4	33	33	100	1:316.23	8.30	1:2.477	1.31
5	4	4	100	1:380.19	8.57	1:2.730	1.45
Total	102	102	100	1:319.82	8.28	1:2.521	1.33

*RECÍPROCA DE LA DILUCIÓN $\geq 1:80$ SE CONSIDERA POSITIVO.

6.1.2 PORCENTAJE DE CERDAS SEROLÓGICAMENTE POSITIVAS AL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA TIPO A SUBTIPO H3N2.

Se identificó el 100% de cerdas positivas al virus de influenza porcina tipo A subtipo H3N2 (Gráfica 1), los títulos serológicos obtenidos tuvieron un rango de 1:160

hasta 1:2,560 con una media de 1:696.81 \pm 1:2.87 (Cuadro 2) los valores logarítmicos se encuentran en la Gráfica 3.

Cuadro 2. Títulos serológicos del virus de influenza porcina tipo A subtipo H3N2 en hembras de diferentes partos. 1er. Muestreo serológico.

Número de parto	Hembras	No. Positivas	%Animales positivos	Media		Desviación estándar	
				Título*	Log 2	DE título	Log 2
0	14	14	100	1:645.65	9.33	1:2.74	1.45
1	8	8	100	1:758.58	9.57	1:2.99	1.58
2	20	20	100	1:794.33	9.63	1:2.90	1.54
3	23	23	100	1:676.08	9.40	1:2.83	1.50
4	33	33	100	1:660.69	9.37	1:2.80	1.49
5	4	4	100	1:645.65	9.33	1:2.96	1.57
Total	102	102	100	696.81	9.43	1:2.87	1.52

*RECÍPROCA DE LA DILUCIÓN \geq 1:80 SE CONSIDERA POSITIVO.

Porcentaje de cerdos en el destete positivos al virus de influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2 en la unidad de producción.

6.1.3 PORCENTAJE DE CERDOS EN EL DESTETE SEROLÓGICAMENTE POSITIVOS AL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA TIPO A SUBTIPO H1N1.

En este estudio se encontraron los siguientes resultados en los cerdos destetados: 96% de animales positivos contra el subtipo H1N1 (Gráfica 2). Los rangos de títulos serológicos fueron de 1:40 hasta 1:10,240 con una media de 1:156.47 \pm 1:1.86 (Cuadro 3) los valores logarítmicos se encuentran en la Gráfica 4.

Cuadro 3. Títulos serológicos del virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1 en cerdos destetados.

1er. Muestreo serológico.

Sala de destete	Cerdos destetados	No. de Positivos	Prevalencia %	Media		Desviación estándar	
				Títulos	Log 2	Títulos	Log 2
1	36	34	94	1:141.25	7.14	1:1.95	0.96
2	26	24	92	1:120.23	6.91	1:2.34	1.23
3	48	48	100	1:223.87	7.81	1:2.24	1.16
4	16	16	100	1:199.53	7.64	1:1.51	0.59
5	54	48	89	1:95.5	6.58	1:1.62	0.70
6	50	50	100	1:158.49	7.31	1:1.62	0.70
Total	230	220	96	1:156.47	7.23	1:1.86	0.87

6.1.4 PORCENTAJE DE CERDOS EN EL DESTETE SEROLÓGICAMENTE POSITIVOS AL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA TIPO A SUBTIPO H3N2.

El 6% de los cerdos destetados fueron positivos contra el subtipo H3N2 (Gráfica 2) los rangos de los títulos obtenidos fueron de 1:0 hasta 1:640 con una media de $1:15.68 \pm 1:2.99$ (Cuadro 4) los valores logarítmicos se encuentran en la Gráfica 4.

Cuadro 4. Títulos serológicos del virus de influenza porcina tipo A subtipo H3N2 en cerdos destetados.

1er. Muestreo serológico.

Destete	Cerdos destetados	No. de Positivos	Prevalencia %	Media		Desviación estándar	
				Títulos	Log 2	Títulos	Log 2
1	36	2	6	1:14.45	3.85	1:2.14	1.10
2	26	1	4	1:8.13	3.02	1:4.27	2.09
3	48	3	6	1:17.38	4.12	1:2.04	1.03
4	16	1	6	1:20.89	4.38	1:1.91	0.93
5	54	1	2	1:17.41	2.89	1:4.57	2.19
6	50	5	10	1:15.85	3.99	1:3.02	1.59
Total	230	13	5.6	1:15.68	3.70	1:2.99	1.48

6.2 SEGUNDO MUESTREO.

6.2.1 PORCENTAJE DE CERDAS SEROLÓGICAMENTE POSITIVAS AL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA TIPO A SUBTIPO H1N1.

En el segundo muestreo, el porcentaje de cerdas seropositivas contra el virus de influenza porcina subtipo H1N1 fue de 100% (Gráfica 1) con un rango que va de 1:80 hasta 1:5,120 y una media de 1:374.13 \pm 1:2.53 (Cuadro 5) los valores logarítmicos se encuentran en la Gráfica 3.

Cuadro 5. Títulos serológicos del virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1 en hembras de diferentes partos.

2do. Muestreo serológico.

Número de parto	Hembras	No. de positivos	%Animales positivos	Media		Desviación estándar	
				Títulos	Log 2	Títulos	Log 2
0	3	3	100	1:407.38	8.67	1:1.48	0.57
1	8	8	100	1:269.15	8.07	1:2.63	1.40
2	15	15	100	1:446.68	8.80	1:3.31	1.73
3	13	13	100	1:549.54	9.10	1:3.24	1.70
4	24	24	100	1:309.03	8.27	1:2.19	1.13
5	22	22	100	1:263.03	8.04	1:2.34	1.23
Total	85	85	100	1:374.13	8.49	1:2.53	1.29

6.2.2 PORCENTAJE DE CERDAS SEROLÓGICAMENTE POSITIVAS AL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA TIPO A SUBTIPO H3N2.

El porcentaje de cerdas seropositivas contra el virus de influenza porcina subtipo H3N2 fue del 95% (Gráfica 1) con un rango que va de 1:40 hasta 1:1,280 con una media de 1:140.18 \pm 1:2.09 (Cuadro 6) los valores logarítmicos se encuentran en la Gráfica 3.

Cuadro 6. Títulos serológicos del virus de influenza porcina tipo A subtipo H3N2 en hembras de diferentes partos.

2do. Muestreo serológico.

Número de parto	Hembras	No. de positivos	%Animales positivos	Media		Desviación estándar	
				Títulos	Log 2	Títulos	Log 2
0	3	3	100	1:100	6.64	1:1.48	0.57
1	8	7	88	1:173.78	7.44	1:3.09	1.63
2	15	13	93	1:120.23	6.91	1:1.86	0.90
3	13	13	100	1:169.82	7.41	1:1.95	0.96
4	24	23	96	1:125.89	6.98	1:1.82	0.86
5	22	21	95	1:151.36	7.24	1:1.74	0.80
Total	85	80	95	1:140.18	7.19	1:2.09	1.03

6.2.3 PORCENTAJE DE CERDOS EN EL DESTETE SEROLÓGICAMENTE POSITIVOS AL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA TIPO A SUBTIPO H1N1.

En el segundo muestreo, el porcentaje de animales seropositivos para el subtipo H1N1 fue del 99% (Gráfica 2) con un rango que va de 1:40 hasta 1:2560 con una media de $1:348.68 \pm 1:2.72$ (Cuadro 7) los valores logarítmicos se encuentran en la Gráfica 4.

Cuadro 7. Títulos serológicos del virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1 en cerdos destetados.

2do. Muestreo serológico.

Sala	Cerdos destetados	No. de Positivos	% Animales positivos	Media		Desviación estándar	
				Títulos	Log 2	Títulos	Log 2
1	44	44	100	1:354.81	8.47	1:2.63	1.40
2	4	4	100	1:537.03	9.07	1:2.82	1.50
3	42	41	98	1:275.42	8.11	1:2.57	1.36
6	62	60	97	1:245.47	7.94	1:2.88	1.53
Total	152	149	99	1:348.68	8.39	1:2.72	1.44

6.2.4 PORCENTAJE DE CERDOS EN EL DESTETE SEROLÓGICAMENTE POSITIVOS AL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA TIPO A SUBTIPO H3N2.

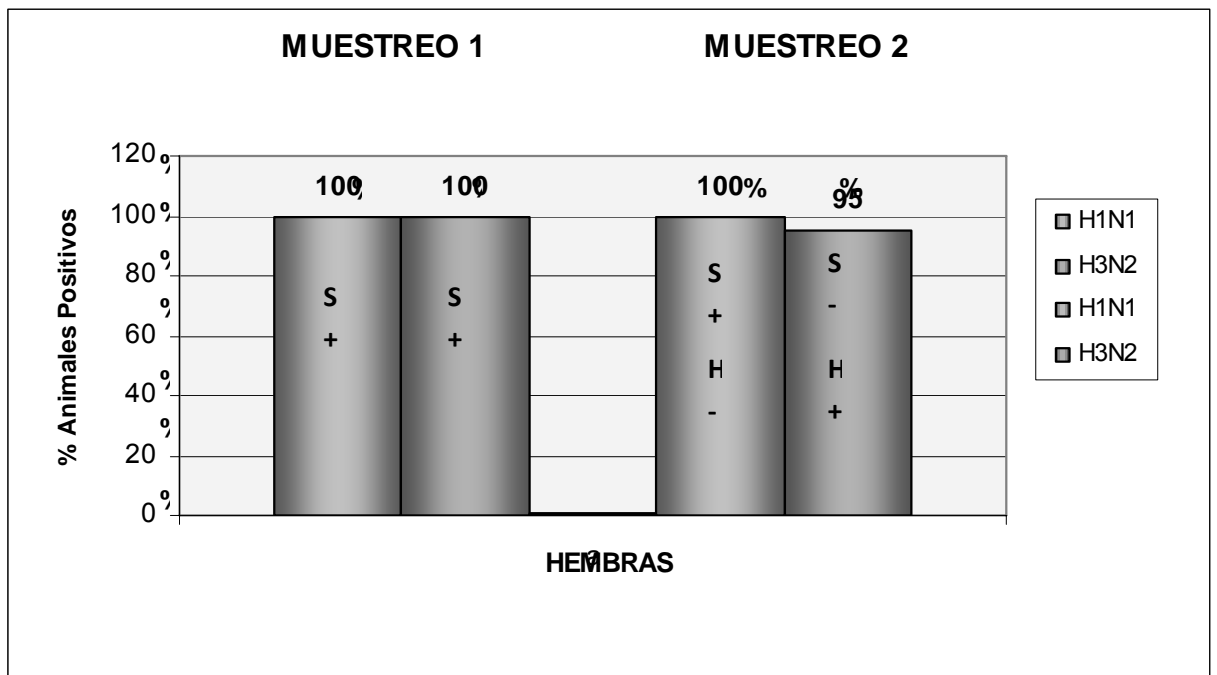
En el segundo muestreo, el porcentaje de animales seropositivos para el subtipo H3N2 fue del 84% (Gráfica 2), con un rango que va de 1:20 hasta 1:20,480 con una media de $1:113.9 \pm 1:2.64$ (Cuadro 8) los valores logarítmicos se encuentran en la Gráfica 4.

Cuadro 8. Títulos serológicos del virus de influenza porcina tipo A subtipo H3N2 en cerdos destetados.

2do. Muestreo serológico.

