



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA SUBTIPOS H1N1 Y H3N2 MEDIANTE RT-PCR

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ROLANDO BELTRAN FIGUEROA

ASESORES:

Dra. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA

Dr. JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT



MÉXICO, D.F. ENERO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

En Memoria:

A mi padre **Sergio Beltrán Ramírez**, por haberme brindado tantos momentos maravillosos e inolvidables, que seguirán conmigo a lo largo de mi vida, dios te bendiga. Lo mejor de ti seguirá en mi corazón.

A mi madre **Carmen Figueroa Hernández**, por tener siempre confianza en mí por apoyarme en todos mis proyectos pero sobre todo por cuidarme y amarme.

GRACIAS POR TODO GUAPA TE AMO.

Ady y Edgar, por enseñarme que las metas que uno persigue se pueden alcanzar con paciencia, dedicación, entrega y sabiduría. Son un prototipo excelente tanto como pareja y como padres ejemplo claro a seguir, estoy muy orgulloso de ustedes.

Sergio y Elvira, porque siempre que necesito de su apoyo incondicional están a mi lado, por demostrarme que se puede llegar muy lejos en la vida estando juntos como familia.

A mis sobrinos **DANY Y SERGITO**, por llenar mi vida de inspiración, esperanza y alegría. Dany eres como mi hermana por lo que deseo que alcances todas tus metas en la vida y que seas feliz sin embargo no se te debe olvidar que la única responsable de que logres todo lo que te propongas serán tus propios actos y decisiones. **MUCHA SUERTE! CREO EN TI....**

A mi cariño **VERO**, por haber creado una historia romántica para darme la oportunidad de estar a tu lado, porque lo que he encontrado contigo es un camino lleno de felicidad y amor, y gracias por ayudarme a salir adelante para culminar este proyecto cuando mas lo necesitaba. **TE AMO Y SE QUE A TU LADO CONSEGUIRÉ UN CAMINO DE COMPRENSIÓN, AMOR Y FELICIDAD.**

A **Eslí**, por enseñarme que tener un amigo es un **DON**, conservar un amigo es una **VIRTUD** y ser tu amigo es un **HONOR**. Por toda tu ayuda y entrega a todo lo que haces se que vendrán más proyectos que realizaremos juntos.

A *Dra. María Elena Trujillo Ortega, Phd Laura Batista García, M.C Marco Antonio Herradora Lozano* y al *Dr. José Iván Sánchez Betancourt*. Por creer en mí, porque me han motivado para seguir adelante, por incluirme dentro de sus proyectos, y por compartir sus conocimientos y experiencias.

AGRADECIMIENTOS

A todos los integrantes del **Departamento de Producción Animal: Cerdos** por convertirse cada uno en mis maestros, los admiro y respeto porque conozco la calidad de su trabajo.

A mis sinodales **Alfredo Sahagún Ruiz, Carmen Mercado Garcia, Rosalba Carreón Nápoles, Laura Cobos Marín** por su valiosa cooperación, disponibilidad y sugerencias para la elaboración de mi tesis.

A **MS. Martha A. Acosta de PROFESSIONAL SYSTEMS (SIS-PRO)**. Por brindarme todo el apoyo para asistir al congreso de la American Association of Swine Veterinarians (AASV) 2005, un viaje que me cambio mi panorama de la veterinaria y que nunca olvidare. *“Las promesas deben cumplirse”*

A **MVZ. Roberto Martínez Rodríguez**, por permitirme incorporar a la granja para iniciar el modelo experimental de este trabajo su ayuda fue muy valiosa e importante.

A **M.C Susana Espinoza Hernández**, por capacitarme teórica y prácticamente en la evaluación y elaboración de dosis de semen.

A **Ing. Agrónomo Especialista en Zootecnia. Reyes López Ordaz**. Por su valiosa participación del inicio para el análisis estadístico de resultados.

A Comité Científico de la **Asociación de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC)** por reconocer mi esfuerzo y mi trabajo.

A mis amigos **ABIGAIL, ERANDI, CHIO, MANUEL, y EDGAR**, se que algún día serán los pilares de la porcicultura.

Agradecer por ultimo a la mejor universidad de México que es la **UNAM.**
HECHO EN C.U

CONTENIDO

| | |
|--|-------------|
| DEDICATORIA | II |
| AGRADECIMIENTOS | III |
| CONTENIDO | IV |
| ABREVIATURAS | VII |
| RESÚMEN | VIII |
| | |
| 1.0 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS | 1 |
| 1.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA | 3 |
| 1.3 AGENTE ETIOLÓGICO | 4 |
| 1.4 EPIDEMIOLOGÍA | 7 |
| 1.5 REPLICACIÓN VIRAL | 8 |
| 1.6 TRANSMISIÓN INTERESPECIES | 9 |
| 1.7 SIGNOS CLÍNICOS | 11 |
| 1.8 LESIONES | 13 |
| 1.8.1 MACROSCÓPICAS | 13 |
| 1.8.2 MICROSCÓPICAS | 13 |
| 1.9 DIAGNÓSTICO | 14 |
| 1.9.1 SEROLÓGICO | 14 |
| 1.9.2 MOLECULAR | 15 |
| | |
| 2.0 JUSTIFICACIÓN | 16 |
| | |
| 3.0 OBJETIVOS | 17 |
| 3.1 OBJETIVO GENERAL | 17 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 17 |
| | |
| 4.0 HIPÓTESIS | 18 |
| | |
| 5.0 MATERIAL Y MÉTODOS | 19 |
| 5.1 CARACTERÍSTICAS DE LA GRANJA | 19 |
| 5.2 METODOLOGÍA DE MUESTREO | 19 |
| 5.2.1 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE PRODUCCIÓN | 20 |
| 5.2.2 DETECCIÓN DE RNA VIRAL EN LAS DIFERENTES DIFERENTES ETAPAS DE PRODUCCIÓN | 20 |
| 5.3 OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS | 20 |
| 5.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS | 21 |
| 5.5 REPLICACIÓN VIRAL | 21 |
| 5.6 INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN | 23 |
| 5.7 EXTRACCIÓN DE RNA VIRAL | 24 |
| 5.8 INICIADORES DE LA PCR | 25 |
| 5.9 TRANSCRIPTASA REVERSA | 26 |
| 5.10 PCR SIMPLE | 27 |
| 5.11 PCR MÚLTIPLE | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 5.12 PREPARACIÓN DE GELES DE AGAROSA | 28 |
| 5.13 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN | 29 |
| 6.0 RESULTADOS GENERALES | 31 |
| 6.1 RESULTADOS SERLÓGICOS MEDIANTE INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACIÓN | 31 |
| 6.1.1 PIE DE CRÍA | 31 |
| 6.1.2 LÍNEA DE PRODUCCIÓN | 32 |
| 6.2 RESULTADOS MOLECULARES MEDIANTE RT-PCR MÚLTIPLE | 36 |
| 6.2.1 PIE DE CRÍA | 36 |
| 6.2.2 LÍNEA DE PRODUCCIÓN | 36 |
| 7.0 DISCUSIÓN | 40 |
| 8.0 CONCLUSIONES | 44 |
| 9.0 LITERATURA CITADA | 45 |
| FIGURAS. | |
| Figura 1. Estructura del virus de influenza. | 6 |
| Figura 2. Replicación del virus de influenza. | 9 |
| Figura 3. Protocolo de tiempos y temperaturas de la RT. | 26 |
| Figura 4. Protocolo de tiempos y temperaturas de la RT-PCR múltiple. | 27 |
| Figura 5. Detección e identificación de los subtipos H1N1 y H3N2 del VIP. | 29 |
| Figura 6. Resultados generales RT-PCR múltiple carril 1-22. | 38 |
| Figura 7. Resultados generales RT-PCR múltiple carril 23-44. | 38 |
| Figura 8. Resultados generales RT-PCR múltiple carril 45-67. | 38 |
| Figura 9. Resultados generales RT-PCR múltiple carril 68-89 | 39 |
| Figura 10. Resultados generales RT-PCR múltiple carril 90-111. | 39 |
| CUADROS | |
| CUADRO 1. Iniciadores de la RT-PCR múltiple | 25 |
| CUADRO 2. Resultados serológicos de IH en hembras del pie de cría, subtipos H1N1 y H3N2. | 31 |
| CUADRO 3. Resultados serológicos de IH en cerdos de línea de producción, subtipos H1N1 y H3N2. | 33 |
| CUADRO 4. Resultados de RT-PCR múltiple pie de cría, subtipos H1N1 y H3N2, en suero e hisopo nasal. | 36 |
| CUADRO 5. Resultados de RT-PCR múltiple en línea de producción, subtipos H1N1 y H3N2, en suero e hisopo nasal. | 37 |
| GRÁFICAS | |
| Box-Plot 1. Resultados serológicos obtenidos mediante IH subtipos H1N1 y H3N2 (Pie de Cría). | 32 |
| Box-Plot 2. Resultados serológicos obtenidos mediante IH subtipo H1N1 (Línea de Producción). | 34 |

Box-Plot 3. Resultados serológicos obtenidos mediante IH subtipo H3N2. Fase 2 (Línea de Producción).

35

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Ácido Desoxirribonucleico | (ADN) |
| Ácido Ribonucleico | (ARN) |
| Bromuro de Etidio | (Br-E) |
| Control negativo | C (-) |
| Dietil-pirocarbonato | (DEPC) |
| Grados Centígrados | (°C) |
| Hemaglutinina | (H) |
| Hisopo nasal | (h) |
| Influenza Porcina | (IP) |
| Inhibición de la Hemoaglutinación | (IH) |
| Libres de Patógenos Específicos | (SPF) |
| Marcador de Peso Molecular | (MPM) |
| microlitro (´s) | (µl) |
| minutos | (min.) |
| nanómetro (´s) | (nm) |
| Neuraminidasa | (N) |
| Nucleoproteína | (NP) |
| Pares de Bases | (pb) |
| Solución Buffer Fosfatos | (PBS) |
| Suero | (s) |
| Positivo | (+) |
| Proteína Matriz | (M) |
| Reacción en Cadena de la Polimerasa | (PCR) |
| segundos | (seg.) |
| <i>Thermus aquaticus</i> | (Taq.) |
| Transcriptasa Reversa | (RT) |
| Tris ácido acético, EDTA | (TAE) |
| Virus de Influenza Porcina | (VIP) |
| volts | (V) |

RESUMEN

BELTRAN FIGUEROA ROLANDO. Identificación del virus de Influenza Porcina subtipos H1N1 y H3N2 mediante RT-PCR. (Bajo la dirección de Dra. María Elena Trujillo Ortega y Dr. José Iván Sánchez Betancourt).

El virus de influenza porcina es un virus RNA de la familia *Orthomixoviridae*, que interviene dentro del Complejo Respiratorio Porcino como agente primario los subtipos que frecuentemente afectan al cerdo son principalmente H1N1, H3N2 y H1N2. El objetivo de este estudio fue detectar el virus de influenza porcina e identificar los subtipos H1N1 y H3N2 en sueros porcinos e hisopos nasales mediante la técnica de RT-PCR múltiple. El estudio se realizó en una granja porcina de ciclo completo, en donde se obtuvieron muestras de sangre e hisopo nasal de hembras de pie de cría y animales de la línea de producción; la identificación de anticuerpos se realizó mediante la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación considerando diluciones desde 1:10 hasta 1:1280 con un punto de corte de 1:80. En la técnica de RT-PCR múltiple las condiciones de reacción fueron las siguientes 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C 5 min, 30 ciclos de desnaturalización 95°C por 30 s, alineación 55.5°C por 1 min. y extensión 72°C por 30s; por último 1 ciclo de extensión final a 72° por 5 min.

Los resultados serológicos demostraron una seroprevalencia para el pie de cría del 96.55% para los subtipos H1N1 Y H3N2; mientras que en los animales de la línea de producción se encontró una seroprevalencia global para el subtipo H1N1 de 94.59%, y para el subtipo H3N2 81.98%. Los resultados moleculares identificaron en el pie de cría al subtipo viral H3N2 con el 8.62%, los cerdos de la línea de producción presentaron el 4.05% global para el subtipo H1N1 y 2.70% global para el subtipo H3N2. La IH en México es la prueba que comúnmente se utiliza para la detección de anticuerpos contra el VIP, sin embargo, los resultados demuestran la utilidad de aplicar una prueba diagnóstica molecular como la RT-PCR múltiple en la detección e identificación de los subtipos H1N1 y H3N2 del virus de influenza porcina en suero e hisopo nasal.

IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA

SUBTIPOS H1N1 Y H3N2 MEDIANTE RT-PCR

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La primer cita de la enfermedad de influenza corresponde a Hipócrates, quien en el año 412 AC describe una enfermedad respiratoria identificada al comienzo del invierno, cuya aparición está precedida por cambios marcados en la dirección del viento (1).

En la Edad Media, aparece la enfermedad debido a fenómenos meteorológicos, esto es, a la influencia de los astros de donde deriva el término influenza. Lo anterior lo consignan Doménico y Pietro Buoninsegni, historiadores italianos de la época (1).

La primera descripción de la enfermedad se atribuye al médico americano Robert Johnson, quien describió una epidemia en 1793. Respecto a la etiología, el investigador alemán Richard Pfeiffer estudió la expectoración de pacientes con un cuadro clínico de influenza, detectando gran cantidad de bacterias; hecho que indujo a este investigador a plantear una etiología bacteriana de la enfermedad. (2)

A comienzos del otoño de 1918, en el Medio Oeste de Estados Unidos una nueva enfermedad aparecía en los cerdos, su presentación coincidió con la pandemia gripal que ocasionó la muerte de 20-40 millones de personas (3). El doctor Koen observó la coincidencia con la gripe humana y el parecido en signos clínicos. Koen fue quien dio el nombre de “*flu*” a esta nueva enfermedad porcina, describiéndola como una enfermedad epizootica porcina enteramente nueva sugiriendo que la

infección de los cerdos procedía de la humana, lo cual fue compartido por algunos veterinarios de la época. El nombre de “gripe de cerdos” recibió amplia aceptación para designar a esta afección. La dificultad, en el caso de la influenza del cerdo y del hombre, era que no se conocía el agente etiológico de ninguna de las dos (4).

Diversos aspectos de la enfermedad, como signos lesiones y ciclo biológico, fueron descritos por Dorset *et al.*, 1922 y McBryde 1927. En 1930, el virus de influenza porcina (VIP) fue aislado e identificado por el doctor Richard Shope del departamento de Patología Comparativa del Instituto Rockefeller en Princeton, durante los siguientes 25 años amplió su trabajo, incluyendo estudios de inmunidad, transmisión, adaptación del virus a huéspedes de laboratorio y relaciones antigénicas con otros virus de la influenza (5).

En 1933, una nueva epidemia de influenza afectó a un porcentaje de la población, el doctor Wilson Smith colectó muestras de faringe de personas con influenza, e inoculó en hurones sanos, pronto se comprobó la infección en estos animales, lo que demostraba por primera vez que la etiología de la influenza humana era viral. El científico australiano Maxfarlane Burnet, introdujo el uso de embriones de pollo como medio de cultivo, y George Hirst introdujo la hemoaglutinación como método diagnóstico para la infección por influenza (2).

Para 1938 en Irlanda del Norte Lamont reporta una enfermedad muy parecida a la observada en Estados Unidos por lo que con los reportes de Blakemore y Gledhill (1941) en Inglaterra, confirman que la influenza porcina aparecía en diversas partes del mundo; sin embargo Glover y Andrewes (1943) señalan que los virus relacionados con estos brotes difieren serológicamente del virus norteamericano (4).

El brote de gripe, llamada gripe asiática, que afectó al mundo entero en 1957 dio la oportunidad para estudiar el desarrollo de la pandemia, la cual probablemente tuvo lugar por la aparición de una cepa mutante del virus antigénicamente distinta a otras cepas que había en la población. Como no había inmunidad frente a este nuevo subtipo (H2N2) se expandió rápidamente por todo el mundo, la cepa pudo aparecer debido al reagrupamiento con cepas de un reservorio animal (6).

La enfermedad se describió nuevamente hasta 1976, cuando la influenza porcina afectó a granjas del norte de Italia. Los virus responsables de estos brotes estaban muy relacionados a los virus H1N1 y probablemente habían ingresado a Italia en un embarque de cerdos de los Estados Unidos (Nardelli *et al.*, 1978) (5).

Desde 1979, aparecieron epizootias de influenza H1N1 en Francia, Bélgica, Holanda, Alemania y otros países de Europa continental. Los virus aislados en Europa después de 1979 se encontraban asociados al subtipo H1N1. Las hemaglutininas estaban relacionadas más estrechamente al H1 aviar y es probable que hayan sido transmitidos al cerdo por los patos (5).

Desde fines de la década de los 70's existen reportes de influenza porcina en varios lugares de Asia, la mayoría de esos brotes se debió a los subtipos H1N1 y H3N2 (5).

En los últimos años los subtipos H1N2 y H3N2 han sido asociados a enfermedades respiratorias en cerdos de Estados Unidos y Canadá (7).

1.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA

Las epidemias ocasionadas por el virus de influenza presentan una elevada morbilidad mundial; cada año mas de 200 000 pacientes ingresan a los hospitales

por estar infectados por el virus de influenza de los cuales aproximadamente 36,000 mueren (8).

En 1983 se registró en Pennsylvania EUA la muerte de 15 millones de aves en donde se estima se perdieron cerca de 50 millones de dólares (9).

Actualmente no existen reportes de pérdidas económicas ocasionadas por la enfermedad de influenza porcina en México, sin embargo, cuando existe la presencia del Complejo Respiratorio Porcino, provoca una disminución en la ganancia de peso de 41.1 g diarios y los cerdos tardan 16.7 días más en salir al mercado, aumentando el costo por alimento en \$79.8 pesos por cerdo (10).

1.3 AGENTE ETIOLOGICO.

El virus de influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, palabra que proviene del latín *orthos*-verdadero y *myxo*-moco, del género *influenzavirus* (A, B y C) son virus envueltos, con morfología esférica o pleomórfica; el tamaño de la partícula viral es de 80 a 120 nm de diámetro (11). En la parte externa de la envoltura presentan peplómeros que interactúan con la superficie de la célula hospedadora, estos peplómeros se denominan, hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N), ambos de naturaleza glicoproteica. Se denomina hemaglutinina, por que provoca la aglutinación de los glóbulos rojos, el glóbulo rojo no es el tipo de célula que el virus suele infectar normalmente, pero contiene en su superficie de membrana ácido siálico, el mismo componente que presentan las células de la mucosa del tracto respiratorio. Por tanto los glóbulos rojos constituyen un tipo celular apropiado para medir la actividad aglutinante. Una característica importante de la hemaglutinina del virus es que los anticuerpos dirigidos contra esta hemaglutinina evitan que el virus infecte la célula. En consecuencia, un anticuerpo dirigido contra

la hemaglutinina neutraliza al virus y este es el mecanismo por el que se desarrolla inmunidad (6, 11).

La neuraminidasa rompe el ácido siálico de la membrana citoplasmática, que es un derivado del ácido neuramínico, esta enzima funciona principalmente durante el proceso de ensamblaje vírico, destruyendo el ácido siálico de la membrana del hospedador que podría bloquear el ensamblaje o quedar incorporado en la partícula vírica madura (6).

Además de la neuraminidasa, el virus posee otras dos enzimas, la RNA polimerasa dependiente de RNA, que interviene en la conversión de una cadena negativa en positiva, y una endonucleasa de RNA, que corta un cebador de los precursores del mRNA con encabezamiento (6).

Actualmente se han identificado 15 subtipos de H y 9 subtipos de N, en teoría las posibles combinaciones entre ambas pueden dar lugar a la formación de 135 virus diferentes de influenza cada uno con características antigénicas específicas (1, 12).

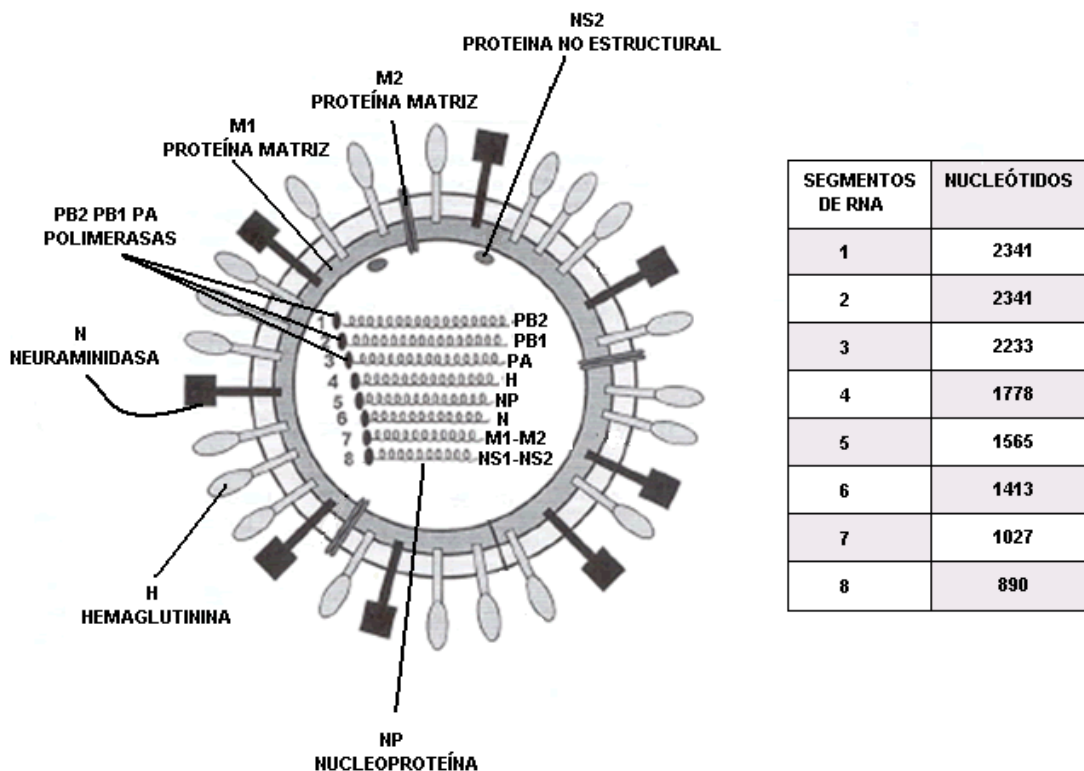
Debido a esta diversidad, existe un sistema de nomenclatura establecido para cada subtipo aislado mencionando en primer termino: Tipo/Especie-Origen/Localización geográfica/Identificación de laboratorio/Año de aislamiento/(H y N) (1,5).

Por otra parte, es un virus RNA de cadena sencilla lineal, polaridad negativa, genoma segmentado en ocho moléculas lineales unicasenarias cuyo tamaño varía de 890 a 2340 nucleótidos. La nucleocápside es helicoidal, con 6-9 nm de diámetro y cerca de 60 nm de longitud, está incluida una envoltura que tiene

proteínas específicas del virus como la nucleoproteína (NP) y una proteína estructural denominada como proteína matriz (M) (6, 11).

Los ocho segmentos del genoma vírico codifican diez proteínas víricas, los tres segmentos horizontales del RNA codifican para la síntesis de las polimerasas PB1, PB2, y PA, indispensables en los procesos de replicación viral (13, 14).

Los segmentos en forma de abanico generan diversa proteínas virales, algunas de ellas estructurales como la M1 y M2 que otorgan rigidez al virion. El segmento 4 genera la hemaglutinina y el segmento 6 la neuraminidasa (FIGURA 1) (5, 13, 14).



FUENTE: <http://www.gefor.41.com/virus/influenza.html>

FIGURA 1. ESTRUCTURA DEL VIRUS DE INFLUENZA.

Existen tres tipos antigénicamente diferentes de los virus de la influenza A, B, C, los cuales están determinados por la naturaleza antigénica de la (NP) y (M). Los tipos B y C solo son encontrados en seres humanos, y los cerdos se infectan únicamente con el tipo A.

Una característica especial de los *influenzavirus* es su capacidad de mutación utilizando cualquiera de los siguientes mecanismos (1):

- *Mutaciones puntuales.* Cuando se producen cambios antigénicos menores en la H y la N que resultan en el cambio de uno o más aminoácidos, este fenómeno se conoce como deriva antigénica (*antigenic-drift*).
- *Reasociación genética.* Es un intercambio de información genética cuando 2 virus diferentes infectan una misma célula. El intercambio de genes tiene como resultado el fenómeno que se conoce como cambio antigénico (*antigenic-shift*) (1,15).

Estos mecanismos le permiten transformarse a partir de un virus de baja patogenicidad o apatógeno, en un virus de alta patogenicidad, lo cual complica la producción de vacunas, ya que al ocurrir un cambio estructural en el virus las vacunas preparadas contra un subtipo específico son ineficaces para proteger contra los virus de nueva creación (13, 16).