Sala	Cerdos destetados	No. de Positivos	%Animales positivos	Media		Desviación estándar	
				Títulos	Log 2	Títulos	Log 2
1	44	36	82	1:91.2	6.51	1:1.86	0.90
2	4	4	100	1:134.9	7.08	1:1.95	0.96
3	42	31	74	1:112.2	6.81	1:3.31	1.73
6	62	50	81	1:117.5	6.88	1:3.47	1.79
Total	152	121	84	1:113.9	6.82	1:2.64	1.34

Gráfica 1. Porcentaje de cerdas seropositivas al virus de Influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2.

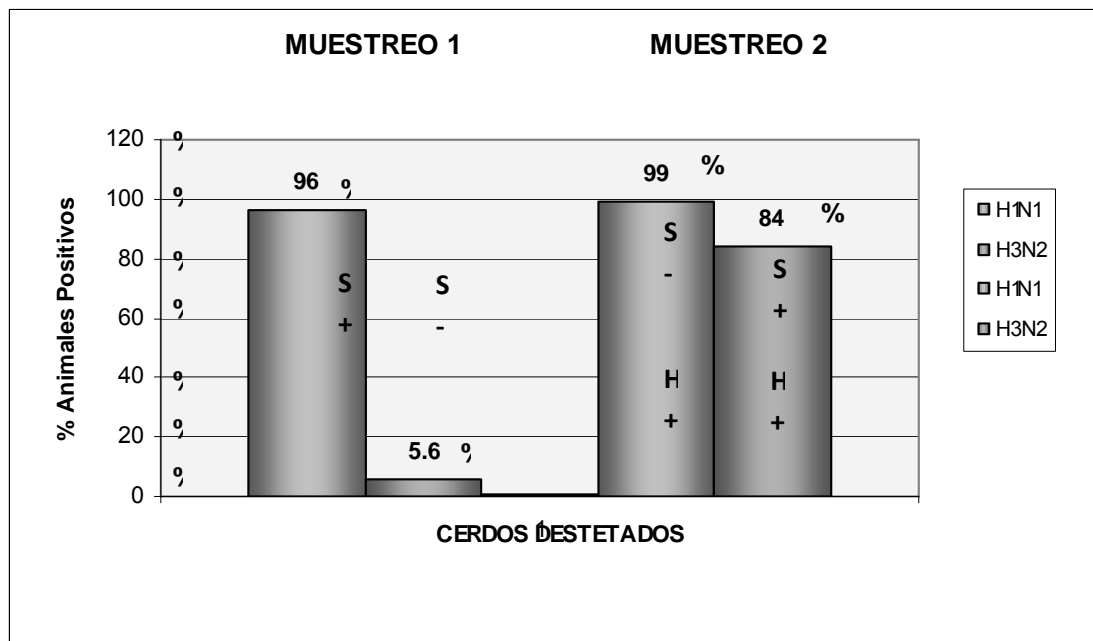


Con un intervalo entre muestreos de 3 meses y utilizando la prueba de inhibición de la hemoaglutinación en la primera etapa de la investigación.

La gráfica describe el porcentaje de cerdas seropositivas al virus de influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2,

- (+) REPRESENTA QUE EL VIRUS FUE DETECTADO A TRAVÉS DE LA PRUEBA DE RT PCR
- (-)-REPRESENTA QUE EL VIRUS NO FUE DETECTADO
- (SH) (H) PROVENIENTE DE SUERO O HISOPO NASAL

Gráfica 2. Porcentaje de cerdos destetados seropositivos al virus de influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2.



Con un intervalo entre muestreos de 3 meses y utilizando la prueba de inhibición de la hemoaglutinación en la primera etapa de la investigación.

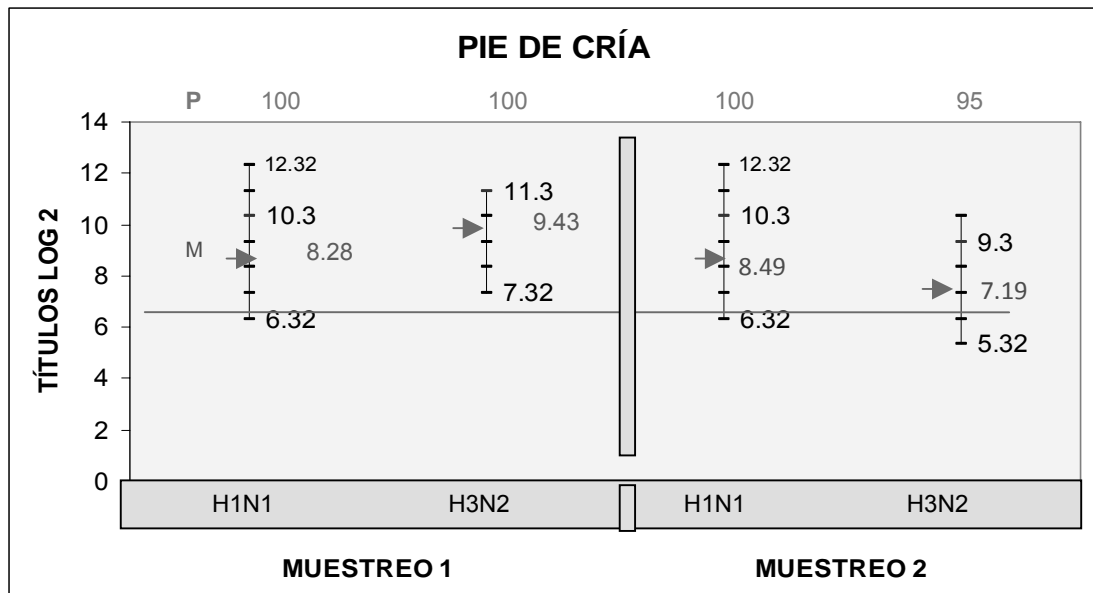
La gráfica describe el porcentaje de cerdos destetados seropositivos al virus de influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2.

(+) REPRESENTA QUE EL VIRUS FUE DETECTADO A TRAVÉS DE LA PRUEBA DE RT PCR

(--)-REPRESENTA QUE EL VIRUS NO FUE DETECTADO

(SH) (H) PROVENIENTE DE SUERO O HISOPO NASAL

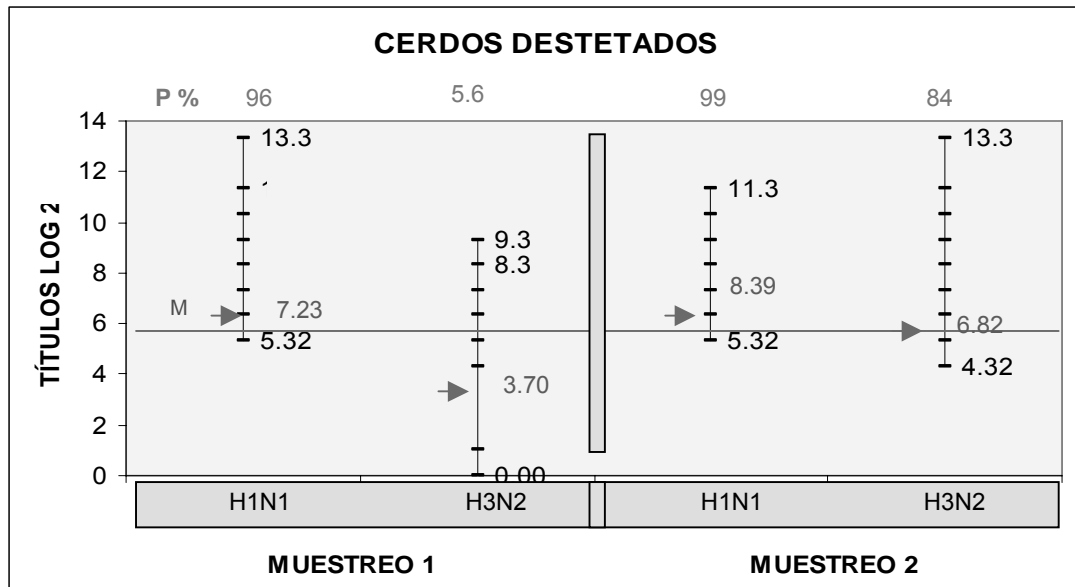
Gráfica 3. Títulos serológicos del pié de cría en Log 2 en el 1er y 2º muestreo de la etapa I.



Log2	3.3	4.3	5.3	6.3	7.3	8.3	9.3	10.3	11.3	12.3	13.3	14.3
Títulos	10	20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	10,240	20,480

La gráfica se compone del porcentaje de hembras positivas (P) al virus de influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2, los rangos de títulos de anticuerpos en equivalente logarítmico, media aritmética y se señalan los dos muestreos serológicos que componen la etapa I de la investigación.

Gráfica 4. Títulos serológicos de cerdos destetados en Log 2 en el 1er y 2º muestreo de la etapa I.



Log2	3.3	4.3	5.3	6.3	7.3	8.3	9.3	10.3	11.3	12.3	13.3	14.3
Títulos	10	20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	10,240	20,480

La gráfica se compone del porcentaje de cerdos destetados positivos (P) al virus de influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2, los rangos de títulos de anticuerpos en equivalente logarítmico, media aritmética y se señalan los dos muestreos serológicos que componen la etapa I de la investigación.

6.3 Etapa I. RT PCR

6.3.1 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE RT - PCR MÚLTIPLE, A PARTIR DE SUEROS.

Primer muestreo. Los 10 grupos muestrales de RNA provenientes de los sueros del primer muestreo en las hembras, se analizaron con la prueba de RT - PCR dando como resultado 3 muestras positivas al subtipo H1N1 y 4 muestras positivas al subtipo H3N2 y 3 muestras negativas hacia los dos subtipos (cuadro 9).

De los 23 grupos de muestras de RNA realizados con los sueros del primer muestreo en los cerdos destetados se obtuvieron con la técnica de RT - PCR 13 muestras positivas al subtipo H1N1, ninguna muestra positiva al subtipo H3N2 y 10 muestras negativas a los dos subtipos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Resultados de la prueba de RT - PCR para identificar el material genético del virus de influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2 a partir de sueros.

Primer muestreo.

Grupos muestrales	Negativos	Positivos		Total
		H1N1	H3N2	
Hembras	3	3	4	10
Cerdos destetados	10	13	0	23

Segundo muestreo. A los 9 grupos de muestras de RNA provenientes de los sueros del segundo muestreo en las hembras, se les realizó la prueba de RT - PCR dando como resultado 8 muestras negativas hacia cualquiera de los dos subtipos, 1 muestra positiva al subtipo H1N1 y ninguna muestra positiva hacia el subtipo H3N2 (Cuadro 10).

De los 15 grupos de muestras de RNA provenientes de sueros de cerdos destetados del segundo muestreo se identificaron 11 muestras negativas a los dos subtipos, ninguna al subtipo H1N1 y 4 muestras positivas al subtipo H3N2 (Cuadro 10).

Cuadro 10. Resultados de la prueba de RT - PCR para identificar el material genético del virus de influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2 a partir de sueros.

Segundo muestreo

Grupos de muestras	Negativos	Positivos		Total
		H1N1	H3N2	
Hembras	8	1	0	9
Cerdos destetados	11	0	4	15

6.3.2 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE RT - PCR MÚLTIPLE A PARTIR DE HISOPOS NASALES.

A los 9 grupos de muestras de RNA obtenidas de hisopo nasal durante el segundo muestreo de las hembras se les realizó la prueba de RT - PCR dando como resultado 7 muestras negativas hacia ambos subtipos, ninguna muestra positiva al subtipo H1N1 y 2 muestras positiva hacia el subtipo H3N2 (Cuadro 11).