1.4 EPIDEMIOLOGÍA

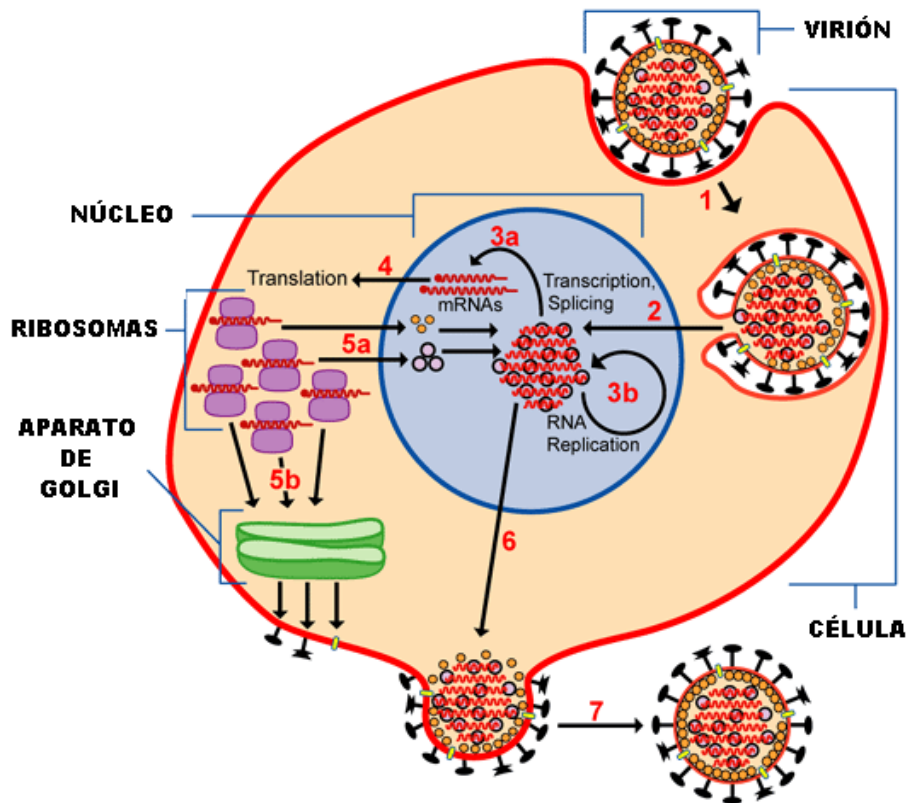
La influenza porcina frecuentemente se manifiesta en varias explotaciones de la misma zona en forma de brotes explosivos con una morbilidad del 100% y una mortalidad que varía del 1 al 4%, es importante considerar que cuando esta presente el Complejo Respiratorio Porcino la mortalidad puede llegar hasta el 15%. (17,18). Los brotes se inician al final del otoño cuando la temperatura

ambiental comienza a descender y empeoran durante el invierno, el VIP circula en los cerdos a lo largo de todo el año, algunos animales se convierten en portadores asintomáticos, manifestando los signos cuando desciende la temperatura, el virus se elimina por secreciones nasales y la transmisión de un animal a otro tiene lugar a través de aerosoles (11).

1.5 REPLICACIÓN VIRAL

El virus de influenza ingresa por vía respiratoria, se adhiere a los receptores del epitelio traqueobronquial en donde provoca una necrosis con descamación celular e infiltración linfocitaria observándose macroscópicamente como zonas de consolidación en todo el parénquima pulmonar. El virus se difunde de 5 a 7 días, periodo en donde ya no es posible detectar material viral en el tejido pulmonar (19, 20).

Una vez que el virus se adhiere a la célula, el virion penetra al citoplasma mediante endocitosis, dentro de la nucleocápside se separa de la envoltura y emigra al núcleo, donde ocurre la replicación del ácido nucleico vírico. La decapsidación ocasiona la activación de RNA polimerasa vírica. Las moléculas de mRNA se originan en el núcleo por transcripción del RNA vírico utilizando oligonucleótidos que derivan de los extremos 5' de mRNAs celulares con encabezamiento recién sintetizados como cebadores. Por tanto, los mRNAs víricos presentan encabezamiento en los extremos 5' luego se añaden a los mRNAs víricos los extremos de polimerasa PA y estas moléculas se desplazan al citoplasma. (FIGURA 2) (6).



FUENTE: Encyclopædia Wikipedia. Created by Jimmy Wales and Larry Sanger. dirección: <http://en.wikipedia.org/wiki/Influenza>.

FIGURA. 2 Replicación del Virus de Influenza.

- | | | | |
|---|----------------|---|---------------------|
| ⊥ | HEMAGLUTININA | ○ | PROTEÍNA M1 |
| ⊥ | NEURAMINIDASA | ⊥ | PROTEÍNA M2 |
| ○ | NUCLEOPROTEÍNA | ⊥ | RIBONUCLEOPROTEINAS |

1.6 TRANSMISIÓN INTERESPECIES

La influenza A es la responsable de epidemias que afectan no sólo al hombre sino a cerdos, caballos, focas y una gran variedad de aves. Se han identificado los 15 diferentes subtipos del virus de influenza en aves domésticas y silvestres, fundamentalmente aves acuáticas como pato, gansos, golondrinas marinas,

gaviotas y aves domésticas como pavos, pollos, codornices, faisanes, gansos y patos (21).

Estudios recientes señalan que los virus humanos pueden tener su origen en aves acuáticas (22). Los virus aviares se replican difícilmente en el hombre y viceversa, pero ambos se desarrollan bien en el cerdo. En Asia es muy frecuente la convivencia de cerdos, patos y hombre. El traspaso de virus entre las especies facilita los cambios antigénicos propios de este virus. La infección de cerdos con cepas provenientes de aves y humanos convierte al cerdo en un escenario propicio para la producción de cambios y generación de virus con diferentes características antigénicas (23, 24).

De tal manera que el cerdo juega un papel muy importante para el virus, debido a que las hemaglutininas de los virus de la influenza aviar reconocen receptores celulares de aves y mamíferos ligeramente diferentes y las células epiteliales del tracto respiratorio del cerdo contienen ambos receptores; de esta manera los cerdos inician la replicación del virus de influenza humana y aviar, por ello los porcinos han sido implicados como huéspedes intermediarios (mixing vessels) del virus de influenza en humanos (20, 25, 26).

Por tal motivo es necesario estar monitoreando los cambios antigénicos de los virus aislados, especialmente los cambios de la hemaglutinina, ya que es importante en la infectividad del virus (27).

Durante los últimos 5-10 años, han existido severos cambios genéticos y antigénicos de los diferentes subtipos del VIP simultáneamente en Europa y Estados Unidos, esta nueva situación epidemiológica ha complicado seriamente el control de la enfermedad (28).

1.7 SIGNOS CLÍNICOS.

La enfermedad varia dependiendo de la dosis infectante, virulencia de la partícula viral y el estado inmune de los animales infectados (edad, estado fisiológico y salud del hato afectado) (25).

La enfermedad se caracteriza por su repentina presentación y rápida recuperación, aparecen los signos clínicos, después de ocurrir un período de incubación de 1 a 3 días. Sin embargo si la enfermedad está relacionada con el Complejo Respiratorio Porcino su pronóstico es reservado (29).

El número de animales afectados puede llegar a ser del 100% manifestándose como un brote explosivo en donde se observa fiebre (42° C), anorexia, depresión, tos, estornudos, secreción nasal, epífora, disnea y polipnea (30).

Esta enfermedad afecta durante la gestación puede ocasionar muerte fetal y neonatal asociada principalmente al subtipo H3N2, la importancia de este subtipo como agente primario involucrado en enfermedades respiratorias presenta como signos clínicos la presencia de abortos en gran número de hembras. Esta signología se asocia a la liberación de mediadores químicos los cuales provocan un efecto sistémico que altera diferentes estadios de gestación y se identifican como una súbita reducción en los índices de fertilidad, incremento en momias y baja general del desempeño reproductivo (31,32).

Los signos reproductivos se manifiestan poco después de haberse iniciado el cuadro respiratorio; siendo tres las etapas, en las que la enfermedad afecta a la fertilidad:

La primera corresponde a la infección de la cerda dentro de los primeros 21 días después del servicio. En el se presenta la muerte y reabsorción de los embriones,

debido a que no logran implantarse y consecuentemente el retorno a celo se manifiesta en forma regular (29).

En la segunda etapa, la infección de la cerda ocurre a partir de la 5ª semana de gestación, con ello se puede presentar la muerte y absorción del total de los embriones implantados, lo que ocasionará que las cerdas permanezcan en un estado de pseudo preñez; de no ser así, el tamaño de la camada se verá también afectado, a causa de la reabsorción de los embriones. Si la infección ocurre al final de la gestación, se pueden observar abortos y ocasionalmente momias al momento del parto (29).

La tercera etapa, corresponde a la infección de los sementales. Estos se ven afectados por la fiebre, provocando una disminución en la calidad del semen y disminuyendo la fertilidad en un periodo de 4 o 5 semanas (29).

De no existir otros agentes patógenos los animales se recuperan en un lapso de 2 a 6 días en casos no complicados, los cerdos enfermos pierden peso o bien disminuye la ganancia diaria de peso.

Los anticuerpos calostrales protegen a los lechones entre 8 a 12 semanas, por tanto, la enfermedad es más común en cerdos a partir de las 12 semanas de edad, se ha observado que el grado de signos y lesiones están relacionados con la cantidad de anticuerpos maternos. Si la piara se encuentra por completo susceptible, la influenza porcina se presenta en los cerdos lactantes y recién destetados (33).

1.8 LESIONES

1.8.1 MACROSCÓPICAS.

Se observa moderada congestión e hiperemia en la faringe, laringe, traquea y bronquios con presencia de moco blanco cristalino, así como una bronquitis catarral que puede producir colapso pulmonar. Las zonas de colapso se localizan en la porción cráneoventral pulmonar. Conforme la enfermedad avanza en el pulmón, se observa consolidación de color rojo, violáceo, (Neumonía intersticial), zonas de atelectasia y pleuritis serofibrinosa. Los ganglios mediastínicos y bronquiales están aumentados de volumen, edematosos y ocasionalmente congestionados; algunas veces los bronquios contienen exudado, con edema interlobular (5, 19, 34).

1.8.2 MICROSCÓPICAS.

Histológicamente se puede observar una degeneración diseminada y necrosis del epitelio de bronquios y bronquiolos. La luz de los bronquios, bronquiolos y alvéolos están llenas de un exudado que contiene células de descamación y neutrófilos, más tarde monocitos; además hay hiperemia variable con dilatación de los capilares e infiltración en los tabiques alveolares con linfocitos, histiocitos y células plasmáticas. Neumonía intersticial y enfisema acompañan a estas lesiones. Hay también infiltración celular peribronquial y perivascular, en los ductos alveolares y alvéolos existen lesiones proliferativas caracterizadas por proliferación de neumocitos tipo II, responsables de la epitelización alveolar y formación de la membrana hialina en la luz de los conductos alveolares terminales (5, 34).

1.9 DIAGNÓSTICO

1.9.1 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Diferentes pruebas serológicas se utilizan para detectar anticuerpos del VIP, sin embargo en México la prueba de IH es la más utilizada para determinar el nivel de anticuerpos contra el VIP, y es considerada la prueba estándar por la OIE (35). Consiste en mezclar glóbulos rojos con VIP de los diferentes subtipos (H1N1, H3N2) para que se produzca la hemoaglutinación. Cuando se adiciona el suero de cerdo con anticuerpos, se inhibe la hemoaglutinación por tal motivo un resultado positivo es la sedimentación de los eritrocitos, es muy sensible para el antígeno H, detecta anticuerpos IgG e IgM (33).

La prueba detecta anticuerpos específicos contra cada subtipo H1N1 ó H3N2 a partir de los 7 días post infección: títulos iguales o superiores a 1:80 son positivos. El diagnóstico requiere el uso de sueros pareados, obtenidos durante la fase aguda de la enfermedad y el segundo a las 3 ó 4 semanas después, para demostrar un incremento en la cantidad de anticuerpos (25, 29).

IH es una prueba simple y relativamente sensible sin embargo implica tiempo y cierta laboriosidad así mismo requiere varias diluciones, preparación de reactivos y replicación de los virus de referencia, además no puede ser usada para detectar ambos subtipos simultáneamente, a menos que se utilicen de manera independiente los antígenos para realizar la prueba. Sus mayores inconvenientes son la sensibilidad a los inhibidores no específicos presente en los sueros y las reacciones cruzadas entre las cepas del mismo subtipo (35, 36).

1.9.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

RT-PCR es una herramienta diagnóstica que recientemente se aplica para la identificación del virus de influenza en muestras de suero e hisopo nasal colectadas de humanos o cerdos (37, 38, 39). Este método es mas rápido y debido a su elevada sensibilidad y especificidad es la técnica base para la caracterización genética del VIP (40, 41). La técnica consiste en convertir de ARN viral a ADN, utilizando una enzima conocida como transcriptasa reversa, con ello se crea un ADNc (ácido desoxiribonucleico complementario), posteriormente se inicia el reconocimiento y la amplificación repetitiva de una fracción de ácido desoxiribonucleico (ADN) utilizando sondas de nucleótidos llamados oligonucleotidos o iniciadores. (39, 42, 43).

RT-PCR múltiple. Es una PCR desarrollada para detectar mas de una secuencia blanco con una sola reacción de PCR, utilizando cada par de iniciadores específicos para una secuencia blanco, se utiliza para la detección simultánea de múltiples agentes patógenos así como para diferenciar subtipos como es el caso del virus de influenza porcina (37).

2.0 JUSTIFICACIÓN

Actualmente en México el diagnóstico de la influenza porcina se realiza por medio de pruebas serológicas, principalmente Inhibición de la Hemoaglutinación; sin embargo, debido a la amplia diversidad de subtipos que afectan al cerdo, es necesario implementar el uso de técnicas moleculares como la Transcriptasa Reversa Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) como una prueba molecular complementaria para el diagnóstico del virus de influenza.

3.0 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Detectar el virus de influenza porcina e identificar los subtipos H1N1 y H3N2 en sueros porcinos e hisopos nasales de cerdos con serología positiva, mediante la técnica de RT-PCR.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar serológicamente mediante la técnica de IH la presencia de anticuerpos hacia los subtipos H1N1 y H3N2 presentes en sueros porcinos.
- Identificar la presencia del virus de Influenza Porcina subtipos H1N1 y H3N2 en sueros porcinos e hisopos nasales, mediante la técnica de RT-PCR.

4.0 HIPÓTESIS

La prueba de RT-PCR identificará la presencia del virus de influenza porcina diferenciando los subtipos H1N1 y H3N2 en sueros e hisopos nasales de cerdo.

5.0 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DE LA GRANJA

La granja se encuentra ubicada en el municipio de Tenango, Morelos, cuenta con 150 hembras de pie de cría, el sistema de producción es de ciclo completo, el destete se realiza a los 21 días de edad, de la semana 4 a la 8 los lechones se mantienen en jaulas elevadas, con capacidad para 10 animales por jaula, de la semana 9 a la 15 se mantienen en corrales de cemento con una capacidad de 10 animales, posteriormente se mantienen en el área de engorda en corrales de cemento con capacidad para 20 cerdos por corral.

La bioseguridad es mínima, la limpieza, desinfección y secado de jaulas y edificios es parcial, no se cuenta con tapetes sanitarios, el vado y arco sanitario no funcionan a la entrada de la granja, el personal puede desempeñar diferentes funciones dentro de la granja, es decir, no están destinados a una sola área, la cuarentena se encuentra dentro de la granja así como el laboratorio de inseminación artificial.

Se cuenta con un programa de inmunización para la prevención de Parvovirus, Leptospirosis y Erisipelosis porcina, sin embargo, no cuenta con antecedentes de vacunación contra el VIP.

Diferentes dosis de antibióticos se utilizaron en las etapas de producción, como medidas profilácticas, contra los problemas respiratorios.

5.2 METODOLOGÍA DE MUESTREO

La metodología de la toma de muestras fue la siguiente:

5.2.1 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE PRODUCCIÓN

Consistió en la identificación de 30 hembras del pie de cría distribuidas en las diferentes áreas de la granja (Servicios, Gestación y Maternidad). Posteriormente se realizó un estudio longitudinal con animales de la línea de producción seleccionando a 20 cerdos a partir de las 4 semanas de edad, hasta la semana 24 de edad, con un intervalo entre muestreo de 4 semanas. Se obtuvieron muestras de sangre, para realizar la técnica de IH y determinar la presencia de anticuerpos en suero.

5.2.2 DETECCIÓN DE RNA VIRAL EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE PRODUCCIÓN

Para detectar el ácido nucleico viral del pie de cría y la línea de producción se obtuvieron muestras de sangre e hisopo nasal para el diagnóstico molecular por la RT-PCR múltiple.

5.3 OBTENCION Y CONSERVACION DE LAS MUESTRAS.

Las muestras de sangre de los cerdos se obtuvieron de la vena cava anterior por venopunción utilizando jeringas de 20 ml con agujas numero 20, una vez obtenida la muestra se identificó con el número correspondiente de cada animal.

Las muestras sanguíneas se colocaron de forma horizontal a temperatura ambiente para la formación del coagulo, posteriormente se almacenaron en una caja de poliuretano con refrigerantes para mantener una temperatura de transporte de 4° C.

El presente estudio se realizó en el laboratorio de diagnóstico del Departamento de Producción Animal: Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM).

5.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En una campana de flujo laminar se obtuvo el suero colocándolo en tubos de ensayo identificados. Posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min. Se separó el sobrenadante en 2 alícuotas depositándose en tubos eppendorf estériles y libres de RNAsas identificados para cada una de las pruebas (IH, RT PCR múltiple). Los sueros para IH fueron inactivados a 56°C por 30 min. Las muestras se conservaron a una temperatura de -20° C.

5.5 REPLICACIÓN VIRAL.

Para la replicación del virus de influenza porcina se utilizaron los virus de referencia A/swine/New Jersey/11/76 (H1N1) y A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2) inoculando 200 µl en embriones de pollo ALPES 1 (Libre de patógenos específicos) de 9 días de edad en cavidad alantoidea.

Con el siguiente procedimiento:

1. Se ovoscopiaron los embriones y se marcó la cámara de aire así como la posición del embrión. Los embriones muertos fueron eliminados.
2. Se desinfectó con alcohol el área donde se encuentra la cámara de aire.
3. Se perforó al lado opuesto del embrión.

4. Posteriormente se inocularon 200 µl del virus referencia a un título hemoaglutinante de 1:32 a través del orificio por medio de una jeringa de insulina.
5. Se selló el orificio con pegamento líquido.
6. Se incubaron a 37°C.
7. A las 24 horas se revisaron los embriones. Los muertos fueron eliminados.
8. De los embriones que murieron a partir de las 48 horas se colectó el líquido corioalantoideo en tubos de ensaye de vidrio estériles y se congeló la muestra hasta que se titularon los virus obtenidos, tanto los inoculados como los controles por medio de aglutinación.
9. Para la colección del líquido corioalantoideo se desinfectó la cámara de aire con alcohol.
10. Se cortó el cascarón siguiendo la línea que indica la ubicación de la cámara de aire.
11. Se extrajo el líquido corioalantoideo de cada embrión para depositarlo de manera individual en tubos de ensaye estériles.
12. Se realizó una prueba de aglutinación de manera individual para comprobar la presencia del virus.
13. El líquido alantoideo que aglutinó, se tituló con eritrocitos de ave, para confrontar con sueros de referencia positivos y negativos.

5.6 INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN.

Los sueros inactivados fueron adsorbidos en microplacas de plástico de 96 pozos de fondo en "U", las cuales fueron limpiadas previamente con Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

En cada pozo se depositaron las siguientes cantidades:

-50 µl de suero

-100 µl de caolín

-100 µl de eritrocitos de ave al 10%

Las muestras se dejaron en refrigeración a 4°C para que se trabajaran al día siguiente.

Posteriormente se utilizaron placas de 96 pozos de fondo en "U",

1. Se llenó la plantilla de sueros para saber su colocación.
2. Después se depositó 50 µl de PBS en todos los pozos.
3. Se agregó 50 µl de suero problema (sobrenadante de la adsorción) en la línea "A". Se pipeteó 7 veces para homogenizar y se pasaron 50 µl de la columna "A" a "B" y así sucesivamente hasta la hilera "H". Al final se eliminaron 50 µl. El suero inició con una dilución 1:10 hasta 1:1280
4. Se colocaron los sueros control positivo y negativo, y se manejaron como el punto 2 y 3.
5. Se agregaron 50 µl antígeno con 8 UHA (unidades hemoaglutinantes) en cada pozo a partir de la línea "B" a la "H". y se agregó una hilera para el control de virus.
6. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente.

7. Finalmente se agregó 50 µl de eritrocitos de ave al 0.5% en todos los pozos, y se agregó una hilera para el control de eritrocitos.
8. Se incubó a temperatura ambiente por 30 a 60 minutos o hasta que el control de eritrocitos sedimentó, para interpretar el resultado final.

CONTROLES.

Control Positivo: Suero positivo, PBS, antígeno y eritrocitos.

Hay una unión antígeno anticuerpo por lo que se observa sedimentación de los eritrocitos.

Control Negativo: Suero negativo, PBS, antígeno y eritrocitos.

No hay anticuerpos por lo que el antígeno se une a los eritrocitos observándose hemoaglutinación.

Virus: PBS, antígeno y eritrocitos.

El antígeno se une a los eritrocitos observándose hemoaglutinación.

Eritrocitos: eritrocitos al 0.5% de ave y PBS.

Existe sedimentación de eritrocitos.

INTERPRETACIÓN

Las diluciones inician con un título 1:10 hasta 1:1280 se consideró positivo a partir de un título de 1:80. La lectura se realizó tomando la dilución inversa a donde se observa aglutinación de cada uno de los sueros.

5.7 EXTRACCIÓN DE RNA VIRAL

La extracción de ARN a partir de las muestras (suero e hisopos), se realizó con el método descrito por Gibco Life Technologies 1996. Brevemente, se tomaron 500 µl de suero porcino, mientras que para la muestra de hisopo nasal se depositó de manera directa en un tubo eppendorf estéril, para ambas muestras se agregó 500

µl de Trizol® Reagent, y se homogenizó la muestra dejando incubar 10 min. A 4°C, posteriormente se adicionó 200 µl de cloroformo a 4°C, agitando por 15 seg. en vortex y se incubó por 5 min. a 4°C, después se centrifugó a 12,000 rpm/15 min. a 4°C, inmediatamente se separó la fase acuosa de RNA en tubos eppendorf donde se adicionó 700 µl de isopropanol frío para posteriormente homogenizar, se incubó por 15 min. a 4°C y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. a 4°C. se decantó el isopropanol y se lavó la pastilla (RNA) con 200 µl de etanol al 70%, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. a 4°C, se decantó el etanol hasta dejar secar la pastilla (RNA), una vez seca se resuspendió en 50 µl de agua DEPC al 0.1% homogenizando la muestra.

5.8 INICIADORES PARA LA RT-PCR MÚLTIPLE.

Se utilizó los iniciadores descritos por Choi et al 2002 (43), fueron diseñados dos oligonucleótidos (*Forward*, *Reverse*) para cada uno de los genes H1, H3, N1, N2, por lo que nos permite identificar un tercer subtipo viral H1N2 (Cuadro 1).

Cuadro 1

INICIADORES DE LA RT-PCR.

| INICIADOR | NOMBRE DEL VIRUS | No. Acceso GenBank | SECUENCIA (5'-3') | POSICIÓN | Amplificado |
|------------|------------------------------------|--------------------|-------------------------------|------------------|-------------|
| H1F | A/swine/NewJersey/11/76 (H1N1) | K00992 | GGG ACA TGT TAC CCA GGA GAT | 345-365 | 1006 pb |
| H1R | | | GCA TTG TAT GTC CAA ATA TCC A | 1351-1330 | |
| H3F | A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2) | AF153234 | TAT GCC TGG TTT TCG CTC AA | 61-80 | 663 pb |
| H3R | | | TTC GGG ATT ACA GTT TGT TG | 724-705 | |
| N1F | A/swine/NewJersey/11/76 (H1N1) | AF250363 | GGT TCC AAA GGA GAC ATT TTT G | 324-346 | 754 pb |
| N1R | | | CTA TCC AAA CAC CAT TGC CAT A | 1078-1057 | |
| N2F | A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2) | AF153238 | TGC GAT CCT GAC AAG TGT TAT C | 364-385 | 502 pb |
| N2R | | | CAG ACA CAT CTG ACA CCA GGA T | 866-845 | |

5.9 TRANSCRIPTASA REVERSA (RT).

La RT-PCR se realizó en el termociclador My Cycler (Bio-Rad, USA), se utilizó el RNA para obtener el DNA complementario (cDNA) utilizando la siguiente metodología: en 5 μ l de agua DEPC, se adicionó 5 μ l de RNA, 1 μ l de dNTPs (nucleótidos), 1 μ l de cada uno de los siguientes oligonucleótidos, H1R, N1R, H3R, N2R, se introdujo al termociclador a 65°C. 5 min. Permaneciendo a 4°C. 8 min. se adicionó 4 μ l de Buffer (5x), 1 μ l de DTT, 1 μ l de RNAsa Out (a) y se dejó incubar a 42°C. 2 min. Permaneciendo a 4°C/5 min. se adicionó 1 μ l de Transcriptasa Inversa (RT) y se incubó durante 42°C/50 min. para finalmente dejarlo a 70°C. 15 min. (Figura 3)