De los 15 grupos de muestras de RNA obtenidos de los hisopos nasales de cerdos destetados provenientes del segundo muestreo se identificaron 11 muestras negativas a los dos subtipos, 1 muestra positiva al subtipo H1N1 y 3 muestras positivas al subtipo H3N2 (Cuadro 11).

Cuadro 11. Resultados de la prueba de RT - PCR para identificar el material genético del virus de influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2 a partir de hisopos nasales.

Segundo muestreo

Grupos de muestras	Negativos	Positivos		Total
		H1N1	H3N2	
Hembras	7	0	2	9
Cerdos destetados	11	1	3	15

6.4 Etapa II. Seroconversión de la aplicación de una vacuna bivalente inactivada del virus de influenza porcina.

6.4.1 TÍTULOS SEROLÓGICOS DE HEMBRAS VACUNADAS, NO VACUNADAS Y SUS RESPECTIVOS LECHONES HACIA EL SUBTIPO H1N1.

Hembras vacunadas (G1). En el muestreo realizado en la semana 11 de gestación, previo a la aplicación de la vacuna bivalente se encontró, que el porcentaje de animales positivos al subtipo H1N1 fue de 43.1% con rangos de los títulos de 1:0 hasta 1:320 con una media logarítmica de 1.74 ± 0.32 .

En el muestreo realizado a la semana 14 de gestación, previo a la aplicación del refuerzo de la vacuna, se encontró el 59.3% de animales positivos al subtipo H1N1 con rangos de títulos que fueron de 1:10 hasta 1:640 con una media logarítmica de 1.79 ± 0.33 .

Una semana después del parto el porcentaje fue de 84.6% con rangos que van de 1:40 hasta 1:320 y con una media logarítmica de 1.95 ± 0.22

El porcentaje de lechones seropositivos a los siete días de edad fue de 29.6% con rangos en los títulos que van de 1:0 hasta 1:640 con una media de 1.65 ± 0.31 .

Y a las cuatro semanas de edad el porcentaje fue de 28.2% con rangos que van de 1:20 hasta 1:320 con una media de 1.63 ± 0.26 (Cuadro 12).

Los porcentajes de animales positivos y los títulos serológicos de cada etapa se encuentran en la Gráfica 5 y 6 respectivamente.

Cuadro 12. Porcentaje de cerdas seropositivas al virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1 en hembras vacunadas y sus lechones.

Vacunadas	H1N1				
	11 semanas ¹	14 semanas ²	1 semana postparto	Lechones 1 semana	Lechones 4 semanas
%Animales positivos	43.1%	59.3%	84.6%	29.6%	28.2%
Rango Títulos	0- 320	10-640	40-320	0- 640	20-320
Log 10	0- 2.50	1-2.80	1.60-2.50	0-2.80	1.30-2.50
Media	1:71	1:82	1:103	1:56	1:52
Media Log	1.74 ^a	1.79 ^a	1.95 ^a	1.65 ^a	1.63 ^a
Desv .Est.	60	88	64.7	56.2	43.8
Desv. Est Log	0.32	0.33	0.22	0.31	0.26

DIFERENTE LITERAL ENTRE FILAS SON ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P<0.05).

1er MUESTREO ANTES DE LA PRIMERA APLICACIÓN DE LA VACUNA

2º MUESTREO ANTES DE LA SEGUNDA APLICACIÓN DE LA VACUNA

Hembras no vacunadas (G2). En el muestreo realizado en la semana 11 de gestación, previo a la aplicación de la solución salina fisiológica se encontró, que el porcentaje de animales positivos al subtipo H1N1 fue de 56% con rangos que van de 1:20 hasta 1:320 con una media logarítmica de 1.76 ± 0.33 .

En el muestreo realizado a la semana 14 de gestación, previo a la segunda aplicación de la solución salina fisiológica, se encontró el 37.5% con rangos que van de 1:10 hasta 1:160 con una media logarítmica de 1.67 ± 0.28 .

Una semana después del parto el porcentaje fue de 60.87% con rangos que van de 1:20 hasta 1:320 y con una media de 1.89 ± 0.31 .

El porcentaje de lechones seropositivos a los siete días de edad fue de 26.09% con rangos que van de 1:0 hasta 1:160 con una media de 1.57 ± 0.36

Y a las cuatro semanas de edad el porcentaje fue de 15.15% con rangos que van de 1:10 hasta 1:320 con una media de 1.50 ± 0.28 (Cuadro 13).

Los porcentajes de animales positivos y los títulos serológicos de cada etapa se encuentran en la Gráfica 5 y 6 respectivamente.

Cuadro 13. Porcentaje de cerdas seropositivas al virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1 en hembras no vacunadas y sus lechones.

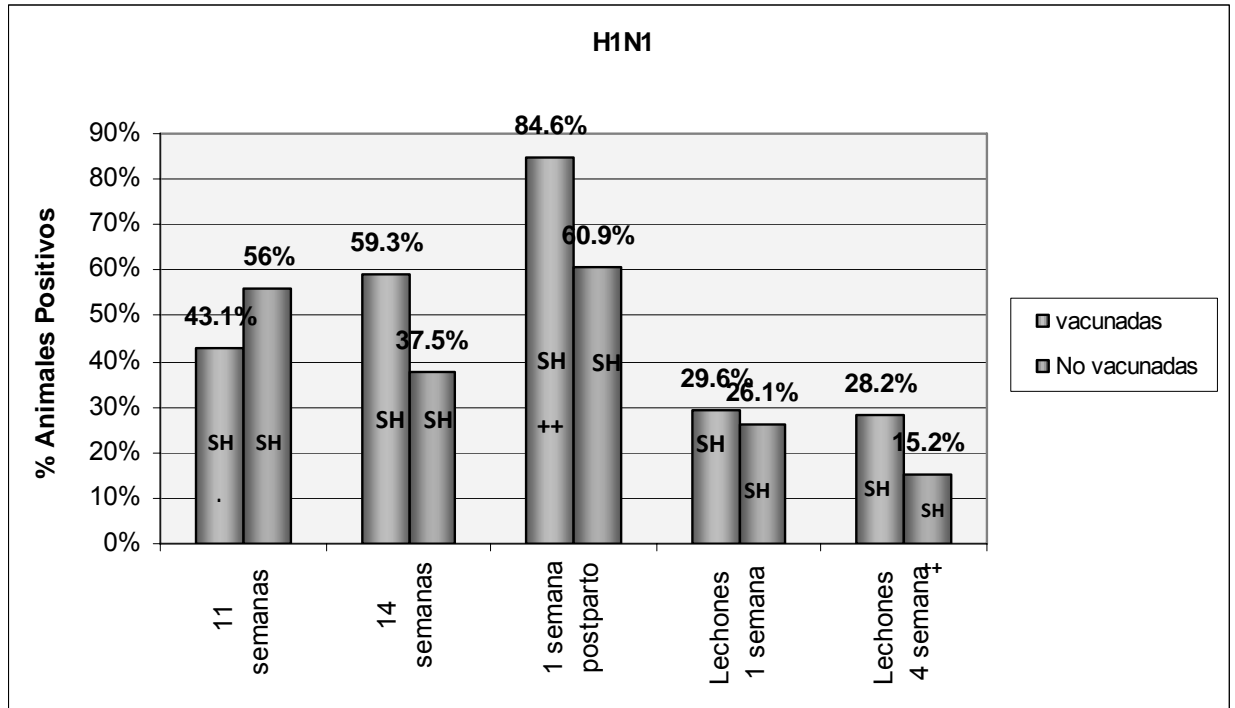
H1N1					
NO Vacunadas	11 semanas ¹	14 semanas ²	1 semana postparto	Lechones 1 semana	Lechones 4 semana
%Animales positivos	56%	37.5%	60.87%	26.09%	15.15%
Rango Títulos	20-320	10-160	20-320	0-160	10-320
Log 10	1.3-2.50	1-2.20	1.3-2.50	0-2.20	1-2.505
Media	1:77	1:58	1:99	1:48	1:43
Media Log	1.76 ^a	1.67 ^a	1.89 ^a	1.57 ^a	1.50 ^a
Desv. Est	65.5	38.7	70.1	29.7	53.6
Dev Est Log	0.33	0.28	0.31	0.36	0.28

DIFERENTE LITERAL ENTRE FILAS SON ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P<0.05).

1er MUESTREO ANTES DE LA PRIMERA APLICACIÓN DE LA VACUNA

2º MUESTREO ANTES DE LA SEGUNDA APLICACIÓN DE LA VACUNA

Gráfica 5. Porcentaje de hembras vacunadas, no vacunadas y sus lechones seropositivos al virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1.



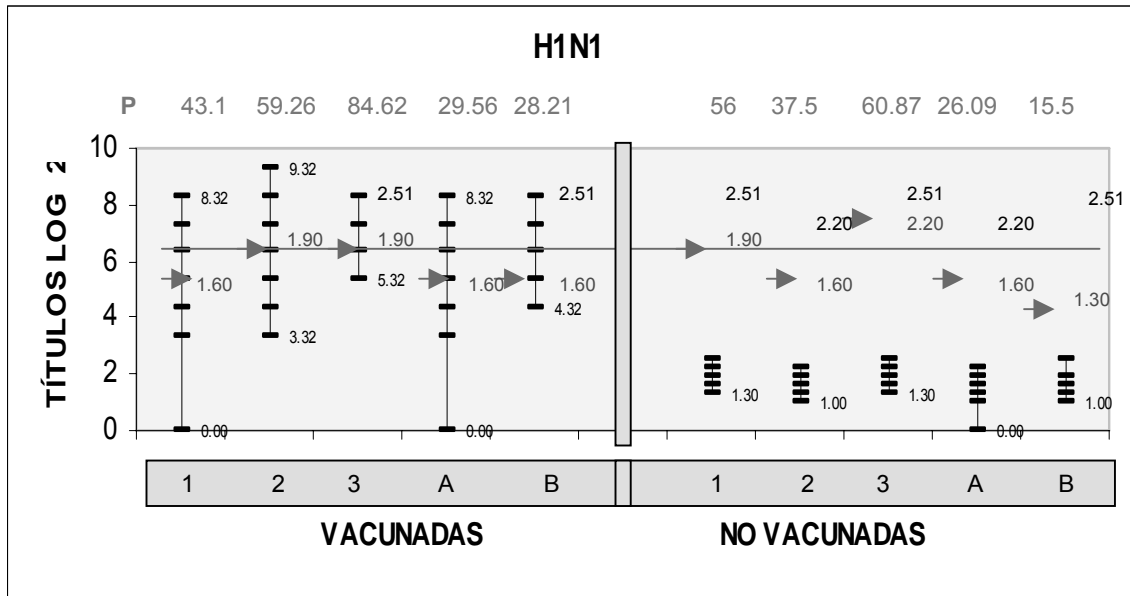
En la gráfica se presenta el porcentaje de cerdas seropositivas a las 11 y 14 semanas de gestación y una semana después del parto, comparando el grupo de hembras vacunadas contra el grupo control, así como los títulos serológicos que presentaron los lechones correspondientes a cada grupo a la 1^a y 4^a semana de vida.

(+) REPRESENTA QUE EL VIRUS FUE DETECTADO A TRAVÉS DE LA PRUEBA DE RT PCR

(--)-REPRESENTA QUE EL VIRUS NO FUE DETECTADO

(SH) (H) PROVENIENTE DE SUERO O HISOPO NASAL

Gráfica 6. Títulos serológicos de hembras vacunadas, no vacunadas y sus lechones contra el virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1.



Log2	3.3	4.3	5.3	6.3	7.3	8.3	9.3	10.3	11.3	12.3	13.3	14.3
Títulos	10	20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	10,240	20,480

Títulos de anticuerpos y su valor logarítmico.