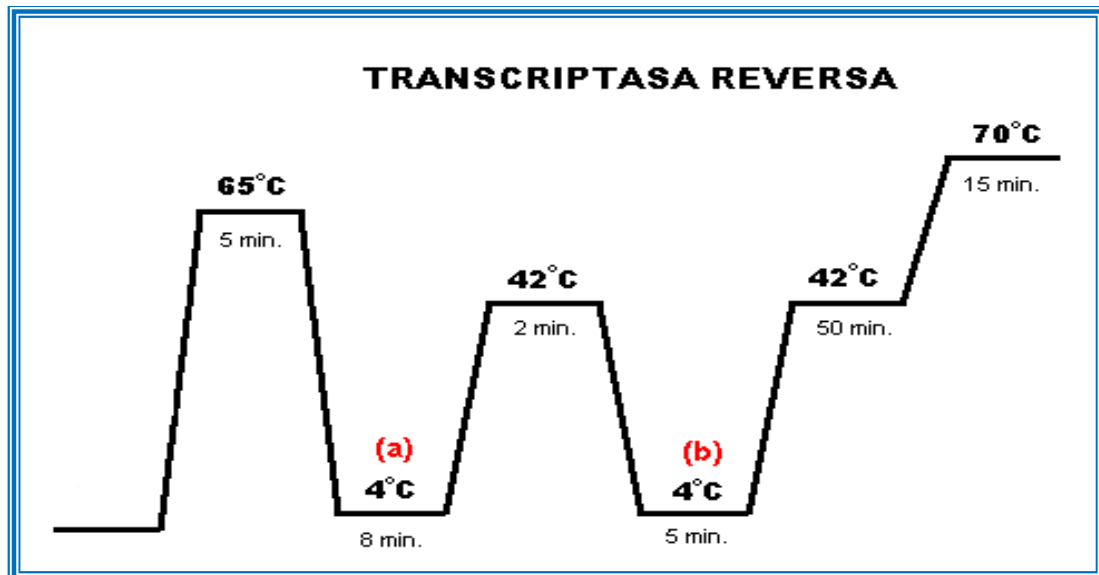


Figura 3. Protocolo de tiempos y temperaturas de la RT.

5.10 RT-PCR SIMPLE

Inicialmente se desarrolló el protocolo descrito por Choi *et al.*, 2002 (43) sin embargo no se logró la amplificación de los genes correspondientes, por lo que se realizó un protocolo diferente para establecer tiempos y temperaturas adecuadas para la amplificación del virus.

La RT-PCR simple se realizó en el termociclador MyCycler (Bio-Rad, USA), cada reacción se ajustó a un volumen final de 25 μ l. en cada prueba se agregó 7 μ l de DNA, 2.5 μ l de Buffer II, 1 μ l del iniciador según el gen para amplificar, 1 μ l de *Taq* Polimerasa, 1 μ l Magnesio, y el resto del volumen se ajustó con Agua DEPC.

5.11 RT-PCR MÚLTIPLE

La RT-PCR múltiple se ajustó a un volumen final de 26 μ l, en cada reacción se agregó 5 μ l de DNA, 2.5 μ l de Buffer II, 1 μ l de cada uno de los iniciadores, 1 μ l de *Taq* Polimerasa, 1 μ l Magnesio, y el resto del volumen se ajustó con Agua DEPC.

Las condiciones utilizadas en la PCR se presentan en la Figura 4.

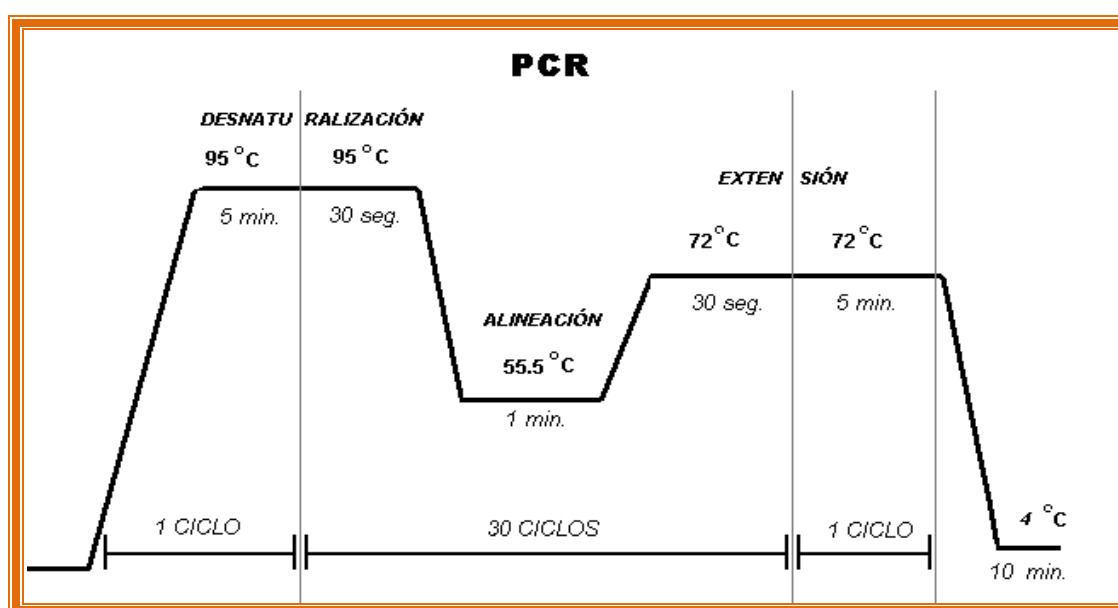


Figura 4. Protocolo de tiempos y temperaturas de la RT PCR múltiple.

5.12 PREPARACIÓN DE GELES DE AGAROSA

La evaluación de los productos de la RT-PCR se realizó por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% y para la visualización del producto se tiñó con bromuro de etidio (Br-e) además se utilizó como marcador de peso molecular (MPM) 1 Kb Plus DNA Ladder®.

Para realizar el gel de agarosa al 2%, se agregaron 2 gramos de agarosa para 100 ml de TAE 1X, calentándose en baño María hasta que la agarosa se disolvió totalmente. Posteriormente se agregaron 35 ml de agar licuado en la cámara de electroforesis, con un buffer de corrida en una solución de TAE 1x y se programó a 70V por 100 min.

La prueba de RT-PCR simple amplificó cada uno de los segmentos de las hemaglutininas H1 y H3 así como de las neuraminidasas N1 y N2. Obtenidos estos resultado se realizó la RT-PCR múltiple en donde se obtuvo la amplificación de los subtipos H1N1 y H3N2 con las condiciones de amplificación anteriormente descritas. (Figura 5).

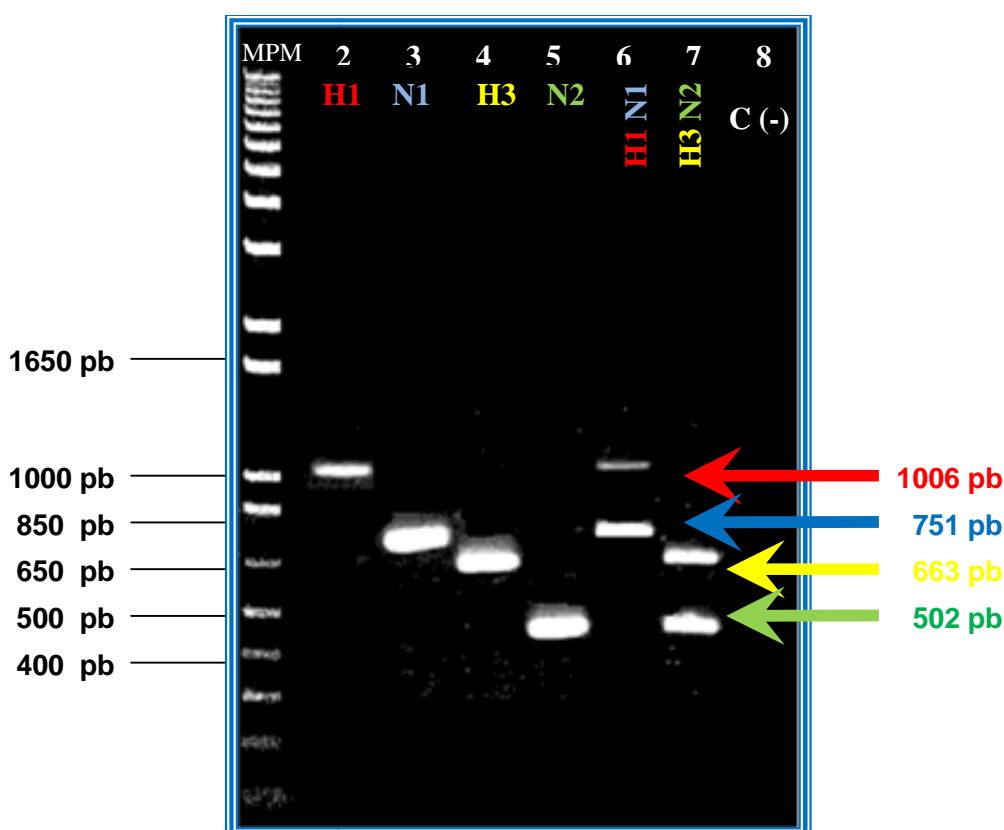


Figura 5 Detección e identificación de subtipos del virus de influenza tipo A. Gel de Agarosa al 2% teñido con Br-E. Carril 1 MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb Plus DNA Ladder®, Carril 2, 3, 4 y 5 RT-PCR simple amplificando los segmentos H1, N1, H3 y N2. Carril 6 y 7 RT-PCR múltiple H1N1 (A/Swine/New Jersey/11/76) y H3N2 (A/Swine/Minnesota/9088-2/98). Carril 8 control negativo.

5.13 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.

Para el pie de cría se utilizó un modelo factorial que incluyó tres tratamientos, que corresponden a las hembras alojadas en cada una de las áreas.

T1=Servicios, T2=Gestación, T3=Maternidad.

Así mismo, para los resultados obtenidos en la línea de producción, se identificó cada una de las semanas de edad.

T4=4 semanas de edad, T5=8 semanas de edad, T6=12 semanas de edad, T7=16 semanas de edad, T8=20 semanas de edad, T9=24 semanas de edad.

Para el análisis de datos se realizó una transformación logarítmica de los resultados de la IH y así efectuar el análisis de varianza (ANOVA) para determinar la presencia de diferencia entre tratamientos a un nivel de significancia de $P < 0.05$. Así mismo se realizó la prueba por grupos pareados de Wilcoxon.

La diferencia de medias se determinó mediante la prueba de Tukey.

Se realizó la prueba de Ji-cuadrada para evaluar las diferencias en los porcentajes de animales positivos y negativos por tratamiento. El análisis de datos se realizó mediante el paquete estadístico JMP versión 2000 (44).

Para la representación de resultados se utilizó el gráfico Box-Plot en donde se ejemplifica los valores obtenidos; mínimo, máximo y media por cada una de las variables. La gráfica se diseñó con en el programa *STATGRAPHICS® Centurion XV* (45).

6.0 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS SEROLÓGICOS MEDIANTE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN

6.1.1 PIE DE CRÍA.

Del total de las muestras, se obtuvo el 96.55% global de seropositividad para ambos subtipos.

Se encontró el 100% de seroprevalencia en las hembras del área de servicios para el subtipo H1N1 y el 90% al subtipo H3N2, todas las hembras de gestación fueron positivas a ambos subtipos; en maternidad 9 de 10 hembras fueron positivas al subtipo H1N1, mientras que para el subtipo H3N2 todas presentaron resultados de seropositividad. No se observó diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre las diferentes etapas reproductivas (Cuadro 2).

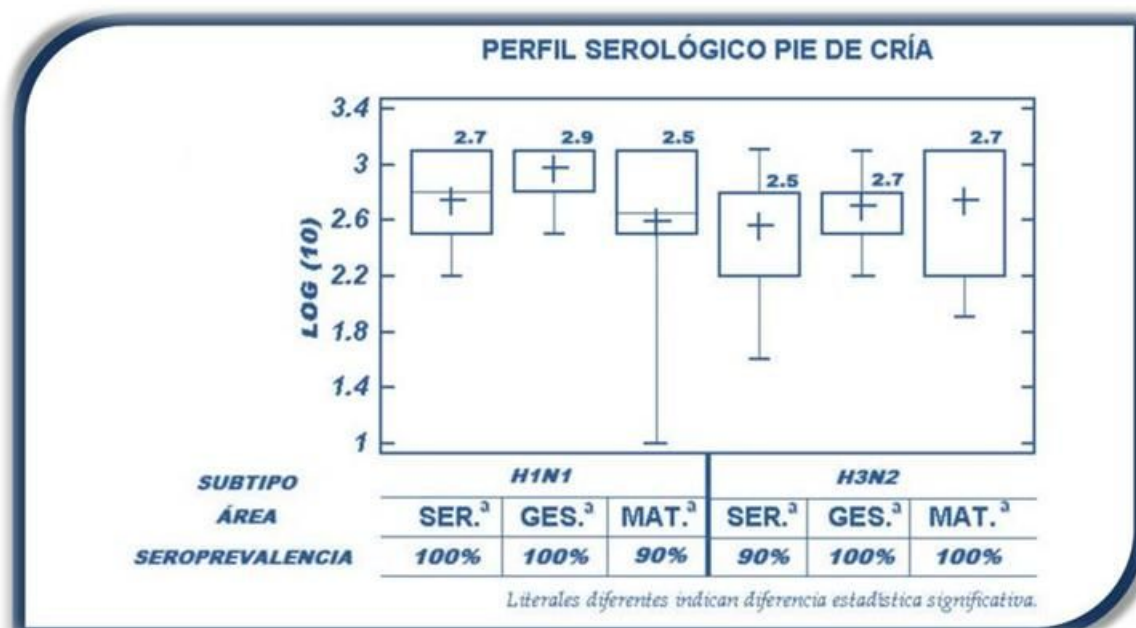
Cuadro 2

RESULTADOS SEROLÓGICOS DE IH SUBTIPOS H1N1 Y H3N2 EN PIE DE DE CRÍA.

| PRUEBA IH | | |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| ÁREA | SUBTIPO H1N1 (+) | SUBTIPO H3N2 (+) |
| <i>Servicios</i> | 10/10 ^a | 9/10 ^a |
| <i>Gestación</i> | 9/9 ^a | 9/9 ^a |
| <i>Maternidad</i> | 9/10 ^a | 10/10 ^a |
| TOTAL | 28/29 | 28/29 |
| % Positivos | 96,55% | 96,55% |

Literales diferentes en cada columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Se observó que las hembras de gestación presentan una media aritmética más elevada (2.9) para el subtipo H1N1, que para el subtipo H3N2 (2.7). Las hembras de maternidad presentaron una media de 2.5 para el subtipo H1N1 mientras que para el subtipo H3N2 la media se incremento a 2.7 (Gráfica 1).



GRAFICA 1 (Box-Plot). Resultados serológicos del pie de cría obtenidos mediante IH.

6.1.2 LÍNEA DE PRODUCCIÓN

El porcentaje global de seropositividad de la línea de producción para el subtipo H1N1 fue el 94.59%, mientras que para el subtipo H3N2 presentó un porcentaje menor en comparación con el anterior 81.98%. Existió diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) para el subtipo H1N1 entre la semana 4 y la semana 8 de edad, así como también entre la semana 8 de edad con las 4, 16 y 24 semanas de edad; el subtipo H3N2 presentó diferencia significativa ($P < 0.05$) de la semana 8 comparado con la semana 4, 16, 20 y 24, sin embargo

no presentó diferencia estadística entre las 8 semanas de edad con las 12 semanas en comparación con los resultados del subtipo H1N1 (Cuadro 3).

Cuadro 3

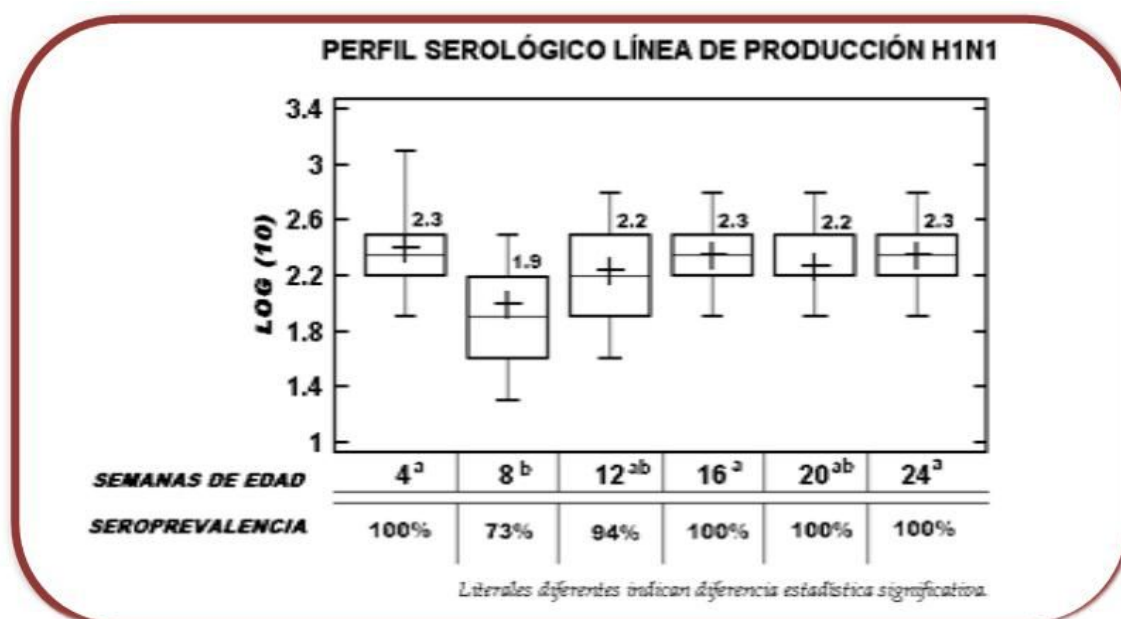
RESULTADOS SEROLÓGICOS DE IH SUBTIPOS H1N1 Y H3N2 EN ANIMALES DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN.

| PRUEBA IH | | |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| SEMANAS DE EDAD | SUBTIPO H1N1 (+) | SUBTIPO H3N2 (+) |
| 4 | 20/20 ^a | 15/20 ^b |
| 8 | 14/19 ^b | 7/19 ^c |
| 12 | 17/18 ^{ab} | 15/18 ^{bc} |
| 16 | 18/18 ^a | 18/18 ^a |
| 20 | 18/18 ^{ab} | 18/18 ^a |
| 24 | 18/18 ^a | 18/18 ^{ab} |
| TOTAL | 105/111 | 91/111 |
| % Positivos | 94,59% | 81,98% |

Literales diferentes en cada columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Posteriormente al realizar la prueba de grupos pareados Wilcoxon hacia ambos subtipos existe diferencia significativa entre las 8 semanas de edad con las semanas 4, 12, 16, 20 y 24.

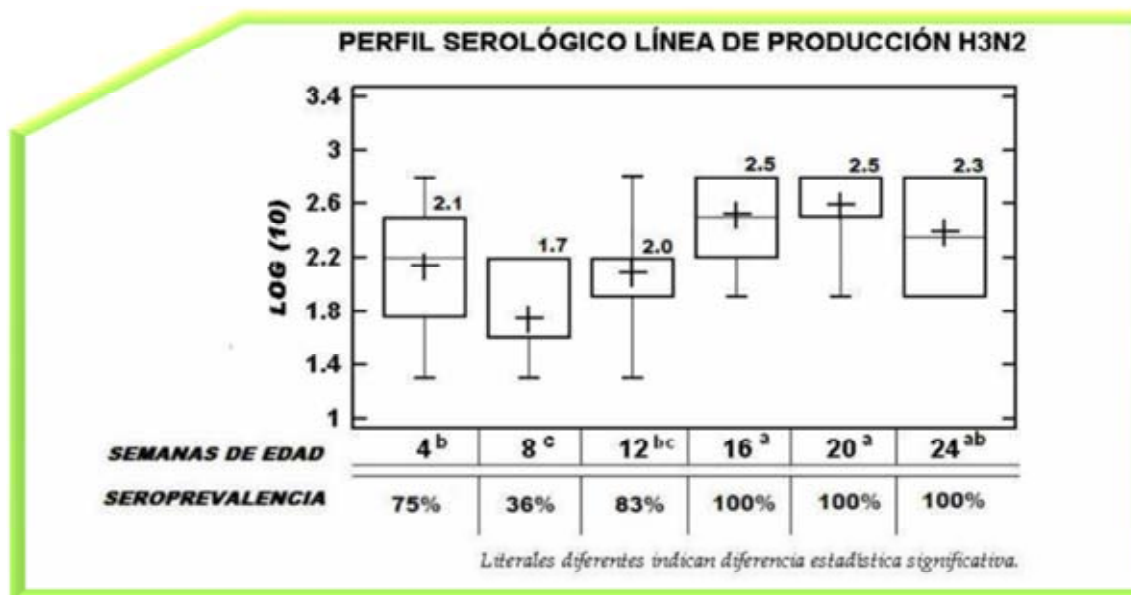
En los resultados obtenidos de la línea de producción se observa que la media aritmética en la semana 8 de edad (1.9) es menor en comparación con las medias de las semanas 4 (2.3) y 12 (2.2), la seroprevalencia que se obtuvo de la semana 8 y 12 es menor en comparación con las diferentes semanas de edad (Gráfica 2).



GRAFICA 2 (Box-Plot). Resultados serológicos del subtipo H1N1 en la línea de producción obtenidos mediante IH.

En el subtipo H3N2 se observó que la media aritmética inferior se obtuvo en la semana 8 de edad (1.7), así como también el porcentaje de seroprevalencia más bajo 36%.

Por otra parte las medias obtenidas de las 4 a las 12 semanas de edad fueron mayores para el subtipo H1N1, mientras que para el subtipo H3N2 a partir de la semana 16 y hasta las 24 semanas de edad presentaron una media superior en comparación con los resultados correspondientes al perfil serológico de H1N1 (Gráfica 3).



GRAFICA 3 (Box-Plot) . Resultados serológicos del subtipo H3N2 en la línea de producción obtenidos mediante IH.

El porcentaje de seroprevalencia para el subtipo H1N1 fue de 100% a las 4 semanas, descendiendo en la semana 8 al 73% e incrementándose al 94% para la semana 12, posteriormente se mantuvo al 100% a partir de la semana 16 hasta las 24 semanas de edad, a diferencia de los resultados obtenidos del subtipo H3N2 en donde se presentó el 75% en la semana 4, el 36% y 83% en las semanas 8 y 12 respectivamente.

6.2 RESULTADOS MOLECULARES MEDIANTE RT PCR MÚLTIPLE.

6.2.1 PIE DE CRÍA

Del total de muestras, no se encontraron resultados positivos para el subtipo H1N1 sin embargo se obtuvieron resultados positivos para el subtipo H3N2 en suero con el 10.34% (3 de 29) en donde existió diferencia estadística ($P < 0.05$), en tanto que en las muestras de hisopo fueron positivas el 6.90% (2 de 29). El porcentaje global de positivos hacia el virus de influenza subtipo H3N2 fue de 8.62% (Cuadro 4).

Cuadro 4

RESULTADOS DE RT PCR MÚLTIPLE (PIE DE CRÍA), DE LOS SUBTIPOS H1N1 Y H3N2, EN SUERO E HISOPO NASAL.

| PRUEBA RT-PCR MULTIPLE | | | | |
|-------------------------------|---------------------|------------|---------------------|------------|
| ÁREA | SUBTIPO H1N1 | | SUBTIPO H3N2 | |
| | (+) | | (+) | |
| | (s) | (h) | (s) | (h) |
| Servicios | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 1/10 |
| Gestación | 0/9 | 0/9 | 0/9 | 0/9 |
| Maternidad | 0/10 | 0/10 | 3/10 | 1/10 |
| TOTAL | 0/29 | 0/29 | 3/29 | 2/29 |
| % Positivos | 0% | 0% | 10.34% | 6.90% |
| % Global | 0% | | 8,62% | |

(s) = suero (h) = hisopo

6.2.2 LÍNEA DE PRODUCCIÓN

La prueba de PCR múltiple identificó el 1.8% y 6.3% de positivos para el subtipo H1N1 de las muestras obtenidas a partir de suero e hisopo nasal respectivamente, sin embargo no existió diferencia estadística significativa de los resultados ($P < 0.05$). No se encontraron resultados positivos para el subtipo H3N2 de las muestras de suero, sin embargo del hisopo se identificó el 5.4% de positivos a las 4 y 8 semanas de edad, en donde existió diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) sin embargo al realizar la prueba de grupos pareados Wilcoxon no hay diferencia significativa (Cuadro 5).