- 1.- Primer muestreo serológico de hembras gestantes (11 semanas de gestación)
- 2.- Segundo muestreo serológico de hembras gestantes (14 semanas de gestación)
- 3.- Tercer muestreo serológico, hembras paridas (1 semana después del parto)
 - a.- Primer muestreo de lechones (1 semana de edad)
 - b.- Segundo muestreo de lechones (4 semanas de edad)

La gráfica se compone de distintos elementos como son el porcentaje de hembras y sus lechones positivos al virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1, a las 11 y 14 semanas de gestación, una semana después del parto y a la 1ª y 4ª semana de edad respectivamente, los rangos de títulos de anticuerpos en su equivalente logarítmico 2 y se señala la media aritmética.

6.4.2 TÍTULOS SEROLÓGICOS DE HEMBRAS VACUNADAS, NO VACUNADAS Y SUS RESPECTIVOS LECHONES HACIA EL SUBTIPO H3N2.

Hembras vacunadas (G1). En el muestreo realizado en la semana 11 de gestación, previo a la aplicación de la vacuna bivalente, se encontró, que el porcentaje de animales positivos a el subtipo H3N2, fue de 18.18% con rangos en los títulos que van de 1:0 hasta 1:160 con una media de 1.44 ± 0.38 .

En el muestreo realizado en la semana 14 de gestación, previo a la aplicación del refuerzo de la vacuna, se encontró el 72.22% de animales positivos al subtipo H3N2, con rangos que van de 1:10 hasta 1:1,280 con una media de 1.99 ± 0.47 .

Una semana después del parto de 78.43% con rangos que van de 1:20 hasta 1:1,280 y con una media de 2.11 ± 0.40 .

El porcentaje de lechones seropositivos a la semana de edad es de 78.88% con rangos en los títulos que van de 1:0 hasta 1:1,280 con una media de 2.12 ± 0.65 .

Y a las cuatro semanas de edad es de 48.72% con rangos que van de 1:0 hasta 1:640 con una media 1.71 ± 0.53 (Cuadro 14).

El porcentaje de animales positivos y los títulos serológicos de cada etapa se encuentran en la Gráfica 7 y 8 respectivamente.

Cuadro 14. Porcentaje de cerdas seropositivas al virus de influenza porcina tipo A subtipo H3N2 en hembras vacunadas y sus lechones.

H3N2					
Vacunadas	11 semanas ¹	14 semanas ²	1 semana postparto	Lechones 1 semana	Lechones 4 semana
%Animales positivos	18.18%	72.22%	78.43%	78.88%	48.72%
Rango Títulos	0-160	10-1,280	20-1,280	0-1,280	0-640
Log 10	0-2.20	1-3.10	1.30-3.10	0-3.10	0-2.80
Media	1:36	1:171	1:200	1:284	1:88
Media Log	1.44 ^a	1.99 ^a	2.11 ^a	2.12 ^a	1.71 ^a
Desv. Est.	37.4	212	241	331	97
Desv Est	0.38	0.47	0.40	0.65	0.53

DIFERENTE LITERAL ENTRE FILAS SON ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P<0.05).

1er MUESTREO ANTES DE LA PRIMERA APLICACIÓN DE LA VACUNA

2º MUESTREO ANTES DE LA SEGUNDA APLICACIÓN DE LA VACUNA

Hembras no vacunadas (G2). En el muestreo realizado en la semana 11 de gestación, previo a la aplicación de la solución salina fisiológica, se encontró, que el porcentaje de animales positivos a el subtipo H3N2, fue de 4% con rangos que van de 1:0 hasta 1:320 con una media de 1.40 ± 0.39 .

En el muestreo realizado en la semana 14 de gestación, previo a la segunda aplicación de la solución salina fisiológica, se encontró un porcentaje de 10.53% con rangos que van de 1:10 hasta 1:80 con una media de 1.42 ± 0.27

Una semana posterior al parto se encontró una prevalencia de 13.04% con rangos que van de 1:10 hasta 1:80, con una media de 1.42 ± 0.29 .

El porcentaje de lechones positivos a los siete días de edad fue de 10.29% con rangos que van de 1:0 hasta 1:1,024 con una media de 1.27 ± 0.57 .

Y a las cuatro semanas de edad fue de 0.00% con rangos que van de 1:0 hasta 1:40 con una media de 0.99 ± 0.42 (Cuadro 15).

Los porcentajes de animales positivos y los títulos serológicos de cada etapa se encuentran en la Gráfica 5 y 6 respectivamente.

Cuadro 15. Porcentaje de cerdas seropositivas al virus de influenza porcina tipo A subtipo H3N2 en hembras no vacunadas y sus lechones.

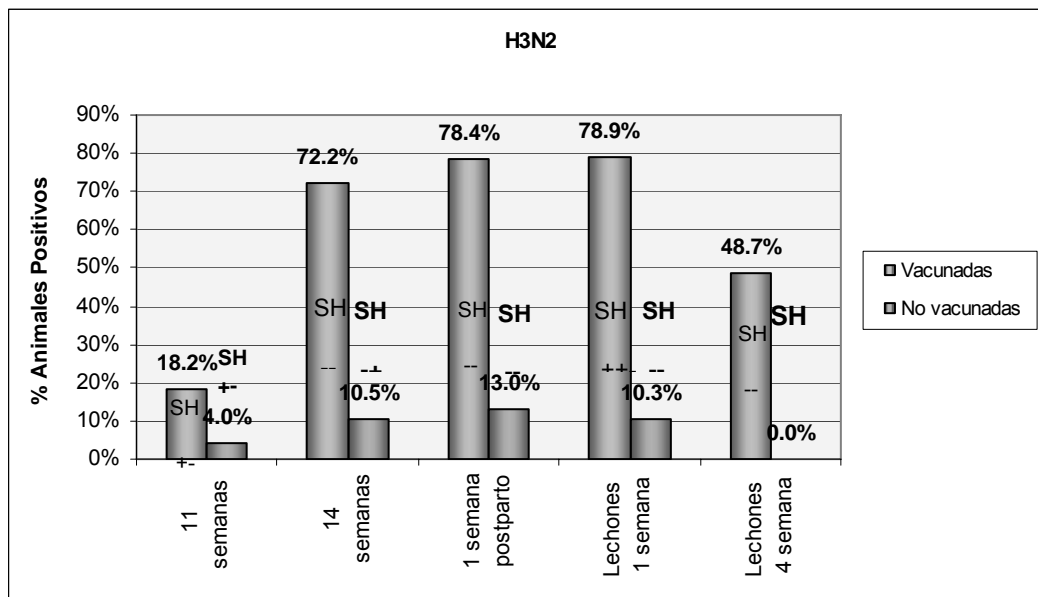
H3N2					
No Vacunadas	11 semanas ¹	14 semanas ²	1 semana postparto	Lechones 1 semana	Lechones 4 semana
%Animales positivos	4%	10.53%	13.04%	10.29%	0%
Rango Títulos	0-320	10-80	10-80	0-1,024	0-40
Log 10	0-2.50	1-1.90	1-1.90	0-3.10	0-1.60
Media	1:39	1:32	1:32	1:44	1:13
Media Log	1.40 ^a	1.42 ^a	1.42 ^a	1.27 ^a	0.99 ^a
Desv. Est.	61	20	21	129	9
Desv Est	0.39	0.27	0.29	0.57	0.42

DIFERENTE LITERAL ENTRE FILAS SON ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P<0.05).

1er MUESTREO ANTES DE LA PRIMERA APLICACIÓN DE LA VACUNA.

2º MUESTREO ANTES DE LA SEGUNDA APLICACIÓN DE LA VACUNA

Gráfica 7. Porcentaje de hembras vacunadas, no vacunadas y sus lechones seropositivos al virus de influenza porcina tipo A subtipo H3N2.



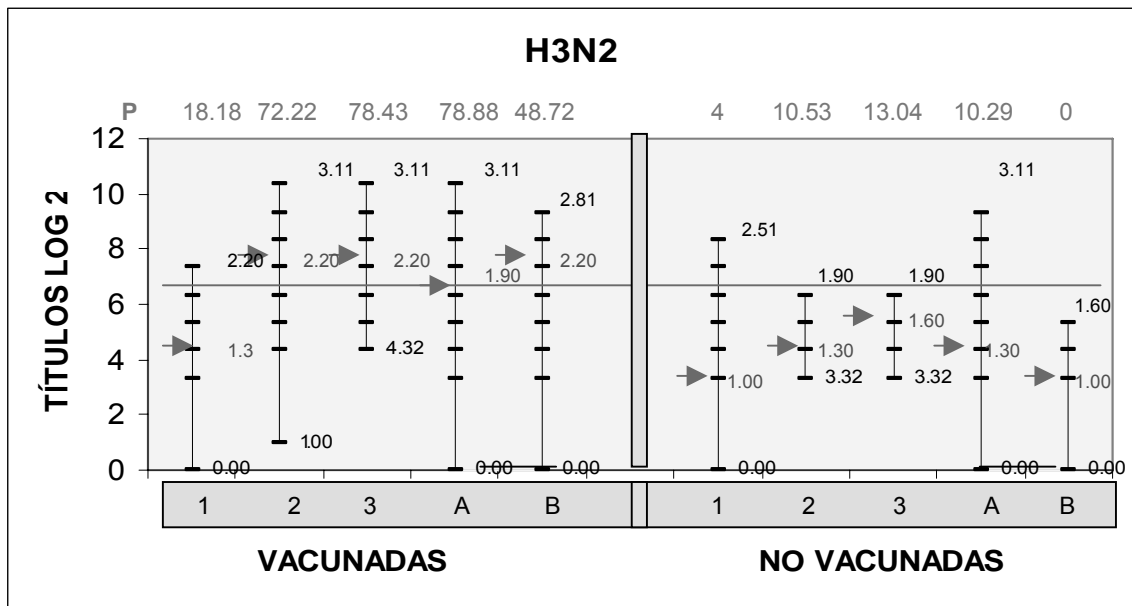
En la gráfica se presenta el porcentaje de cerdas seropositivas a las 11 y 14 semanas de gestación y una semana después del parto, comparando el grupo de hembras vacunadas contra el grupo control, así como los títulos serológicos que presentaron los lechones correspondientes a cada grupo a la 1ª y 4ª semana de vida.

(+) REPRESENTA QUE EL VIRUS FUE DETECTADO A TRAVÉS DE LA PRUEBA DE RT PCR

(--)-REPRESENTA QUE EL VIRUS NO FUE DETECTADO

(S) (H) PROVENIENTE DE SUERO O HISOPO NASAL

Gráfica 8. Títulos serológicos de hembras no vacunadas, vacunadas y sus lechones hacia el subtipo H3N2



Log2	3.3	4.3	5.3	6.3	7.3	8.3	9.3	10.3	11.3	12.3	13.3	14.3
Títulos	10	20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	10,240	20,480

Títulos de anticuerpos y su valor logarítmico.

- 1.- Primer muestreo serológico de hembras gestantes (11 semanas de gestación)
- 2.- Segundo muestreo serológico de hembras gestantes (14 semanas de gestación)
- 3.- Tercer muestreo serológico, hembras paridas (1 semana después del parto)
- A.- Primer muestreo de lechones (1 semana de edad)
- B.- Segundo muestreo de lechones (4 semanas de edad)

La gráfica se compone de distintos elementos como son el porcentaje de hembras y sus lechones positivos al virus de influenza porcina tipo A subtipo H3N2, a las 11 y 14 semanas de gestación, una semana después del parto y a la 1ª y 4ª semana de edad respectivamente, los rangos de títulos de anticuerpos en su equivalente logarítmico 2 y se señala la media aritmética.