Cuadro 5

RESULTADOS DE RT PCR MÚLTIPLE (LÍNEA DE PRODUCCIÓN), DE LOS SUBTIPOS H1N1 Y H3N2, EN SUERO E HISOPO NASAL.

| PRUEBA RT-PCR MULTIPLE | | | | |
|-------------------------------|---------------------|--------------|---------------------|--------------|
| SEMANAS DE EDAD | SUBTIPO H1N1 | | SUBTIPO H3N2 | |
| | (+) | | (+) | |
| | (s) | (h) | (s) | (h) |
| 4 | 2/20 | 0/20 | 0/20 | 3/20 |
| 8 | 0/19 | 2/19 | 0/19 | 3/19 |
| 12 | 0/18 | 0/18 | 0/18 | 0/18 |
| 16 | 0/18 | 3/18 | 0/18 | 0/18 |
| 20 | 0/18 | 2/18 | 0/18 | 0/18 |
| 24 | 0/18 | 0/18 | 0/18 | 0/18 |
| TOTAL | 2/111 | 7/111 | 0/111 | 6/111 |
| % Positivos | 1.80% | 6.31% | 0% | 5.41% |
| % Global | 4,05% | | 2,70% | |

(s) = Suero (h) = Hisopo

Los resultados de las muestras positivas obtenidas por RT-PCR múltiple se muestran en las Figuras 6-10.

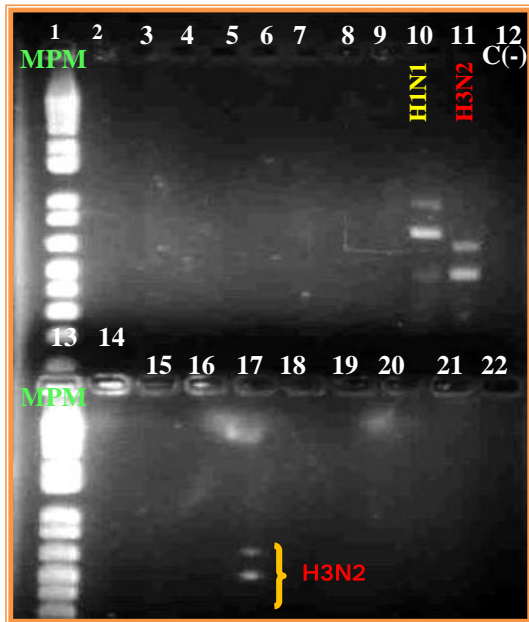


FIGURA 6. Gel de Agarosa al 2% teñido con Br-E. Carril 1,13 MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb Plus DNA Ladder®. Carril 10 control positivo subtipo H1N1. Carril 11 control positivo subtipo H3N2. Carril 12 control negativo. Carril 17 muestra de hisopo positiva al subtipo H3N2 en hembra del área de servicios.

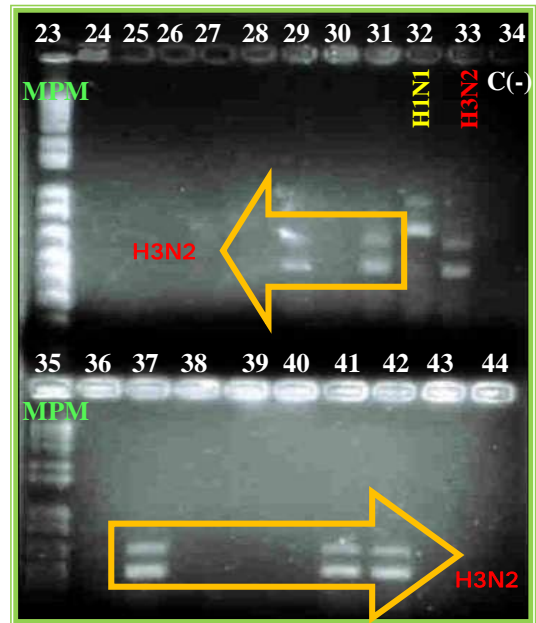


FIGURA 7. Gel de Agarosa al 2% teñido con Br-E. Carril 23,35 MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb Plus DNA Ladder®. Carril 29 muestra de hisopo positiva al subtipo H3N2 en hembra de maternidad. Carril 31 muestra de suero positiva al subtipo H3N2 en hembra de maternidad. Carril 32 control positivo subtipo H1N1. Carril 33 control positivo subtipo H3N2. Carril 34 control negativo. Carril 37 y 41 muestras de sueros positivas al subtipo H3N2 en hembras del área de maternidad. Carril 42 muestra de hisopo positiva al subtipo H3N2 en línea de producción de 4 semanas de edad.

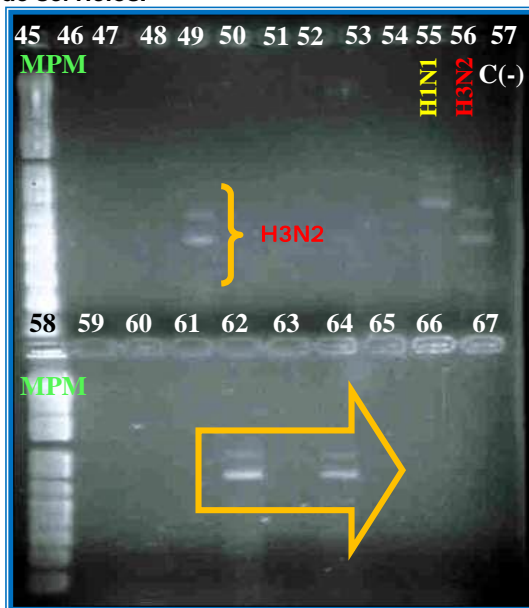


FIGURA 8. Gel de Agarosa al 2% teñido con Br-E. Carril 45,58 MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb Plus DNA Ladder®. Carril 49 muestra de hisopo positiva al subtipo H3N2 en la línea de producción de 4 semanas de edad. Carril 55 control positivo subtipo H1N1. Carril 56 control positivo subtipo H3N2. Carril 57 control negativo. Carril 62 y 64 muestras de suero positivas al subtipo H1N1 en la línea de producción de 4 semanas de edad.

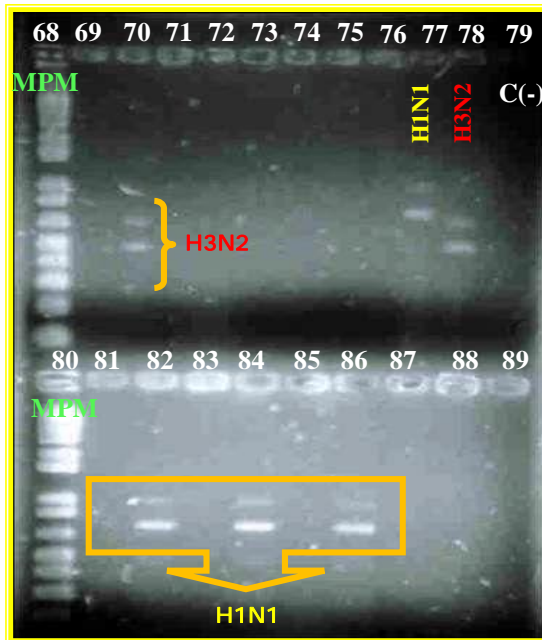


FIGURA 9. Gel de Agarosa al 2% teñido con Br-E. Carril 68,80 MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb Plus DNA Ladder®. Carril 70 muestra de hisopo positiva al subtipo H3N2 en la línea de producción de 4 semanas de edad. Carril 77 control positivo subtipo H1N1. Carril 78 control positivo subtipo H3N2. Carril 79 control negativo. Carril 82, 84 y 86 muestras de hisopos positivas al subtipo H1N1 en la línea de producción de 8 semanas de edad.

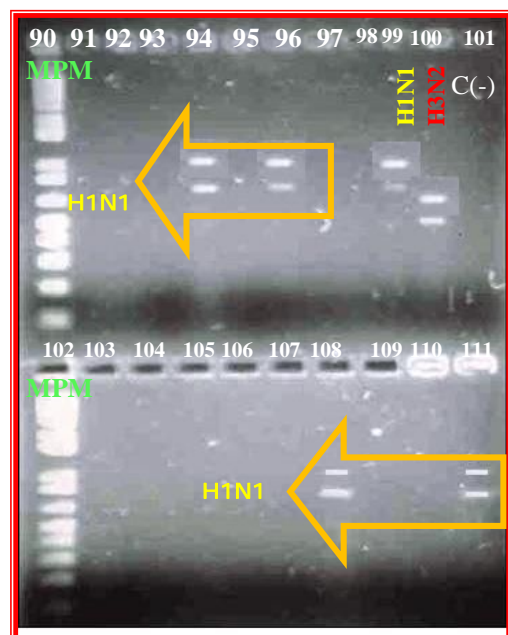


FIGURA 10. Gel de Agarosa al 2% teñido con Br-E. Carril 90,102 MPM= Marcador de Peso Molecular, 1 Kb Plus DNA Ladder®. Carril 94 y 96 muestras de hisopo positivas al subtipo H1N1 en la línea de producción de 16 semanas de edad. Carril 99 control positivo subtipo H1N1. Carril 100 control positivo subtipo H3N2. Carril 101 control negativo. Carril 108 y 111 muestras de hisopos positivas al subtipo H1N1 en la línea de producción de 20 semanas de edad.

DISCUSIÓN

Con la diseminación y el impacto negativo de esta enfermedad es importante evaluar las herramientas diagnósticas disponibles y su aplicación. La prueba de IH proporciona información de valor ante mortem sobre la dinámica de infección del VIP; sin embargo la prueba nos genera poca información sobre la infección clínica en los animales. La serología detecta el nivel de anticuerpos previos a una exposición con el antígeno, sin embargo, la presencia de anticuerpos indica exposición pero no necesariamente enfermedad.

Los resultados en el pie de cría presentaron una alta seroprevalencia, las hembras de maternidad excretan el virus hacia las camadas las cuales en la semana 4 de edad presentaron títulos elevados de anticuerpos para los subtipos H1N1 y H3N2, que principalmente son atribuidos a niveles de inmunidad pasiva, en la semana 8 los títulos de anticuerpos disminuyeron de manera similar lo reporta Carreón *et al.*, 2005, en donde menciona que los niveles de inmunidad pasiva descienden entre las 6 y 7 semanas de edad y vuelven a aparecer a partir de las 12 semanas lo que indica que el virus continua su replicación conforme la edad avanza (20).

Posteriormente en la semana 12 ocurrió una seroconversión con títulos mayores, lo que se interpretó como la respuesta de los animales al entrar en contacto con el VIP de campo, Morilla *et al.*, 2005 menciona que los anticuerpos calostrales protegen a los lechones entre las 8 y 12 semanas, por tanto, la enfermedad se presenta de manera frecuente a partir de las 12 semanas de edad (33).

La detección del anticuerpos en cerdos jóvenes sugiere que pueden permanecer infectados en forma subclínica, lo anterior concuerda con

resultados de trabajos en granjas de cerdos en etapa de finalización, en los que se notifica seroprevalencias elevadas sin historial clínico (10).

La seroprevalencia que presentaron los cerdos de la línea de producción fue del 94.59% y 81.98% para el subtipo H1N1 y H3N2 respectivamente, Álvarez *et al.*, 2001 realizó un estudio transversal en granjas porcinas pertenecientes al estado de Yucatán donde reportó en un total de 1000 sueros, una seroprevalencia de 65.1% para el subtipo H3N2 y 22.9% para el subtipo H1N1. Con respecto al seroperfil en la línea de producción se encontró en destete, crecimiento, desarrollo, y engorda una seroprevalencia de 8.8%, 9.6%, 6.4%, 8.4% para H1N1 y 62.4%, 56%, 67% y 74% para H3N2, este subtipo mostró mayor frecuencia que el subtipo H1N1 en las distintas etapas de producción (48). Es importante citar que el punto de corte utilizado por Álvarez es el mismo que se consideró en este trabajo 1:80 (46).

Choi *et al.*, 2002, identificó en 111,418 sueros porcinos una seroprevalencia del 66.3% y 33.7% para los subtipos H1N1 y H3N2, sin embargo de estos resultados positivos no se sabe si son por una infección natural o por vacunación, en comparación con nuestros resultados, debido a que en la granja donde se obtuvieron las muestras del presente estudio no se programa un calendario de inmunización contra el VIP, por lo que se lograron identificar altos porcentajes de seropositividad (47).

Trujillo *et al.*, 2004 analizó 474 muestras de suero porcino correspondientes a 3 estados de la República Mexicana, en donde obtuvo un 45.99% de sueros positivos a la presencia de anticuerpos contra el subtipo H1N1 y para el subtipo H3N2 el 29.74% (48), esta seroprevalencia es relativamente inferior a la reportada en este estudio, pero a pesar de ello existe una relación en la que

podemos observar al subtipo H1N1 con un mayor porcentaje de seropositividad con respecto al subtipo H3N2.