6.5 Etapa II. RT - PCR

6.5.1 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE RT - PCR MÚLTIPLE, DE SUEROS DE HEMBRAS VACUNADAS Y NO VACUNADAS.

En los resultados de la prueba de RT - PCR aplicada a 6 grupos muestrales de RNA de sueros provenientes de hembras vacunadas a las 11 semanas de gestación, se encontró que solo una muestra fue negativa a ambos subtipos, 3 muestras positiva al subtipo H1N1 y 2 muestras positivos al subtipo H3N2 cabe aclarar que 2 de los pules positivos fueron positivos a los dos subtipos H1N1 y H3N2 (Cuadro 16).

Las muestras de sueros obtenidas a las 14 semanas de gestación no presentaron positividad con la técnica de RT - PCR hacia ningún subtipo. Una semana después del parto se identificaron 2 positivos al subtipo H1N1 y negativo al resto de las muestras.

Los resultados de la prueba de RT - PCR aplicada a 5 pules de sueros provenientes de hembras no vacunadas a las 11 semanas de gestación 3 de las muestras fueron negativas a cualquiera de los dos subtipos, ninguna muestra fue positiva al subtipo H1N1 y 2 de los pules fueron positivo al subtipo H3N2, a las 14 semanas de gestación, 3 de las muestras fueron negativas, 2 de las muestras fueron positivas al subtipo H1N1 y ninguna al subtipo H3N2, a la semana de parto ninguno de los dos subtipos fueron identificados.

Cuadro 16. Resultados de la prueba de RT - PCR múltiple, de sueros de hembras Vacunadas y No Vacunadas.

Muestra	Subtipo	VACUNADAS			NO VACUNADAS		
		11 S de gestación	14 S de gestación	1 S de parto	11 S de gestación	14 S de gestación	1 S de parto
Suero	Negativos	1	6	4	3	3	5
	H1N1	3	0	2	0	2	0
	H3N2	2	0	0	2	0	0
	H1N1 y H3N2	2	0	0	0	0	0
	Total	6	6	6	5	5	5

6.5.2 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE RT - PCR MÚLTIPLE, DE HISOPOS DE HEMBRAS VACUNADAS Y NO VACUNADAS.

Los resultados de la prueba de RT - PCR múltiple realizada a 6 grupos muestrales de RNA provenientes de hembras vacunadas, indicaron que a las 11 y 14 semanas de gestación no existía la presencia del virus de influenza en hisopos nasales. En los grupos muestrales de RNA provenientes de las muestras de suero una semana pos parto se encontraron 5 negativos y 1 positivo al subtipo H1N1 (Cuadro 17)

Los resultados de la prueba de RT - PCR aplicada a 1 grupo muestral de hisopos nasales provenientes de hembras no vacunadas a las 11 semanas de gestación no identificó la presencia de los subtipos H1N1 o H3N2 del virus de influenza, a las 14 semanas de gestación se pudo identificar el subtipo H3N2 y a la semana de parir la prueba fue negativa a los dos subtipos.

Cuadro 17. Resultados de la prueba de RT - PCR múltiple, de hisopos de hembras vacunadas y no vacunadas.

Muestra	Subtipo	VACUNADAS			NO VACUNADAS		
		11 S de gestación	14 S de gestación	1 S de parto	11 S de gestación	14 S de gestación	1 S de parto
Hisopo Nasal	Negativo	6	6	5	1	0	1
	H1N1	0	0	1	0	0	0
	H3N2	0	0	0	0	1	0
	H1N1 y H3N2	0	0	0	0	0	0
	Total	6	6	6	1	1	1

6.5.3 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE RT - PCR MÚLTIPLE, DE SUEROS DE LECHONES PROVENIENTES DE HEMBRAS VACUNADAS Y NO VACUNADAS.

Los resultados de la prueba de RT - PCR aplicada a 6 grupos de hisopos nasales provenientes de lechones de siete días de edad se detectaron 2 grupos muestrales positivos al subtipo H3N2 y el resto fueron negativos (Cuadro 18). A las cuatro semanas de edad no se identificó ninguno de los dos subtipos. En las crías de siete días de edad ninguno de los pules resultó positivo y a las cuatro semanas de edad 4 de los pules fueron negativos, ninguno positivo al subtipo H1N1 y 1 positivo al subtipo H3N2.

Cuadro 18. Resultados de la prueba de RT - PCR múltiple, de sueros de lechones provenientes de hembras vacunadas y no vacunadas.

Muestra	Subtipo	VACUNADAS		NO VACUNADAS	
		1 S de edad	4 S de edad	1 S de edad	4 S de edad
Suero	Negativos	4	6	5	4
	H1N1	0	0	0	1
	H3N2	2	0	0	0
	H1N1 y H3N2	0	0	0	0
	Total	6	6	5	5

S = Semana (s)

6.5.4 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE RT - PCR MÚLTIPLE, DE HISOPOS DE LECHONES PROVENIENTES DE HEMBRAS VACUNADAS Y NO VACUNADAS.

En los grupos muestrales de hisopos de lechones provenientes de hembras vacunadas, a la semana de edad 5 muestras fueron negativas y una fue positiva al subtipo H3N2 y a las 4 semanas de edad de los lechones ninguno de los grupos muestrales fue positivo a cualquiera de los dos subtipos del virus de influenza porcina (Cuadro 19)

En la primera semana de edad, los lechones de hembras no vacunadas fueron negativos a los dos subtipos y a las 4 semanas de edad el pool fue positivo al subtipo H1N1.

Cuadro 19. Resultados de la prueba de RT - PCR múltiple, de hisopos de lechones provenientes de hembras vacunadas y no vacunadas.

Muestra	Subtipo	VACUNADAS		NO VACUNADAS	
		1 S de edad	4 S de edad	1 S de edad	4 S de edad
Hisopo Nasal	Negativos	5	6	1	0
	H1N1	0	0	0	1
	H3N2	1	0	0	0
	H1N1 y H3N2	0	0	0	0
	Total	6	6	1	1

Cuadro 20. Integración de resultados serológicos y resultados de RT PCR.

H1N1					
Grupo	Hembras			Lechones	Cerdos Destetados
	11 semanas	14 semanas	1 semana pos parto	1 semana	4 semana
VACUNADAS	1.74	1.79	1.95	1.65	1.63
	1:71	1:82	1:103	1:56	1:52
RT – PCR	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
NO VACUNADAS	1.76	1.67	1.89	1.57	1.50
	1:77	1:58	1:99	1:48	1:43
RT – PCR	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
H3N2					
Grupo	Hembras			Lechones	Cerdos Destetados
	11 semanas	14 semanas	1 semana pos parto	1 semana	4 semana
VACUNADAS	1.44	1.99	2.11	2.12	1.71
	1:36	1:171	1:200	1:284	1:88
RT – PCR	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
NO VACUNADAS	1.40	1.42	1.42	1.27	0.99
	1:39	1:32	1:32	1:44	1:13
RT – PCR	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)

6.6 Etapa III. PARÁMETROS REPRODUCTIVO DE LAS HEMBRAS

No existió diferencia estadística significativa ($P>0.05$) en las variables número de lechones nacidos totales, nacidos vivos, nacidos muertos y número de momias entre las hembras vacunadas y las no vacunadas.

Lo mismo ocurrió con los lechones provenientes de las hembras vacunadas y no vacunadas, no se observó diferencia estadística en el peso de la camada y el peso promedio del lechón como se observa en el cuadro 21, y la gráfica 11.

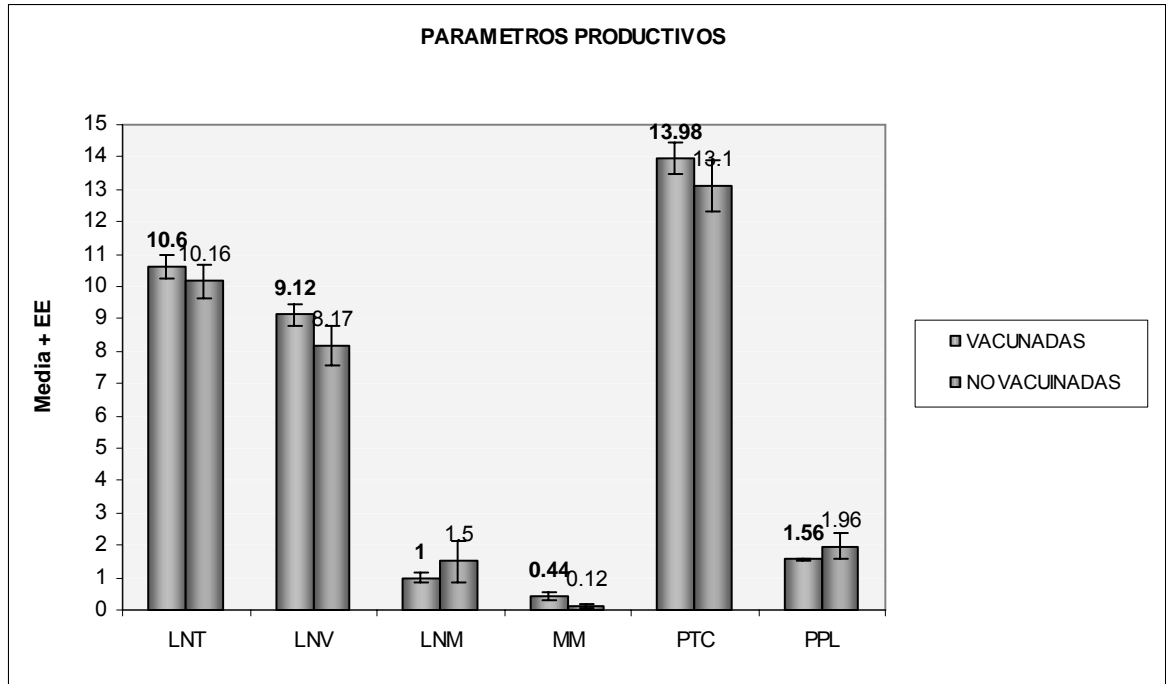
Cuadro 21. Parámetros Productivos

	LNT	LNV	LNМ	MM	PTC	PPL
VACUNADAS	10.60 ± 0.36	9.12 ± 0.33	1.00 ± 0.17	0.44 ± 0.11	13.98 ± 0.48	1.56 ± 0.03
NO VACUINADAS	10.16 ± 0.54	8.17 ± 0.62	1.50 ± 0.62	0.12 ± 0.06	13.10 ± 0.80	1.96 ± 0.39

DIFERENTE LITERAL ENTRE FILAS SON ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ($P<0.05$).

MEDIA ± ERROR ESTANDAR, número de lechones por camada (NLC), lechones nacidos vivos(LNV), lechones nacidos muertos (LNM), momias (MM), peso total de la camada (PTC), peso promedio de lechón (PPL)

Gráfica 9. Comparación de los parámetros reproductivos en hembras vacunadas y no vacunadas.



La gráfica muestra el comportamiento de los parámetros reproductivos en ambos grupos. No existió diferencia estadística.

VII. DISCUSIÓN

En Estados Unidos ha realizado reportes en relación a la presencia del virus clásico de influenza porcina tipo A subtipo H1N1 desde 1918 y a partir de 1968 en diferentes partes del mundo se ha reportado el establecimiento del subtipo H3N2 en poblaciones de cerdos, aunque Estados Unidos de América, ha sido positivo al virus de influenza porcina desde 1918, Canadá permaneció libre hasta 1967, cuando el subtipo H1N1 fue aislado en Manitoba, desde entonces la enfermedad ha sido diagnosticada en muchas otras provincias de Canadá y ha sido asociada siempre a la presencia del subtipo H1N1. Karasin *et al.*, (2000)

En el presente estudio se demostró la presencia de la infección del Virus de Influenza Porcina subtipos H1N1 y H3N2 en los cerdos evaluados de la granja productora de lechones. Los anticuerpos específicos para el subtipo H1N1 y H3N2 fueron detectados en 2 muestreos serológicos transversales realizados en hembras y sus lechones, antes de iniciar un programa de vacunación utilizando un producto biológico comercial (Cuadros 1-8).

En el primer monitoreo los subtipos H1N1 y H3N2 fueron detectados en 100% de los sueros provenientes de las hembras muestreadas y en el caso de los lechones, el subtipo H1N1 fue positivo en 96% de los sueros y el subtipo H3N2 fue positivo en 6% de los sueros. La distribución porcentual de los títulos para el subtipo H1N1 y H3N2 del virus de influenza porcina en las granjas evaluadas es mostrada en los cuadros 1 a 4.

En el segundo muestreo el subtipo H1N1 fue detectado en 100% de los sueros provenientes de las hembras muestreadas y el subtipo H3N2 fue detectado en 95% de los sueros; en el caso de los lechones, el subtipo H1N1 fue positivo en 99% de los sueros y el subtipo H3N2 fue positivo en 84% de los sueros. La distribución porcentual de los títulos para el subtipo H1N1 y H3N2 del virus de influenza porcina en las granjas evaluadas es mostrada en los cuadros 5 a 8.

Además de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, se utilizó la prueba de transcriptasa reversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT - PCR), para identificar la presencia del material genético del virus de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 a partir de sueros y exudados nasales como lo realizaron Larsen *et al.*, en el 2000, quienes utilizaron muestras de exudado nasal para la identificación del virus de influenza porcina.

En el presente estudio se realizó una prueba de RT-PCR múltiple convencional a diferencia de Choi *et al.*, en 2002 que realizó un ensayo de RT - PCR múltiple en tiempo real. Sin embargo se utilizó la técnica de grupos muestrales (pools) para hacer más eficiente la detección, como lo hicieron Landolt *et al.*, (2005) quienes indican que la prueba de RT-PCR es una herramienta en la que se pueden utilizar pools de hisopos nasales en los que se sospecha la presencia del virus de influenza para la identificación de su material genético, sus hallazgos muestran que la prueba de RT-

PCR es un método sensible y específico para la identificación del virus de influenza porcina Tipo A subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 en muestras de exudados nasales. Choi *et al.*, 2001, desarrollaron dos pruebas de RT-PCR múltiple específicos para H1, H3, N1 y N2 que pueden diferenciar los tres subtipos del virus de influenza Porcina Tipo A presentes en las granjas de cerdos en los Estados Unidos, sin embargo en nuestra investigación se utilizó la prueba de RT-PCR múltiple para la identificación de los subtipos H1N1 y H3N2.

Actualmente los investigadores indican que es necesario un método rápido para la detección y subtipificación de los diferentes subtipos del virus de influenza presentes en una granja de cerdos, para establecer mejores medidas de control, las dos pruebas de RT - PCR múltiple desarrolladas por Choi *et al.*, en 2002 pueden contribuir al diagnóstico con una rápida subtipificación en comparación con otros métodos, en adición estos métodos pueden detectar infecciones con dos subtipos del virus de influenza porcina tipo A en cerdos.

En la presente investigación se observaron infecciones recurrentes con los subtipos H1N1 y H3N2, la cual pudiera estar relacionada a la falta de protección cruzada entre las glicoproteínas H1 y H3, en otras palabras los cerdos inmunizados con el virus de influenza subtipo H1N1 pueden ser infectados con el subtipo H3N2 o viceversa Choi *et al.*, 2001.

Los rangos de titulación, para H1N1 en los dos muestreos, tanto para lechones como para cerdas adultas se encontraron en general altos títulos de anticuerpos, pero en el caso del subtipo H3N2, el porcentaje de animales positivos y la titulación de anticuerpos fueron variables. Se pudieron observar animales seropositivos con rango 1:80 - 1:20,480 donde los títulos menores a 1:80 se consideraron negativos, se encuentra descrito en la grafica 2. Los títulos de anticuerpos encontrados por Ramírez *et al.*, (2005), quienes buscaron evidencia serológica en 305 muestras de 10 granjas de cerdos en diferentes estados en Venezuela utilizando la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH) en sueros obtenidos de 3 granjas que fueron positivas al subtipo H1N1 y 4 granjas que fueron positivas al subtipo H3N2, tuvieron rangos serológicos positivos desde 1:40 a 1:320 y de 1:40 a 1:160 respectivamente para cada subtipo, títulos mas bajos en comparación con los obtenidos en este estudio; así mismo las granjas serológicamente positivas en el estudio realizado por Ramírez *et al.*, (2005) solo fueron positivas hacia un subtipo a diferencia de la unidad de producción en donde se realizó este estudio que fue positiva hacia los dos subtipos; También reportan que una vez que la infección ha aparecido en una unidad de producción y en la cual no se elimine completamente a la población, la posibilidad de circulación viral va a existir, situación que fue comprobada en este estudio ya que el material genético del virus de influenza porcina fue identificado desde el inicio de la investigación hasta el final la cual duró aproximadamente un año a nivel de campo.

Una vez que la infección ha aparecido en una granja, en la que no se elimine completamente la población, la posibilidad de circulación viral va a existir siempre (Madec *et al.*, citado por Easterday *et al.*, 1999).

Poljak *et al.*, (2008) encontraron que la prevalencia serológica de cerdos en la última etapa de la engorda fue mas elevada que en otras etapas, lo que pudo deberse a la elevada densidad poblacional y que las progenitoras fueron positivas al virus. Encontraron que, factores como edad, altas densidades a diferentes niveles, abastecimiento externo de cerdas para pie de cría positivas, número de animales por sitio y la cercanía con otras granjas se relacionan con la presencia del virus.

En los años de 2004 a 2005, la epidemiología del virus de influenza porcina cambió en la población de cerdos en el norte de América a partir de la emergencia del virus de influenza porcina, por medio de la prueba de ELISA para el subtipo H1N1 la prevalencia serológica de las cerdas fue de 19.5% en 2004 y 30.6% en 2005 y para el subtipo H3N2 fue de 6.5% en 2004 y 40.8 % en 2005.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que al emplear la técnica de inhibición de la hemoaglutinación, los sueros obtenidos de cerdos procedentes de la granja no solo fueron seropositivos para el serotipo H1N1, sino también fueron encontrados anticuerpos contra el subtipo H3N2 para lo cual Dürrwald *et al.*, (2002) mencionan que ambos subtipos pueden cohabitar enzoóticamente en una misma granja y nuestros resultados demostraron esta condición.

En este estudio se confirmó que el subtipo H3N2 circuló con el virus endémico de H1N1 el cual pudo haber sido transmitido entre las hembras en las casetas de maternidad o gestación. Por lo que hacemos énfasis en la importancia de establecer un programa de vacunación en hembras y lechones para reducir la signología clínica generada por la enfermedad debido a la recirculación constante de la enfermedad.

En la actualidad se busca una vacuna que induzca una inmunidad completa, la cual se podría evaluar mediante la nula excreción del virus de influenza porcina a través de las secreciones nasales, sin embargo es bien conocido que el nivel de protección alcanzado a través de la vacunación es limitado.

Si la vacuna induce una respuesta inmune, elimina los signos clínicos de la enfermedad, pero no previene completamente la infección ni la excreción viral como ha sido demostrado utilizando vacunas convencionales de virus muerto de influenza porcina, por lo que los cerdos subclínicamente afectados pueden diseminar el virus e infectar animales susceptibles .

Las vacunas de virus muerto contra el virus de influenza porcina han sido aprovechadas para la inmunización, con la finalidad de reducir los signos clínicos

ocasionados por la enfermedad, sin embargo se ha demostrado que las vacunas de virus muerto, no reducen la intensidad de excreción viral después del desafío en comparación con los cerdos que no han sido vacunados (Larsen *et al.*, 2000). En la presente investigación la aplicación de una vacuna bivalente no redujo el nivel de excreción viral, puede deberse a que las vacunas de virus muerto inducen principalmente una respuesta de tipo humoral. Para tener una protección completa contra el virus de influenza porcina, se necesita que la inmunidad sea mediada por células y anticuerpos.

Karasin *et al.*, (2000) indican que debe existir una vacuna que induzca una inmunidad completa, la cual se evalúa a través de la nula excreción de virus posterior a la infección, sin embargo, se reconoce que este nivel de protección es raramente alcanzado a través de la vacunación.

Es el caso del virus de influenza, donde la vacunación induce una respuesta inmune, que reduce la presentación de signos clínicos de la enfermedad, pero no previene la infección, ni la excreción del virus utilizando vacunas convencionales de virus muertos, por lo que cerdos afectados sub clínicamente, pueden transmitir el virus a cerdos susceptibles, esta situación representa un importante riesgo en la recirculación del virus de influenza lo que puede incrementar la posibilidad de un brote si se interrumpe la vacunación.

Jürgen *et al.*, (2006) indican que las vacunas constituidas a partir de virus muerto inducen una respuesta inmunológica tan solo de tipo humoral, mientras que una mejor y completa protección puede requerir una respuesta inmune de tipo humoral y celular la cual se puede lograr utilizando vacunas de virus vivo modificado.

Heinen *et al.*, (2001) utilizaron una vacuna comercial que utiliza (A/sw/Oedenrode/96(H3N2) para analizar la calidad de la protección inducida, monitoreo la respuesta inmune con las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación y virus seroneutralización y encontró que esta vacuna solo confiere una protección parcial.

Larsen *et al.*, (2000) realizaron un estudio aplicando una vacuna convencional de virus inactivado 4 semanas antes de aplicar una vacuna de DNA de la HA desarrollando mayores niveles de anticuerpos en el suero contra el virus de influenza porcina y fue significativamente en mayor grado que los cerdos que solo recibieron 2 dosis de HA DNA.

La prevalencia y distribución de los virus de influenza y el predominio de los subtipos es variable dentro de las regiones de un país o continente (Easterday *et al.*, 1999).

En este trabajo se planteó determinar la presencia de animales seropositivos al virus de influenza porcina, objetivo que fue alcanzado, sin embargo se cree que es

necesario realizar estudios de prevalencia alrededor de la granja, para corroborar estos resultados preliminares.

Se identificó la seroconversión que confirió la aplicación de una vacuna bivalente del virus de influenza porcina en hembras y sus lechones destetados.

Otro de los objetivos del estudio fue conocer, si la vacunación mejoraba las variables reproductivas de las hembras vacunadas (número de lechones nacidos totales, nacidos vivos, nacidos muertos, número de momias, peso total de la camada y peso promedio del lechón). En estas variables no se observó diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre hembras vacunadas y no vacunadas, sin embargo se recomienda llevar un seguimiento del peso de los lechones hasta el destete como una variable de estudio.

VIII. CONCLUSIONES

Se concluye que la prueba de inhibición de la hemoaglutinación es una prueba serológica rápida y económica, que nos permitió determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de influenza porcino subtipo H1N1 y H3N2 presentes en la granja.

La prueba de Inhibición de la hemoaglutinación identificó la presencia de anticuerpos específicos en hembras y lechones en contra del virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1 y H3N2 en una misma unidad de producción.

La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa determinó la presencia del material genético correspondiente al virus de influenza porcina tipo A subtipos H1N1 y H3N2 en hembras y lechones.