El diagnóstico en la Medicina Veterinaria ha tomado un nuevo y amplio significado, con la aplicación de la RT-PCR múltiple, una técnica de diagnóstico molecular para la identificación del VIP, en comparación con otros métodos tradicionales la prueba es mas sensible y específica así como de extrema rapidez de resultados, además genera una oportunidad de apoyo en el diagnóstico al ser una herramienta para confirmar la presencia del agente en suero e hisopo nasal e ilustrar el desarrollo de la viremia. La oportuna y rápida identificación de los subtipos que circulan dentro de una granja y/o región es de vital importancia para implementar estrategias de control y prevención de manera individual o poblacional (49).

En México, éste es el primer estudio que se realiza mediante el diagnóstico molecular, e identifica el VIP subtipos H1N1 y H3N2 en suero e hisopos nasales, además puede detectar la presencia de ambos subtipos presentes en una misma muestra, incluso en el RT-PCR múltiple se pueden detectar los genes por separado, lo que a su vez permite identificar al subtipo H1N2, por lo que proporciona una detallada información de la prevalencia de los diferentes subtipos que circulan dentro de una granja.

Los resultados obtenidos mediante RT-PCR múltiple indicaron para el pie de cría el 17.24% (5/58) para el subtipo H3N2, mientras que no se encontraron animales positivos para el subtipo H1N1 (0/58), por otra parte en la línea de producción se obtuvo el 8.10% (9/111) y 5.40% (6/111) para los subtipos H1N1 y H3N2 respectivamente, mientras que Choi *et al.*, identificó en 480 muestras

67.1% para H1N1, 26.9% H3N2, 4.6% H1N2 y 1.4% positivos para ambos subtipos (H1N1 y H3N2).

En los recientes años se ha generado una nueva perspectiva de cómo deben utilizarse y aplicarse las pruebas de laboratorio así como la correcta interpretación de los resultados. Debe considerarse la especificidad y sensibilidad de la prueba así como el valor predictivo de la misma, el cual se relaciona directamente a la utilidad clínica del resultado. El diagnóstico de las enfermedades debe de utilizar pruebas de laboratorio que permitan una detección temprana del virus (49).

De tal manera que al utilizar una combinación de IH y RT-PCR múltiple se brinda un espectro más amplio y una mayor certeza en el proceso de la enfermedad, una vez que se entiende la dinámica del agente en relación a la expresión clínica, podemos entender el proceso de la enfermedad para lograr de esta forma una mayor asertividad de los tiempos y tipos de intervenciones para controlar el proceso infeccioso.

CONCLUSIONES

1. La prueba de IH proporcionó información sobre la dinámica de infección del virus para ambos subtipos, así mismo en los cerdos de la línea de producción se observó una seroconversión en la semana 12 de edad.
2. En el presente estudio mediante la aplicación de la RT-PCR múltiple se logró desarrollar una metodología de diagnóstico para la detección e identificación del virus de influenza mas rápida y fácil en comparación con otros métodos de identificación, que inclusive podría manifestar un tercer subtipo viral el H1N2 este último aún no reportado en nuestro país.
3. La prueba de RT-PCR múltiple permitió detectar la presencia de ambos subtipos (H1N1, H3N2) presentes en una misma muestra.
4. Es el primer reporte en México que detecta la presencia del Virus de Influenza Porcina subtipos H1N1 y H3N2 en muestras procedentes de suero e hisopo nasal mediante RT-PCR múltiple.

LITERATURA CITADA

1. Rivera CE. La influenza en el hombre y en los animales. Memorias del XXV Convención Anual Asociación Nacional Especialistas Ciencias Avícolas. Cancún, Quintana Roo, México. ANECA, 2000:278-282. Mayo 3-6, 2000.
2. Acuña LG. Influenza: Historia y amenazas. Rev Chilena Infectol 2004;21:162-164.
3. Reid HA, Fanning GT, Hultin VJ, Taubenberger KJ. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. Proc. Natl. Acad. Sci 1999;96:1651-1656.
4. Shope RE. Influenza del cerdo. En Dunne H. Enfermedades del Cerdo. 1ª Edición. Ed. Unión Tipográfica Editorial Hispano – Americana., 1967 Pág. 119-137.
5. Easterday BC and Van Reeth K. Swine Influenza. In Straw B, D'Alliaire, Mengeling S, Taylor D. Diseases of swine. 8th Edit. Ames, Iowa U.S.A., 2002 Pág. 277-290.
6. Madigan MT, Martinko JM, Packer J. Brock. Biología de los Microorganismos. 10th. Edit. Pearson Educación S.A., Madrid 2006. Pag 526-528, 881-884.
7. Karasin AI, Landgraf J, Swenson S, Erickson G, Goyal S, Woodruff M, et al., Genetic Characterization of H1N2 Influenza A Viruses Isolated from Pigs throughout the United States. J Clin Microbiol 2002;40:1073-1079.
8. National Center for Biotechnology Information. Available in <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Consultado el 28 de Septiembre de 2006.

9. Horimoto T, Kawaoka Y. Direct Reverse Transcriptase PCR To Determine Virulence Potential of Influenza A Viruses in Birds. *J Clin Microbiol* 1995;33:748-751.
10. Alvarez FM, Rodriguez BJ, Ciprian CA, Rodriguez GL, Ayora TG, Segura CJ, Perfil serológico del virus de influenza porcina, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en granjas de Yucatán, México. *Rev. Vet. Mex.* 2004; 35 (4) 295-305.
11. Fenner F. Bachmann PA. Murphy FA. *Virología Veterinaria*. Edit. Acribia S.A. Zaragoza España, 1992: 489-501.
12. Rapp Gabrielson VJ. and Fleck R. Clinical and Epidemiological Impact of the New Swine Influenza Strains: an American and European Perspective. *Memorias del XXXIX Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*. Mazatlán Sinaloa, México, 2004: 68-74.
13. Karasin AI, Olsen WC, Anderson GA. Genetic Characterization of an H1N2 Influenza Virus Isolated from pigs in Indiana. *J Clin Microbiol* 2000;38:2453-2456.
14. Marozin S, Gregory V, Cameron K, Bennett M, Valette M, Aymard M, et al., Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. *J Gen Virol* 2002;83:735-745.
15. Stine DL, Anderson GA, Liem A, Keil D, McCorkendale D. Recent observations of swine influenza disease and prophylaxis in US swine herds. *Memorias del XXXVII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*; 2002 Julio 17-21; Puerto Vallarta (Jalisco) México, 2002:43-46.

16. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chamber TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992;56:152-179.
17. Hernández BEM. Influenza porcina. En Ramírez NR, Pijoan CA. *Enfermedades de los Cerdos*. Edit. Diana Técnico. 1987; 190-195.
18. Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can Vet J* 2003;44:735-737.
19. Trigo TFJ. *Aparato Respiratorio. Patología Sistémica Veterinaria 3rd Ed.* México: McGraw-Hill Interamericana, 1998.
20. Carreón R, Chapa-Bezanilla J, Martínez OC, Pacheco R, Palacios JM. La infección por virus de influenza porcina en México. *Memorias del XL Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 2005 Julio 13-17; León (Guanajuato) México, 2005:92.*
21. Lee SM, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods* 2001;97:13-22.
22. Webby RJ, Rossow K, Erickson G, Sims Y, Webster RG. Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. *Virus Res.* 2004;103:67-73.
23. Karasin AI, West K, Carman S, Olsen WC. Characterization of Avian H3N3 and H1N1 Influenza A Viruses Isolated from Pigs in Canada. *J Clin Microbiol* 2004;42:4349-4354.
24. Choi YK, Lee JH, Erickson G, Goyal SM, Joo HS, Webster RG, Webby RJ. H3N2 Influenza Virus Transmission from Swine to Turkeys, United States. *Emer Infect Dis* 2004;10:2156-2160.

25. Chapa J, Rodriguez E. Pruebas de laboratorio e interpretación de resultados para el diagnóstico de enfermedades virales de los cerdos. Memorias del IV Ciclo de Conferencias AMVEC La Piedad, 2005 Octubre 14, La Piedad (Michoacán) México: Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en cerdos, AC, 2005.
26. Scholtissek C, Burger H, Kistner O, Shortridge K. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology* 1985;147:287-294.
27. Webby RJ, Rossow K, Erickson G, Sims Y, Webster R. Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. *Virus Res.* 2004;203:67-73.
28. Van Reeth K. The protective immune response to swine influenza virus: the European experience. 36th Annual Meeting of American Association of Swine Veterinarians Toronto, (Ontario) Canada 2005 March 5-8. American Association of Swine Veterinarians 2005:493-497.
29. Herradora LMA, Principales problemas que afectan el rendimiento de la piara reproductora. En Trujillo OME, Martínez GRG, Herradora LMA. La Piara Reproductora. Edit. Mundi-Prensa. 2002; 27-28.
30. Barigazzi G, Donatelli I. Swine influenza in Italy. *Vet Res Commun* 2003;27:93-99.
31. Webby RJ, Swenson SL, Krauss SL, Gerrish PJ, Goyal SM, Webster RG. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J Virol* 2000;74:8243-8251.
32. Jung K, Ha Y, Chae C. Pathogenesis of swine influenza virus subtype H1N2 infection in pigs. *J Comp Path.* 2005;132:179-184.

33. Morrilla AG, Influenza Porcina. Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos. Edit. Manual Moderno. 2005; 215-219.
34. García RO, Lobo MG. Enfermedades Respiratorias. Edit. Trillas. 2003:112-114.
35. Yoon KJ, Janke HB, Swalla WR, Erickson G. Comparison of a commercial H1N1 enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition test in detecting serum antibody against swine influenza viruses. J Vet Diagn Invest 2004;16:197-201.
36. Skibbe D, Zhou EM, Janke HB. Comparison of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay with hemagglutination inhibition assay for serodiagnosis of swine influenza virus (H1N1) infection. J Vet Diagn Invest 2004;16:86-89.
37. Luke TD, Canas LC, Schadler CA. A rapid, single-step multiplex reverse transcription-PCR assay for the detection of human H1NI, H3N2, and B influenza viruses. J Clin Virol 2002;25:345-350.
38. Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Evaluation of a Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay for subtyping hemagglutinin genes 1 and 3 of swine influenza type A virus in clinical samples. J Vet Diagn Invest 2002;14:62-65.
39. Melanie WS, David MW, Marion T, Ian MM, Jeanette W, David JS *et al.*, A sensitive, Specific and Cost-Effective Multiplex Reverse Transcriptase-PCR Assay for the Detection of Seven Common Respiratory Viruses in Respiratory Samples. J Mol Diag 2004;6:125-131.
40. Foni E, Chiapponia C, Garbarino E, Fratta E, Barigazzia G, Merenda M. Detection of swine influenza virus by RT-PCR and standard methods. 4th

- International symposium on emerging and re-emerging pig diseases. 2003
Roma Junio 29- Julio 2: 271-272.
- 41.** Maldonado J, Van Reeth K, Riera P, Sitja M, Saubi N, Espuña E, *et al.*,
Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza
A viruses in densely populated pig areas in Spain. *Vet J* 2005;1-5.
- 42.** Richt JA, Clouser DF, Larger KM, Spackman E, Suarez DL. Rapid detection
of swine influenza viruses using a real-time PCR assay. *Proceeding of the
17th IPVS Congress, Ames, Iowa, USA, 2002-Volume 2 page 414.*
- 43.** 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. *Journal Virol Methods* 2002;
102: 53-59.
- 44.** JMP. SAS/STAT. User Guide. 4th edition. SAS. Inst:Inc.cary.NC;2000.
- 45.** *STATGRAPHICS[®] Centurion XV.* User Manual by StatPoint, Inc. July,
2005.
- 46.** Alvarez FM, Rodríguez BJ, Ayora TJ, Villegas PS. Estudio transversal de el
virus influenza subtipo H1N1 y H3N2 en granjas porcinas del estado de
Yucatan, México. *Memorias del XXXVI Congreso de la Asociación
Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 2001 Julio 25-29;
Querétaro, México: Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en
Cerdos* 2001:115.
- 47.** Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Prevalence of swine influenza virus subtypes
on swine farms in the United States. *Arch Virol* 2002;147:1209-1220.
- 48.** Trujillo OME, Carreón NR, Mercado GC, Quezada MF. Determinación de
anticuerpos contra el virus de Influenza H1N1 y H3N2 en sueros porcinos.

Memorias del XXXIX Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Mazatlán Sinaloa, México. 2004;181.

- 49.**Lara J, Cortes R, Castro F, Escamilla J, Quezada F, Aranda M. El diagnóstico Molecular y PRRS: Aplicaciones prácticas. Memorias del XLI Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 2006 Agosto 16-19; Ixtapa (Guerrero) México, 2006:89-95.