La técnica de RT - PCR es una prueba altamente sensible que nos permite determinar la presencia y conocer el subtipo del virus presente en una granja porcina, sin embargo es necesario estandarizar la técnica en tiempo real para que los resultados sean cuantitativos.

La aplicación de 2 dosis de la vacuna de virus inactivado de influenza porcina subtipo H1N1 y H3N2 incrementó significativamente los títulos de anticuerpos en hembras gestantes.

La aplicación de la vacuna de virus inactivado no redujo la excreción del virus de influenza porcina tipo A subtipo H1N1 y H3N2 en hembras vacunadas.

Los lechones nacidos de hembras que fueron vacunadas presentaron mayores títulos serológicos y mayor duración de anticuerpos adquiridos a través de la inmunidad pasiva.

La vacunación contra el virus de influenza porcino, no influyó en los parámetros reproductivos, sin embargo se considera necesario evaluar a los cerdos hasta la etapa de finalización donde probablemente se encuentren cambios en las variables.

Es necesario realizar registros, de la identificación del virus de influenza porcina tipo A subtipos de H1N1 y H3N2 para determinar en el futuro si existe un cambio en su prevalencia.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez FM, Rodríguez BJ, Ciprián CA, Rodríguez GG. Perfil serológico del virus de influenza porcina, *Mycoplasma Hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* en granjas de Yucatán, México. UNAM. Vet. Mex. 2004 35 (4); 295-305
2. Bachmann PA. Virus infections of porcines. New York. 1989;193-207
3. Burleson F, Chamberes T, Wiedbrauk D. Hemagglutination inhibition assays en: Virology a Laboratory Manual San Diego E.U. 1999; 130-4.
4. Burleson F, Chamberes T, Wiedbrauk D. Inmunoflorescent Staining of EMC Virus-Infected cell en: Virology a Laboratory Manual. San Diego E.U. 1999; 135-7.
5. Burleson F, Chamberes T, Wiedbrauk D. Replication in embrionated eggs en: Virology a Laboratory Manual. San Diego E.U. 1999;45-54
6. Castro JM, Del Pozo M, Simarro. Indentification of H3N2 influenza virus isolated from pigs with respiratory problems in Spain. Vet Rec. 1988 122:418-9.
7. Castro PF. Biotecnología veterinaria en: Memorias XVI curso Avimex "inmunización factor clave para la competitividad" México D.F. 2004; 61-69
8. *Celedón* VMV, Maria O. Aspectos que inciden en la re-emergencia de los virus de influenza. Universidad de Chile. 2000; 1-5.
9. Chambers TM, Hinshau VS, Kawaoka Y, Easterday BC, Webster RG. Influenza viral infection of swine in the United States 1988-1989. Arch. Virol. 1991 116:261-5.
10. Claas ECJ, Kawaoka JC, De Jong N, Masurel N and Webster RG. Infection of children with avian-human reassortant influenza virus from pigs in Europe. Virology 1994 204:453-7.
11. Choi YK, Goyal SM, Kang SW, Farnham MW and Joo HS. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT - PCR assays. J Vir Met. 2002 102:53-9.
12. Choi YK, Goyal SM, Kang SW, Farnham MW and Joo HS, Phylogenetic analysis of H1H2 islotes of influenza a virus from pigs in the United States. USA. 2002 ;173-9
13. Choi YK, Goyal SM, Kang SW and Joo HS. Evaluation of transmission of swine influenza type A subtype H1N2 virus in seropositive pigs. AJVR 2004 65 3: 303-6

14. Dea S, Bilodeau R, Sauvageau R, Montpetit C, Martineau GP. Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. *J Vet Diag Invest* 1992 4(4):380-92.
15. Deck RR, De Witt CM, Donnelly JJ, Liu MA, Ulmer JB. Characterization of humoral immune responses induced by an influenza DNA vaccine. 1997 15:71-8.
16. Easterday BC. The epidemiology and ecology of swine influenza as a zoonotic disease. *Comp Immunol Microbiol Dis* 1980 3:105-9
17. Easterday BC, Murphy BR, McGregor S. Infection and vaccination of pigs with influenza A/New Jersey/8/76 (Hsw1N1) virus. *J Infect Dis* 1977136(Suppl): 699-702.
18. Easterday BC, Hinshaw VS. Swine Influenza. en: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Allaire SD, Taylor DJ, editors. *Disease of swine*. Ames: Iowa State Press. 1992; 349-57
19. Easterday BC, Van Reeth K. Swine influenza in viral diseases. 1999; 227-91.
20. Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, *et al.*, Characterization of a novel influenza A virus Hemmagglutinin subtype (H16) Obtained from Black- Head Gulls. *Jour Virol* 2005 79 5; 2814-22
21. Frace AM, Klimov AI, Rowe T, Black RA, Katz JM. Modified M2 proteins produce heterotypic immunity against influenza A virus. *Vaccine* 1999 17; 2237-44.
22. Girard C, Morin M, Elazhary Y. Experimentally induced porcine proliferative and necrotising pneumonia with influenza A virus. *Vet Rec* 1992130(10):206-7.
23. Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, *et al.*, Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *J Virol* 1991 65:3704-14
24. Hay AJ. The action of adamantanamines against influenza A viruses: Inhibition of the M2 ion channel protein. *Virology* 1992 3:21-30
25. Heinen PP, Kay RM, Done SIL. Swine influenza: a zoonosis. 2000; 1-15
26. Heinen PP, Van-Nieuwstadt AP, EA de Boer-Luijtzte and Bianchi AT. Analysis of the quality of protection induced by a porcine influenza A vaccine to challenge with an H3N2virus. *Vet Immunol. Immunopathol.* 2001 82; 39-56
27. Heinen PP, Boer-luijtzte EA, Bianchi AT. Respiratory and systemic humoral and cellular immune response of pigs to a heterosubtypic influenza A virus infection. *J. Gen. Virol.* 2001 82; 2697-707

28. Ito T, Couceiro NS, Kelm S, Baum GI, Krauss S. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A Viruses with Pandemic Potential. *Journal of Virology*. 1998 72 (9); 7367-73
29. Janke BH. Classic swine influenza. *Large Anim Pract*. 1998 19; 24-9
30. Karasin AI, Olsen CW, Anderson GA. Genetic characterization of an H1N2 influenza virus isolated from a pig in Indiana. *J. Clin. Microbiol*. 2000 38; 2453-6.
31. Klinsas V. El virus de influenza y la gripe aviar: una amenaza latente. *Academia Biomedica Digital. Universidad Central de Venezuela*. 2005 24; 1-4.
32. Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian to human transmission of the PB1 gen of influenza A viruses in the 1957 and 1968p pandemics. *Virology*. 1989 63; 4603-8
33. Lamb RA, Krug RM. *Orthomyxoviridae the viruses and their replication*. 2000; 725-63
34. Landolt G, Karasin A, Hofer C. Use of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay and cell culture methods for detection of swine influenza A viruses. *University of Wisconsin. Amj Vet*. 2005 66 (1); 119-24
35. Larsen DL, Karasin A, Olsen CP. Immunization of pigs against influenza virus infection by DNA vaccine priming followed by killed- virus vaccine boosting. *Vaccine* 2000 19; 2842-53
36. Laval A, Le Foll P, Gestin G, Reynaud G. Gripes et coronavirus respiratoire porcin tude serologique dans dix levages bretons. *Rec Med Vet* 1991 167: 521-8
37. Macklin MD, McCabe D, McGregor M. Immunization of pigs a particle-mediated DNA vaccine to influenza a virus protects against challenge with homologous virus. *Journal of Virology*. 1998; 1491-6
38. Maes L, Haesebrouck F, and Pensaert M. Experimental reproduction of clinical disease by intratracheal inoculation of fattening pigs with swine influenza virus isolates. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 1984 8:60.
39. Majno G and Joris I. *Cells, tissues, and disease. Principles of general pathology*. Department of Pathology University of Massachusetts Medical School. Ed. Blackwell Science, Worcester, Massachusetts. 1999; 588-91.
40. Yooh KJ, Janke BH, Morilla A, Kyoung-Jin Y, Jeffrey JZ. *Trends en emerging viral infections of swine*. Ed. Iowa State Press. USA. 2002; 23-41.

41. Morin M, Girard C, Elazhary Y, Fajardo R, Drolet R, Lagace A. Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: A newly recognized disease. *Can Vet J* 1990; 31:12.
42. Murphy BR and Webster RG. Orthomyxoviruses in fields. *Virology*. 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA. 1996; 1397-445.
43. Olsen CW. Vaccination against influenza viruses: a review with emphasis on equine and swine influenza. *Vet Microbiol* 2000; 74:149-64
44. Palacios JM, Carreón NR, Chapa-Bezanilla J, Pacheco R Análisis comparativo del diagnóstico serológico de Influenza porcina en México utilizando 3 antígenos diferentes de los serotipos H1N1 y H3N2 en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación contra la prueba de ELISA. Memorias del XLI Congreso Nacional de AMVECAC, 16-19 Julio 2006 Ixtapa Guerrero México.
45. Pensae MB. Virus infections of porcines. B.V. Amsterdam, Oxford, New York and Tokyo. Ed. Elsevier Science Publisher 1989; 193-203.
46. Poljak Z, Dewey CE, Martin SW, Christensen J, Carman S, Friendship RM. Prevalence of and risk factors for influenza in southern Ontario swine herds in 2001 and 2003. *Can J Vet Res.* 2008 72(1):7-17
47. Poljak Z, Friendship RM, Carman S, McNab WB, Dewey CE Investigation of exposure to swine influenza viruses in Ontario (Canada) finisher herds in 2004 and 2005. *Prev Vet Med.* 2008 83(1):24-40.
48. Plonait H and Bickhardt K. Manual de las enfermedades del cerdo. Ed. Acribia. 2a Edición. Zaragoza (España). 2001; 128-30.
49. Rapp VJ, Gergen LR, Eddy BA, Junker DE, Weston CQ, *et al.*, Protection of a swine influenza virus vaccine against an H3N2 virus antigenically and genetically distinct from the vaccine virus, Memories from the 4th International symposium of Emerging and Re-emerging Pig Diseases , Roma 2003
50. Reeth KV, Brown I, Essen S, Pensae MB. Genetic relationships, serological cross-reaction and cross-protection between H1N2 and other influenza A virus subtypes endemic in European pigs. *Virus Res.* 2004 103:115-24
51. Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, Lourens RM, Taubenberger JK , Novel origin of the 1918 Pandemic Influenza virus nucleoprotein gene. *J Virol* 2004 78 (22); 12462-70
52. Richt JA, Lekcharoensuk P, Lager KM, Vincent AL, Loiacono CM, Janke BH, Wu WH, Yoon KJ, Webby RJ, Solórzano A, and García A. Vaccination of Pigs against Swine Influenza Viruses by Using an NS1-Truncated Modified Live-Virus Vaccine. *Journal of Virology* 2006 80 (22): 11009-18

53. Rhom C, Zhou N, Suss J, Mackenzie J, Webster RG. Characterization of a novel influenza hemmagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology* 1996 217; 508-16.
54. Richardson JC and Akkina RK. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch Virol* 1991 116; 69-80.
55. Rogers GN and Paulson JC. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemmagglutinin based on species of origin. *Virology* 1983 127; 361-73
56. Rogers GN, Pritchett JL, Lane L, Paulson JC. Differential sensitivity of human, avian and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: selection of receptor specific variants. *Virology* 1983 131; 394-408.
57. SAS: SAS User's Guide: Statistics. 4th ED. SAS institute, Inc., Cary, NC, (1999).
58. Saby V, Malbrán CG. ¿estamos a las puertas de una nueva pandemia de influenza? *Revista Química Viva. Argentina* 2004 2; 1-7
59. Sánchez JM La Vacunación en: Memorias XVI curso Avimex "inmunización factor clave para la competitividad" México D.F. 2004; 37-42
60. Schlutz U, Fitch WM, Ludwig S, *et al.*, Evolution of pig influenza viruses. *Virology* 1991 183; 61-73
61. Sheerar MG, Easterday BC, Hinshaw VS. Antigenic conservation of H1N1 swine influenza viruses. *J Gen Virol.* 1989 70 3297-303
62. Slepshkin VA, Katz JM, Black RA, Gamble WC, Rota PA and Cox MJ. Protection of mice influenza A virus challenge by vaccination with vaculovirus-expressed M2 protein. *Vaccine.* 1995 13;1399-402
63. Soto E, Camacho E, Murillo MA, Vence JM, Suárez A. Principios Generales de Buenas Prácticas de Vacunación en: Memorias XVI curso Avimex "inmunización factor clave para la competitividad" México DF. 2004; 49-60
64. Straw EB, D'allaire S, Mengeling LW, Taylor JD. Diseases of swine. Ed. Iowa State Press. 8th Edition. USA. 1999; 277-90.
65. Takimoto S, Grandien M, Ishida MA, Pereira MS, Paiva TM, Ishimaru T, Makita EM, Martínez HO. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect immunofluorescence assay, and virus isolation for detection of respiratory viruses in nasopharyngeal secretions. *J. Clin. Microbiol* 1991 29; 470-4.
66. Tang M, Harp JA, Wesley RD. Recombinant adenovirus encoding the HA gene from swine H3N" influenza virus partially protects mice from challenge with heterologous virus: A/HK/68 (H3N2). *Archives of virology.* USA. 2002; 2125-41.

67. Taubenberger J. The genes of influenza A. *Issue of Science.USA.* 2005;1-7
68. Taylor, DJ. Swine influenza. *Pig diseases* 7th edition. 1999; 1-3.
69. Ulmer JB, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, Donnelly JJ, Liu MA. Protective immunity by intramuscular injection of low doses of DNA vaccines. *Vaccine* 1994 12;1541-4
70. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, *et al.*, Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993 259; 1745-9.
71. Wang X, Li M, Zheng H, Musetr T, Palese P, Beg AA. Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappa B and induction of alpha beta interferon. *J Virol* 2000 74; 11566-73
72. Webby RJ, Swenson SL, Krauss SL, Genrrih PJ, Goyal SM and Webster RG. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United Sates. *J. Virol.* 2000 74 (18); 8243-51.
73. Zhou NN, Senne DA, Landgraf JS, Swenson SL, Ericson G Rossow K, Liu L, Yoon KJ, Krauss S and Webster RG. Genetic reassortment of avian, swine and human influenza A viruses in American pigs. *J. Virol.* 1999 73; 8851-6.

X. ANEXOS

ANEXO 1. Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (Burlison, *et al.*, 1999).

Material

1. Virus:
 - a. Influenza Porcina subtipos H1N1 y H3N2 ajustados a una concentración de 8 Unidades Hemoaglutinantes (UHA).
2. Diluyente:
 - a. Solución Buferada Fosfatada (PBS), con pH de 7.2
3. Glóbulos rojos de ave al 0.5%:
 - a. Se obtuvo mediante punción de la vena radial del ala con una jeringa que contenía alseiver para evitar la coagulación de la sangre, los eritrocitos obtenidos se lavaron con PBS centrifugándolos a 1500 rpm durante 10 minutos tres veces, para almacenarlos se diluyeron en PBS y se refrigeraron a 4 °C por no más de 5 días.
4. Placas de 96 pozos con fondo en "U"
5. Micropipetas (Multicanal)
6. Sueros:
 - a. Inactivados a 56 °C por 30 minutos
 - b. Adsorbidos

Método:

Antes de realizar la prueba de IH los sueros se pusieron en baño maría por 30 minutos a 56 °C para inactivar las proteínas del complemento, después en una placa de fondo plano se fueron colocando 60 µl de cada suero inactivado, 120 µl de glóbulos rojos al 5% y 120 µl de Kaolín.

Para realizar esta prueba se utilizaron placas de fondo en "U" con 96 pozos, horizontalmente (Columnas) están identificadas por números consecutivos que van del 1 – 12 y verticalmente (Filas) por letras que van de la A – H.

En toda la placa se colocaron 50 µl de PBS, en la columna 1 se pusieron 50 µl de los sueros inactivados, uno en cada pozo, se realizaron diluciones dobles seriadas que van de la columna 1 – 12 y al final se desecharon los 50 µl restantes.

De lo antes mencionado se realizaron dos placas iguales, es decir los mismos sueros en las mismas ubicaciones. A una placa se le colocaron 50 µl del virus de influenza porcina subtipo H1N1 y a la otra el subtipo H3N2 ajustados a una concentración de 8 UHA, se dejaron incubar de 20 – 30 minutos a temperatura ambiente y se le depositaron 50 µl de glóbulos rojos de ave al 0.5%, nuevamente se dejaron incubar de 20 – 30 minutos y se refrigeraron a 4 °C por 5 – 10 minutos antes de realizar la lectura.

Interpretación

Se tomó como punto final de la actividad del suero la máxima dilución en la que el fenómeno de hemoaglutinación fue inhibido, diluciones de 1:40 o inferiores fueron consideradas negativas y a partir de 1:80 a 1:320 indicaron exposición previa al virus y valores superiores de 1:640 representaron respuesta a una infección reciente contra el virus de Influenza Porcina (Burleson, *et al.*, 1999).

El virus utilizado en esta prueba se obtuvo mediante su replicación en embriones de pollo, de 9 a 11 días de edad. (Burleson, *et al.*, 1999)

Material

1. Virus (subtipos H1N1 Y H3N2)
2. Embriones de pollo
3. Ovoscopio
4. Jeringas para insulina
5. Pegamento blanco
6. Solución yodada o Alcohol

Método:

1. Los huevos fueron ovoscopiados para determinar si el embrión estaba vivo y su posición, pues los virus requieren de tejidos vivos para su replicación, cuando un embrión era saludable presentaba color anaranjado con evidente vascularización y un embrión muerto era amarillo claro con falta de vasos sanguíneos, un color negro, café o verde era indicativo de contaminación por lo que el embrión fue descartado.
2. Se desinfectó el cascarón para evitar cualquier contaminación y realizamos un orificio pequeño a través de la cual se realizó la inoculación del virus.
3. El sitio de la inyección del virus fue de 5 – 6 mm arriba de la cámara de aire a un tercio de distancia del embrión utilizando una jeringa para insulina, la perforación fue sellada y el embrión fue incubado nuevamente a 37 °C con una humedad de 62% y circulación de aire para evitar la desecación.
4. Algunos embriones murieron entre 16 y 24 horas después de haber sido inoculados por contaminación o por algún trauma ocasionado con la aguja de la jeringa durante la inyección del virus, por lo que fueron desechados.
5. La recuperación del virus se llevó a cabo entre las 48 y 72 horas después de su inoculación a través de la colección del líquido alantoideo, el cual se obtuvo con puntas estériles y micropipetas, se colocó en tubos de ensayo y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos.
6. Se recuperó el sobrenadante y se tituló con la prueba de hemoaglutinación.

ANEXO 2

Material

1. Virus
 - a. El virus de influenza (H1N1 y H3N2) a titular se obtuvo de la inoculación de los embriones.
2. Diluyente
 - a. Solución Buferada Fosfatada (PBS), con pH de 7.2
3. Glóbulos rojos de ave al 0.05%
4. Placas de 96 pozos con fondo en "U"
5. Micropipetas (Multicanal)

Método

1. Se colocaron 50 μ l de PBS en una placa de fondo en "U".
2. Se pusieron 50 μ l del virus a titular en la columna 1A hasta la 1G y el pozo 1H se dejó sin virus, fue el control negativo.
3. Se llevaron a cabo diluciones dobles seriadas en proporciones constantes de 50 μ l en todas las filas desechando el sobrante, excepto en la fila 1H.
4. Se agregaron 50 ml de glóbulos rojos de ave lavados y diluidos al 0.5% en los 96 pozos.
5. Se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos

Interpretación

La última dilución en la que la hemoaglutinación es completa, se tomó como punto final, expresándose como el número de unidades hemoaglutinantes o título del virus.

* Virus replication in embryonated eggs Virology a laboratory manual (Burlison, *et al.*, 1999).

ANEXO 3

Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT - PCR)

Extracción del RNA (Gibco Life T., 1996)

1. Se tomaron 500 μ l de suero o si la muestra era un hisopo se lavó con 800 μ l de PBS y se recuperó el sobrenadante.
2. Se adicionó 1 ml de Trizol (Gibco BRL), se homogenizó y se incubó por 10 minutos a 4 °C.
3. Se agregaron 200 μ l de cloroformo frío y se agitó 15 segundos en el vortex (para romper las membranas celulares) y se incubó por 5 minutos a 4 °C.

4. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
5. Se recuperó el sobrenadante (RNA) con mucho cuidado y se le adicionó el mismo volumen que se recuperó de isopropanol frío y se incubó por 15 minutos a 4 °C.
6. Se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4 °C y se decantó el isopropanol.
7. Se lavó la pastilla de RNA con 200 μ l de etanol al 70% (Vortex por 15 segundos; no pipeteo).
8. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
9. Se decantó el etanol y se dejó secar, la pastilla de RNA la resuspendimos con 20 - 30 μ l de agua DEPC al 0.1%.
10. Para su conservación se puede congelar a -80 °C

Procedimiento

Transcriptasa Reversa

Obtención del DNA complementario

1. Pool de RNA's
2. Se Identificaron los microtubos eppendorf y se agregaron
3. 5.8 μ l de H₂O DEPC
4. 5.7 μ l de la muestra a evaluar y se homogenizó
5. 1 μ l de dNTP's
6. 1.3 μ l de Oligos, primers o iniciadores y se metió al Termociclador
 - a. 5 minutos a 65 °C
 - b. 5 minutos a 4 °C
7. Se adicionó y se mezcló
 - a. 4 μ l de Buffer (5x)
 - b. 1 μ l de DTT (0.1M)
 - c. 1 μ l de RNAsa Out (40 U/M)
8. Se incubó a 42 °C por 2 minutos
9. Se incubó por 5 minutos a 4°C
10. Se adicionó 1 μ l de RT (200 U/M)
11. Se incubó
 - a. 50 min a 42 °C
 - b. 15 min a 70 °C
 - c. 10 min a 4 °C

Reacción en Cadena de la Polimerasa

1. 2.5 μ l de 10x Accu Prime™ RT - PCR Buffer II
2. 1 μ l de Primer Mix (10 μ M de cada uno)
3. 7 μ l de cDNA
4. 1 μ l de Accu Prime™ Taq DNA Polymerase
5. 12.5 μ l de Agua destilada estéril.

Condiciones de amplificación.

1. Desnaturalización inicial 5 min a 95 ° C
2. 30 ciclos de:
 - a. Desnaturalización 30 seg a 95 ° C
 - b. Alineación 1 min a 55.5 ° C
 - c. Extensión 35 seg a 72 ° C
3. Extensión final 5 min a 72 ° C

El producto de RT - PCR se corrió por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% con el marcador de peso molecular DNA plus (1Kb) en el carril uno, y el resto de los carriles las muestras a analizar, dejando los tres últimos pozos para los dos controles positivos y el negativo.